



Περιεχόμενα

II Μη νομοθετικές πράξεις

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

- * Κανονισμός (ΕΕ) 2016/266 της Επιτροπής, της 7ης Δεκεμβρίου 2015, για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο, του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) ⁽¹⁾ 1

⁽¹⁾ Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ

II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2016/266 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 7ης Δεκεμβρίου 2015

για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή του στην τεχνική πρόοδο, του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 2,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής ⁽²⁾ περιλαμβάνει τις μεθόδους δοκιμών που πρέπει να εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας των χημικών προϊόντων στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.
- (2) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 πρέπει να επικαιροποιηθεί για να συμπεριλάβει νέες και επικαιροποιημένες μεθόδους δοκιμών που εγκρίθηκαν πρόσφατα από τον ΟΟΣΑ, ούτως ώστε να ληφθεί υπόψη η τεχνική πρόοδος και να εξασφαλιστεί η μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς, σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ⁽³⁾. Ζητήθηκε η γνώμη των ενδιαφερόμενων φορέων σχετικά με το παρόν σχέδιο.
- (3) Η προσαρμογή περιλαμβάνει είκοσι μεθόδους δοκιμών: μια νέα μέθοδο για τον προσδιορισμό μιας φυσικοχημικής ιδιότητας, έντεκα νέες μεθόδους δοκιμών και τρεις επικαιροποιημένες μεθόδους δοκιμών για την εκτίμηση της οικοτοξικότητας, καθώς και πέντε νέες μεθόδους δοκιμών για την εκτίμηση της πορείας και της συμπεριφοράς στο περιβάλλον.
- (4) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 θα πρέπει να τροποποιηθεί ανάλογα.
- (5) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί δυνάμει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

⁽¹⁾ ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

⁽²⁾ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής, της 30ής Μαΐου 2008, για τον καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) (ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1).

⁽³⁾ Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 7 Δεκεμβρίου 2015.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
Jean-Claude JUNCKER

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

- 1) Στην αρχή του παραρτήματος, πριν από το μέρος Α, προστίθεται η εξής σημείωση:

«Σημείωση:

Προτού χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις ακόλουθες μεθόδους δοκιμών για τη δοκιμασία μιας πολυσυστατικής ουσίας (MCS), μιας ουσίας άγνωστης ή ασταθούς σύνθεσης, ενός προϊόντος πολύπλοκης αντίδρασης ή βιολογικού υλικού (UVCB), ή μείγματος, και αν η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου για τη δοκιμασία MCS, UVCB ή μειγμάτων δεν αναφέρεται στην αντίστοιχη μέθοδο δοκιμών, θα πρέπει να εξετάζεται κατά πόσον η μέθοδος ενδείκνυται για τον επιδιωκόμενο κανονιστικό σκοπό.

Αν η μέθοδος δοκιμών χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία MCS, UVCB ή μείγματος, θα πρέπει να παρέχονται, στο μέτρο του δυνατού, επαρκείς πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεσή του, π.χ. τη χημική ταυτότητα των συστατικών του, την ποσοτική τους εμφάνιση, καθώς και τις σχετικές ιδιότητες των συστατικών.»

- 2) Προστίθεται το κεφάλαιο Α.24:

«Α.24. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (N-ΟΚΤΑΝΟΛΗ/ΝΕΡΟ), ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC (ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 117 του ΟΟΣΑ (2004).

1. Ως συντελεστής κατανομής (P) ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας μιας διαλυμένης ουσίας σε διφασικό σύστημα που αποτελείται από δύο σε μεγάλο βαθμό μη αναμειξίμους διαλύτες. Στην περίπτωση n-οκτανόλης και νερού,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{οκτανόλη}}{C_{\text{νερό}}}$$

Επειδή ο συντελεστής κατανομής είναι το ηλίκο δύο συγκεντρώσεων, είναι αδιάστατο μέγεθος και δίνεται συνήθως με τη μορφή του δεκαδικού λογαρίθμου του.

2. Ο P_{ow} συνιστά βασική παράμετρο στις μελέτες σχετικά με τη συμπεριφορά των χημικών ουσιών στο περιβάλλον. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει εξαιρετικά σημαντική σχέση μεταξύ του P_{ow} ουσιών σε μη ιοντισμένη μορφή και της βιοσυσσώρευσης τους στα ψάρια. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο P_{ow} συνιστά χρήσιμη παράμετρο για την πρόβλεψη της προσρόφησης στο έδαφος και τα ιζήματα, καθώς και για τον προσδιορισμό ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης για μεγάλο φάσμα βιολογικών επιδράσεων.
3. Η αρχική πρόταση για τη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών βασιζόταν σε άρθρο των C.V. Eadsforth και P. Moser (1). Η ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμών και η διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή σε επίπεδο ΟΟΣΑ συντονίστηκαν από την Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt) της Ομοσπονδιακής Δημοκρατίας της Γερμανίας κατά τη διάρκεια του 1986 (2).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

4. Οι τιμές του $\log P_{ow}$ στην κλίμακα - 2 έως 4 (περιστασιακά έως 5 και άνω) ⁽¹⁾ μπορούν να προσδιορίζονται πειραματικά με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης (κεφάλαιο Α.8 του παρόντος παραρτήματος, κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 107 του ΟΟΣΑ). Η μέθοδος HPLC καλύπτει τις τιμές του $\log P_{ow}$ στην κλίμακα από 0 έως 6 (1)(2)(3)(4)(5). Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να απαιτήσει εκτίμηση του P_{ow} ώστε να καταμετρηθούν οι κατάλληλες ουσίες αναφοράς και να υποστηριχθούν οποιαδήποτε συμπεράσματα αντλούνται από τα δεδομένα που προκύπτουν από τη δοκιμή. Οι μέθοδοι υπολογισμού εξετάζονται εν συντομία στο προσάρτημα της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Ο τρόπος λειτουργίας της HPLC είναι ισοκρατικός.
5. Οι τιμές του P_{ow} εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη θερμοκρασία, το pH, την ιοντική ισχύ κ.λπ., οι οποίες θα πρέπει να προσδιορίζονται στο πείραμα με σκοπό την ορθή ερμηνεία των δεδομένων P_{ow} . Για τις ιοντιζόμενες ουσίες, μια άλλη μέθοδος [π.χ. σχέδιο κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ σχετικά με τη μέθοδο μέτρησης του pH για τις ιοντιζόμενες ουσίες (6)] θα μπορούσε να καταστεί διαθέσιμη και να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά. Αν και το εν λόγω σχέδιο κατευθυντήριας γραμμής του ΟΟΣΑ μπορεί να ενδείκνυται για τον προσδιορισμό του P_{ow} για τις συγκεκριμένες ιοντιζόμενες ουσίες, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιείται η μέθοδος HPLC σε περιβαλλοντικά σημαντικό pH (βλ. σημείο 9).

⁽¹⁾ Δίνεται ένα ανώτατο όριο επειδή είναι αναγκαίο να επιτευχθεί φάση πλήρους διαχωρισμού μετά τις προσαρμογές της ισορροπίας κατανομής και πριν από τη λήψη δειγμάτων για αναλυτικούς προσδιορισμούς. Με τη δέουσα μέριμνα, το ανώτατο όριο μπορεί να επεκταθεί σε υψηλότερες τιμές του P_{ow} .

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

6. Η HPLC αντίστροφης φάσης διεξάγεται σε αναλυτικές στήλες που φέρουν μια εμπορικά διαθέσιμη στερεά φάση με μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων (π.χ. C8, C18) χημικώς ενωμένες με διοξείδιο του πυριτίου.
7. Η χημική ουσία που εγχέεται σε τέτοια στήλη διαχωρίζεται μεταξύ της κινητής φάσης του διαλύτη και της υδρογονανθρακικής στατικής φάσης, καθώς μετακινείται κατά μήκος της στήλης με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Οι ουσίες συγκρατούνται ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής τους σε υδρογονάνθρακα-νερό· οι υδρόφιλες ουσίες εκλούνται πρώτες και οι λιπόφιλες ουσίες τελευταίες. Ο χρόνος κατακράτησης βρίσκεται από τον παράγοντα χωρητικότητας k , που δίνεται από τον τύπο:

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

όπου t_R είναι ο χρόνος κατακράτησης της υπό δοκιμή ουσίας, και t_0 είναι ο νεκρός χρόνος, δηλ. ο μέσος χρόνος που χρειάζεται το μόριο ενός διαλύτη για να περάσει από τη στήλη. Δεν απαιτούνται ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι· μόνο ο προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης είναι αναγκαίος.

8. Ο συντελεστής κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας σε οκτανόλη/νερό μπορεί να υπολογιστεί εάν ο παράγοντας χωρητικότητας της k προσδιοριστεί πειραματικά και, στη συνέχεια, προστεθεί στην ακόλουθη εξίσωση:

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

όπου

a, b = συντελεστές γραμμικής παλινδρόμησης.

Η ανωτέρω εξίσωση μπορεί να επιλυθεί με τη γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ του λογαρίθμου των συντελεστών κατανομής των ουσιών αναφοράς σε οκτανόλη/νερό και του λογαρίθμου των παραγόντων χωρητικότητας των ουσιών αναφοράς.

9. Η μέθοδος HPLC αντίστροφης φάσης καθιστά εφικτή την εκτίμηση των συντελεστών κατανομής των οποίων η τιμή του $\log P_{ow}$ είναι στην περιοχή μεταξύ 0 και 6, αλλά, σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μπορεί να επεκταθεί για να καλύπτει την τιμή του $\log P_{ow}$ στην περιοχή μεταξύ 6 και 10. Αυτό μπορεί να απαιτήσει την τροποποίηση της κινητής φάσης (3). Η μέθοδος δεν έχει εφαρμογή σε ισχυρά οξέα και βάσεις, σε σύμπλοκα μετάλλων, σε ουσίες που αντιδρούν με το μέσο έκλυσης ή σε επιφανειοδραστικές ουσίες. Οι μετρήσεις μπορούν να διενεργούνται σε ιοντιζόμενες ουσίες στη μη ιοντισμένη μορφή τους (ελεύθερο οξύ ή ελεύθερη βάση) μόνο με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος με pH μικρότερο του pK_a , για το ελεύθερο οξύ, ή μεγαλύτερο του pK_a , για την ελεύθερη βάση. Εναλλακτικά, η πεχαμετρική μέθοδος για τη δοκιμή ιοντιζόμενων ουσιών (6) θα μπορούσε να καταστεί διαθέσιμη και να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος (6). Εάν η τιμή του $\log P_{ow}$ προσδιορίζεται με σκοπό τη χρήση στην ταξινόμηση ως προς την περιβαλλοντική επικινδυνότητα ή στην εκτίμηση των κινδύνων για το περιβάλλον, η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται στην περιοχή pH που είναι σημαντική για το φυσικό περιβάλλον, δηλ. στην περιοχή pH 5,0 - 9.
10. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι προσμεϊξεις μπορεί να δυσχεράνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, λόγω αβεβαιότητας ως προς την απόδοση των κορυφών. Στην περίπτωση μειγμάτων που έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκώς διαχωρισμένες ζώνες, θα πρέπει να δηλώνεται το ανώτατο και το κατώτατο όριο του $\log P_{ow}$, καθώς και το επί τοις εκατό εμβαδόν κάθε κορυφής που αντιστοιχεί σε $\log P_{ow}$. Στην περίπτωση μειγμάτων που αποτελούνται από ομάδα ομόλογων ενώσεων, θα πρέπει επίσης να δηλώνεται η μεσοσταθμική τιμή του $\log P_{ow}$ (7), η οποία πρέπει να υπολογίζεται με βάση τις μεμονωμένες τιμές P_{ow} και τις τιμές του αντίστοιχου επί τοις εκατό εμβαδού (8). Όλες οι κορυφές που συμβάλλουν κατά 5 % ή περισσότερο στο ολικό εμβαδόν κορυφής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον υπολογισμό (9):

$$\text{μεσοσταθμική τιμή } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi}) (\text{εμβαδού } \%)}{\text{ολικό εμβαδόν κορυφής } \%} = \frac{\sum_i (\log P_{owi}) (\text{εμβαδού } \%_i)}{\sum_i \text{εμβαδού } \%}$$

Η μεσοσταθμική τιμή του $\log P_{ow}$ είναι έγκυρη μόνο για ουσίες ή μείγματα (π.χ. ταλλέλαια) που αποτελούνται από ομόλογες ενώσεις (π.χ. σειρά αλκανίων). Είναι δυνατόν να πραγματοποιούνται μετρήσεις μειγμάτων με χρίσμα αποτελέσματα, υπό την προϋπόθεση ότι ο αναλυτικός ανιχνευτής που θα χρησιμοποιείται θα έχει την ίδια ευαισθησία προς όλες τις ουσίες του μείγματος και θα μπορεί να τις διαχωρίζει επαρκώς.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΟΥΣΙΑ

11. Η σταθερά διάστασης, ο συντακτικός τύπος και η διαλυτότητα στην κινητή φάση θα πρέπει να είναι γνωστά προτού χρησιμοποιηθεί η μέθοδος. Πληροφορίες σχετικά με την υδρόλυση θα ήταν επίσης χρήσιμες.

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

12. Για να αυξηθεί η αξιοπιστία της μέτρησης, πρέπει να εκτελούνται επαναληπτικοί προσδιορισμοί.
- Επαναληψιμότητα: Οι τιμές του $\log P_{ow}$ που προκύπτουν από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις οι οποίες διενεργήθηκαν υπό πανομοιότυπες συνθήκες και κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύνολο ουσιών αναφοράς θα πρέπει να μη διαφέρουν περισσότερο από $\pm 0,1$ λογαριθμικές μονάδες.
 - Αναπαραγωγιμότητα: Εάν οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται με διαφορετικό σύνολο ουσιών αναφοράς, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαφορετικά. Κατά κανόνα, ο συντελεστής συσχέτισης R όσον αφορά τη σχέση μεταξύ του $\log k$ και του $\log P_{ow}$ για μια ομάδα εξεταζόμενων ουσιών είναι περίπου 0,9, τιμή που αντιστοιχεί σε συντελεστή κατανομής σε οκτανόλη/νερό του $\log P_{ow} \pm 0,5$ λογαριθμικές μονάδες.
13. Η διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή απέδειξε ότι, με τη μέθοδο HPLC, οι τιμές του $\log P_{ow}$ μπορούν να ληφθούν με απόκλιση $\pm 0,5$ μονάδων από τις τιμές της μεθόδου της ανακινούμενης φιάλης (2). Στη βιβλιογραφία βρίσκονται και άλλες συγκρίσεις (4)(5)(10)(11)(12). Τα γραφήματα συσχέτισης που βασίζονται σε δομικά συγγενείς ουσίες αναφοράς παρέχουν τα ακριβέστερα αποτελέσματα (13).

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

14. Για να υπάρξει συσχέτιση του μετρούμενου παράγοντα χωρητικότητας k μιας ουσίας με τον P_{ow} της εν λόγω ουσίας, πρέπει να καταρτιστεί καμπύλη βαθμονόμησης που να χρησιμοποιεί τουλάχιστον 6 σημεία (βλ. σημείο 24). Η επιλογή των κατάλληλων ουσιών αναφοράς εναπόκειται στον χρήστη. Κανονικά, οι ουσίες αναφοράς θα πρέπει να έχουν τιμές $\log P_{ow}$ οι οποίες να περικλείουν τον $\log P_{ow}$ της υπό δοκιμή ουσίας, δηλ. τουλάχιστον μία ουσία αναφοράς θα πρέπει να έχει P_{ow} υψηλότερο από τον αντίστοιχο της υπό δοκιμή ουσίας, και μία άλλη ουσία θα πρέπει να έχει P_{ow} χαμηλότερο από τον αντίστοιχο της υπό δοκιμή ουσίας. Η προεκβολή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις. Είναι προτιμότερο αυτές οι ουσίες αναφοράς να είναι δομικά συγγενείς με την υπό δοκιμή ουσία. Οι τιμές του $\log P_{ow}$ των ουσιών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση θα πρέπει να βασίζονται σε αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα. Ωστόσο, για ουσίες με υψηλό $\log P_{ow}$ (κατά κανόνα, πάνω από 4) μπορούν να χρησιμοποιούνται οι υπολογισθείσες τιμές, εκτός εάν υπάρχουν διαθέσιμα αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα. Εάν χρησιμοποιούνται τιμές προεκβολής, θα πρέπει να καθορίζεται οριακή τιμή.
15. Για πολλές ομάδες χημικών ουσιών υπάρχουν εκτεταμένοι πίνακες τιμών του $\log P_{ow}$ (14)(15). Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τους συντελεστές κατανομής δομικά συγγενικών ουσιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενικότερη βαθμονόμηση, η οποία να καθορίζεται με βάση άλλες ουσίες αναφοράς. Οι συνιστώμενες ουσίες αναφοράς και οι τιμές P_{ow} τους παρατίθενται στον πίνακα 1. Για τις ιοντιζόμενες ουσίες, οι παρεχόμενες τιμές ισχύουν για τη μη ιοντισμένη μορφή. Η εφικτότητα και η ποιότητα των τιμών ελέγχθηκαν κατά τη διεργαστηριακή συγκριτική δοκιμή.

Πίνακας 1

Συνιστώμενες ουσίες αναφοράς

| | Αριθμός CAS | Ουσία αναφοράς | $\log P_{ow}$ | pKa |
|---|-------------|-----------------------------------|---------------|-------------|
| 1 | 78-93-3 | 2-βουτανόνη (Μεθυλαιθυλκετόνη) | 0,3 | |
| 2 | 1122-54-9 | 4-ακετυλοπυριδίνη | 0,5 | |
| 3 | 62-53-3 | Ανιλίνη | 0,9 | |
| 4 | 103-84-4 | Ακετανιλίδιο | 1,0 | |
| 5 | 100-51-6 | Βενζυλική αλκοόλη | 1,1 | |
| 6 | 150-76-5 | 4-μεθοξυφαινόλη | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | 122-59-8 | Φαινοξυοξικό οξύ | 1,4 | pKa = 3,12 |

| | Αριθμός CAS | Ουσία αναφοράς | log P _{ow} | pKa |
|----|---------------------|----------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 8 | 108-95-2 | Φαινόλη | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 51-28-5 | 2,4-δινιτροφαινόλη | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | 100-47-0 | Βενζονιτρίλιο | 1,6 | |
| 11 | 140-29-4 | Φαινυλακετονιτρίλιο | 1,6 | |
| 12 | 589-18-4 | 4-μεθυλοβενζυλική αλκοόλη | 1,6 | |
| 13 | 98-86-2 | Ακετοφαινόνη | 1,7 | |
| 14 | 88-75-5 | 2-νιτροφαινόλη | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | 121-92-6 | 3-νιτροβενζοϊκό οξύ | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 106-47-8 | 4-χλωρανιλίνη | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | 98-95-3 | Νιτροβενζόλιο | 1,9 | |
| 18 | 104-54-1 | Κιναμυλαλκοόλη (Κιναμωμική αλκοόλη) | 1,9 | |
| 19 | 65-85-0 | Βενζοϊκό οξύ | 1,9 | pKa = 4,19 |
| 20 | 106-44-5 | π-κρεσόλη | 1,9 | pKa = 10,17 |
| 21 | 140-10-3 (trans) | Κιναμωμικό οξύ | 2,1 | pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans) |
| 22 | 100-66-3 | Ανισόλη | 2,1 | |
| 23 | 93-58-3 | Βενζοϊκό μεθύλιο | 2,1 | |
| 24 | 71-43-2 | Βενζόλιο | 2,1 | |
| 25 | 99-04-7 | 3-μεθυλοβενζοϊκό οξύ | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 26 | 106-48-9 | 4-χλωροφαινόλη | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | 79-01-6 | Τριχλωροαιθυλένιο | 2,4 | |
| 28 | 1912-24-9 | Ατραζίνη | 2,6 | |
| 29 | 93-89-0 | Βενζοϊκό αιθύλιο | 2,6 | |
| 30 | 1194-65-6 | 2,6-διχλωροβενζονιτρίλιο | 2,6 | |
| 31 | 535-80-8 | 3-χλωροβενζοϊκό οξύ | 2,7 | pKa = 3,82 |

| | Αριθμός CAS | Ουσία αναφοράς | log P _{ow} | pKa |
|----|-------------|----------------------------------|---------------------|------------|
| 32 | 108-88-3 | Τολουόλιο | 2,7 | |
| 33 | 90-15-3 | 1-ναφθόλη | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 608-27-5 | 2,3-διχλωροανιλίνη | 2,8 | |
| 35 | 108-90-7 | Χλωροβενζόλιο | 2,8 | |
| 36 | 1746-13-0 | Αλλυλοφαινυλαιθέρας | 2,9 | |
| 37 | 108-86-1 | Βρωμοβενζόλιο | 3,0 | |
| 38 | 100-41-4 | Αιθυλοβενζόλιο | 3,2 | |
| 39 | 119-61-9 | Βενζοφαινόνη | 3,2 | |
| 40 | 92-69-3 | 4-φαινυλοφαινόλη | 3,2 | pKa = 9,54 |
| 41 | 89-83-8 | Θυμόλη | 3,3 | |
| 42 | 106-46-7 | 1,4-διχλωροβενζόλιο | 3,4 | |
| 43 | 122-39-4 | Διφαινυλαμίνη | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | 91-20-3 | Ναφθαλίνη | 3,6 | |
| 45 | 93-99-2 | Βενζοϊκό φαινύλιο | 3,6 | |
| 46 | 98-82-8 | Ισοπροπυλοβενζόλιο | 3,7 | |
| 47 | 88-06-2 | 2,4-6-τριχλωροφαινόλη | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | 92-52-4 | Διφαινύλιο | 4,0 | |
| 49 | 120-51-4 | Βενζοϊκό βενζύλιο | 4,0 | |
| 50 | 88-85-7 | 2,4-δινιτρο-6-sec-βουτυλοφαινόλη | 4,1 | |
| 51 | 120-82-1 | 1,2,4-τριχλωροβενζόλιο | 4,2 | |
| 52 | 143-07-7 | Δωδεκανοϊκό οξύ | 4,2 | pKa = 5,3 |
| 53 | 101-84-8 | Διφαινυλαιθέρας | 4,2 | |
| 54 | 85-01-8 | Φαινανθρένιο | 4,5 | |
| 55 | 104-51-8 | n-βουτυλοβενζόλιο | 4,6 | |

| | Αριθμός CAS | Ουσία αναφοράς | log P _{ow} | pKa |
|----|-------------|-----------------------|---------------------|-----|
| 56 | 103-29-7 | Διβενζύλιο | 4,8 | |
| 57 | 3558-69-8 | 2,6-δифαινυλοπυριδίνη | 4,9 | |
| 58 | 206-44-0 | Φλουορανθένιο | 5,1 | |
| 59 | 603-34-9 | Τριφαινυλαμίνη | 5,7 | |
| 60 | 50-29-3 | DDT | 6,5 | |

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής

16. Εάν κρίνεται αναγκαίο, η εκτίμηση του συντελεστή κατανομής μπορεί να επιτυγχάνεται, κατά προτίμηση, με τη χρήση μεθόδου υπολογισμού (βλ. προσάρτημα) ή, όπου ενδείκνυται, με την εφαρμογή του λόγου της διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας στους καθαρούς διαλύτες.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

17. Απαιτείται υδροχρωματογράφος, ο οποίος να διαθέτει αντλία χαμηλών παλμών και κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης. Σε ευρύ φάσμα χημικών ομάδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανιχνευτής UV, με μήκος κύματος 210 nm, ή ανιχνευτής RI. Η παρουσία πολικών ομάδων στη στατική φάση μπορεί να επηρεάσει σοβαρά την απόδοση της στήλης HPLC. Κατά συνέπεια, οι στατικές φάσεις θα πρέπει να έχουν το ελάχιστο δυνατό ποσοστό πολικών ομάδων (16). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα μικροσωματιδιακά υλικά πλήρωσης στηλών χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης ή έτοιμες γεμισμένες στήλες. Μεταξύ του συστήματος έγχυσης και της αναλυτικής στήλης μπορεί να τοποθετείται προστήλη.

Κινητή φάση

18. Για την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης ο οποίος απαεριώνεται πριν από τη χρήση, χρησιμοποιούνται μεθανόλη και απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό ποιότητας HPLC. Θα πρέπει να γίνεται χρήση ισοκρατικής έκλουσης. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αναλογίες μεθανόλης/νερού με ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό 25 %. Κατά κανόνα, μείγμα 3:1 (v/v) μεθανόλης-νερού είναι ικανοποιητικό για την έκλουση ουσιών με log P 6 εντός μίας ώρας, με ταχύτητα ροής 1 ml/λεπτό. Για ουσίες με log P άνω του 6 μπορεί να είναι αναγκαίο να μειωθεί ο χρόνος έκλουσης τους (όπως και των ουσιών αναφοράς) με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ή του μήκους της στήλης.
19. Η υπό δοκιμή ουσία και οι ουσίες αναφοράς πρέπει να είναι διαλυτές στην κινητή φάση, σε συγκέντρωση επαρκή ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευσή τους. Με το μείγμα μεθανόλης-νερού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, αφού αυτά μεταβάλλουν τις ιδιότητες της στήλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να επιβεβαιώνεται ότι ο χρόνος κατακράτησης της υπό δοκιμή ουσίας και των ουσιών αναφοράς δεν επηρεάζεται. Εάν το μείγμα μεθανόλης-νερού δεν είναι το ενδεδειγμένο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα μείγματα οργανικών διαλυτών-νερού, π.χ. αιθανόλης-νερού, ακετονιτριλίου-νερού ή ισοπροπυλικής αλκοόλης (2-προπανόλης)-νερού.
20. Το pH του μέσου έκλουσης είναι κρίσιμος παράγοντας για τις ιοντιζόμενες ουσίες. Θα πρέπει να είναι μέσα στην περιοχή του pH λειτουργίας της στήλης, συνήθως μεταξύ 2 και 8. Συνιστάται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση αλάτων και η φθορά της στήλης, κάτι που συμβαίνει με ορισμένα μείγματα οργανικής φάσης-ρυθμιστικού διαλύματος. Κατά κανόνα, δεν συνιστώνται οι μετρήσεις HPLC με στατικές φάσεις που έχουν ως βάση το οξείδιο του πυριτίου για pH πάνω από 8, δεδομένου ότι η χρήση αλκαλικής κινητής φάσης μπορεί να προκαλέσει ταχεία ελάττωση της απόδοσης της στήλης.

Διαλυμένες ουσίες

21. Η υπό δοκιμή ουσία και οι ουσίες αναφοράς πρέπει να είναι επαρκώς καθαρές, ώστε να αποδίδονται οι κορυφές των χρωματογραφημάτων στις αντίστοιχες ουσίες. Εάν είναι δυνατόν, οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς της δοκιμής ή της βαθμονόμησης διαλύονται στην κινητή φάση. Εάν για τη διάλυση της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς χρησιμοποιείται διαλύτης άλλος από την κινητή φάση, η κινητή φάση θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την τελική αραίωση πριν από την έγχυση.

Συνθήκες της δοκιμής

22. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 1 °C.

Προσδιορισμός του νεκρού χρόνου t_0

23. Ο νεκρός χρόνος t_0 μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση μη κατακρατούμενων οργανικών ουσιών (π.χ. θειουρίας ή φορμαμίδιου). Ακριβέστερος νεκρός χρόνος μπορεί να προσδιοριστεί από τους χρόνους κατακράτησης που μετρήθηκαν ή από ομάδα περίπου επτά μελών ομόλογης σειράς (π.χ. n-αλκυλο μεθυλο κετόνες) (17). Οι χρόνοι κατακράτησης $t_R(n_c + 1)$ παριστώνται γραφικά σε συνάρτηση με τον $t_R(n_c)$, όπου n_c είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα. Λαμβάνεται ευθεία γραμμή, $t_R(n_c + 1) = A t_R(n_c) + (1 - A)t_0$, όπου το A, που αντιπροσωπεύει τον λόγο $k(n_c + 1)/k(n_c)$, είναι σταθερό. Ο νεκρός χρόνος t_0 λαμβάνεται από το σημείο τομής $(1 - A)t_0$ και την κλίση A.

Εξίσωση παλινδρόμησης

24. Το επόμενο βήμα είναι να αποτυπωθεί η συσχέτιση του $\log k$ σε συνάρτηση με τον $\log P$ για τις κατάλληλες ουσίες αναφοράς, όπου οι τιμές του $\log P$ προσεγγίζουν την τιμή που αναμένεται για την υπό δοκιμή ουσία. Στην πράξη, εγχέονται ταυτόχρονα 6 έως 10 ουσίες αναφοράς. Οι χρόνοι κατακράτησης προσδιορίζονται, κατά προτίμηση σε ολοκληρωτή καταγραφής συνδεδεμένο με το σύστημα ανίχνευσης. Οι αντίστοιχοι λογάριθμοι των παραγόντων χωρητικότητας, $\log k$, σχεδιάζονται ως συνάρτηση του $\log P$. Η εξίσωση παλινδρόμησης εκτελείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές μεταβολές στην απόδοση της στήλης.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ P_{ow} ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

25. Η υπό δοκιμή ουσία εγχέεται στις μικρότερες ανιχνεύσιμες ποσότητες. Ο χρόνος κατακράτησης προσδιορίζεται δύο φορές. Ο συντελεστής κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με παρεμβολή του υπολογιζόμενου παράγοντα χωρητικότητας στην καμπύλη βαθμονόμησης. Για πολύ χαμηλούς και πολύ υψηλούς συντελεστές κατανομής είναι αναγκαία η προεκβολή. Ειδικά σε αυτές τις περιπτώσεις, πρέπει να δίνεται προσοχή στα όρια εμπιστοσύνης της γραμμής παλινδρόμησης. Εάν ο χρόνος κατακράτησης του δείγματος βρίσκεται έξω από την περιοχή των χρόνων κατακράτησης που λαμβάνονται για τα πρότυπα, θα πρέπει να δηλώνεται οριακή τιμή.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

26. Στην έκθεση πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

- εάν καθορίζονται, η προκαταρκτική εκτίμηση του συντελεστή κατανομής, οι εκτιμώμενες τιμές και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε· και εάν εφαρμόστηκε μέθοδος υπολογισμού, η πλήρης περιγραφή της, όπως αναγνώριση της βάσης δεδομένων και λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την επιλογή τμημάτων·
- υπό δοκιμή ουσίες και ουσίες αναφοράς: καθαρότητα, συντακτικός τύπος και αριθμός CAS·
- περιγραφή του εξοπλισμού και των συνθηκών λειτουργίας: αναλυτική στήλη, προστήλη·
- κινητή φάση, μέσα ανίχνευσης, περιοχή θερμοκρασιών, pH·
- προφίλ έκλυσης (χρωματογραφήματα)·
- νεκρός χρόνος και τρόπος μέτρησής του·
- στοιχεία κατακράτησης και βιβλιογραφικές τιμές $\log P_{ow}$ για τις ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στη βαθμονόμηση·
- λεπτομερή στοιχεία για τη προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης ($\log k$ σε συνάρτηση με τον $\log P_{ow}$) και τον συντελεστή συσχέτισης της γραμμής συμπεριλαμβανομένων των διαστημάτων εμπιστοσύνης·
- δεδομένα μέσης κατακράτησης και παρεμβλημένη τιμή $\log P_{ow}$ για την εξεταζόμενη ουσία·
- στην περίπτωση μείγματος: χρωματογράφημα του προφίλ έκλυσης με επισήμανση των τιμών αποκοπής·

- τιμές $\log P_{ow}$ σχετικές με το επί τοις εκατό εμβαδόν της κορυφής του $\log P_{ow}$.
- υπολογισμός με τη βοήθεια γραμμής παλινδρόμησης.
- υπολογισθείσες μεσοσταθμικές τιμές $\log P_{ow}$ κατά περίπτωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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, Νοέμβριος 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), Παράρτημα 10, Oviedo, 20–24 Φεβρουαρίου 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 Αυγούστου.
- (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, σ. 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). (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 Willey, Νέα Υόρκη.

-
- (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.
-

Προσάρτημα

Μέθοδοι υπολογισμού του P_{ow}

Εισαγωγή

1. Το παρόν προσάρτημα παρέχει σύντομη εισαγωγή στον υπολογισμό του P_{ow} . Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευθείτε τα εγχειρίδια (1)(2).
2. Οι υπολογισθείσες τιμές του P_{ow} χρησιμοποιούνται με σκοπό:
 - να αποφασιστεί η πειραματική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί: η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης, για $\log P_{ow}$ μεταξύ - 2 και 4, και η μέθοδος HPLC, για $\log P_{ow}$ μεταξύ 0 και 6·
 - να επιλεγούν οι συνθήκες που θα εφαρμοστούν στη μέθοδο HPLC (ουσίες αναφοράς, αναλογία μεθανόλης-νερού)·
 - να ελεγχθεί η αξιοπιστία των τιμών που λαμβάνονται με τις πειραματικές μεθόδους·
 - να δοθεί εκτιμώμενη τιμή σε περίπτωση που δεν μπορούν να εφαρμοστούν πειραματικές μέθοδοι.

Αρχή των μεθόδων υπολογισμού

3. Οι μέθοδοι υπολογισμού που προτείνονται στην παρούσα ενότητα βασίζονται στη θεωρητική κατάτμηση του μορίου σε κατάλληλα τμήματα για τα οποία υπάρχουν γνωστές αξιόπιστες αυξήσεις του $\log P_{ow}$. Ο $\log P_{ow}$ προκύπτει από την άθροιση των τμηματικών τιμών και των διορθωτικών όρων για ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Υπάρχουν πίνακες σταθερών και διορθωτικών όρων για τα τμήματα (1)(2)(3)(4)(5)(6). Ορισμένοι ενημερώνονται τακτικά (3).

Αξιοπιστία των υπολογισθεισών τιμών

4. Κατά κανόνα, η αξιοπιστία των μεθόδων υπολογισμού μειώνεται όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα της υπό μελέτη ουσίας. Στην περίπτωση απλών μορίων με μικρό μοριακό βάρος και με μία ή δύο λειτουργικές ομάδες, μπορεί να αναμένεται απόκλιση 0,1 έως 0,3 μονάδων του $\log P_{ow}$ μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μεθόδων κατάτμησης και των μετρούμενων τιμών. Το περιθώριο σφάλματος θα εξαρτηθεί από την αξιοπιστία των σταθερών των τμημάτων που χρησιμοποιούνται, την ικανότητα αναγνώρισης των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (π.χ. των δεσμών υδρογόνου) και την ορθή χρήση των διορθωτικών όρων. Στην περίπτωση ιοντιζόμενων ουσιών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το φορτίο και ο βαθμός ιοντισμού (10).

Η μέθοδος π των Fujita και Hansch

5. Η σταθερά υδρόφοβου υποκαταστάτη, π , η οποία εισήχθη αρχικά από τους Fujita et al. (7), ορίζεται ως εξής:

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

όπου PhX είναι αρωματικό παράγωγο και PhH η μητρική ουσία.

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

Η μέθοδος π είναι πρωτίτως σημαντική για τις αρωματικές ουσίες. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν οι τιμές π για μεγάλο αριθμό υποκαταστατών (4)(5).

Μέθοδος Rekker

6. Με τη μέθοδο Rekker (8), η τιμή $\log P_{ow}$ υπολογίζεται ως εξής:

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

όπου το a_i δηλώνει πόσες φορές ένα συγκεκριμένο τμήμα εμφανίζεται στο μόριο, και το f_i δηλώνει την αύξηση του $\log P_{ow}$ του τμήματος. Οι όροι αλληλεπίδρασης μπορούν να εκφραστούν ως ακέραιο πολλαπλάσιο μίας και μόνης σταθεράς C_m (που καλείται “μαγική σταθερά”). Οι σταθερές f_i και C_m του τμήματος έχουν προσδιοριστεί από κατάλογο 1 054 πειραματικών τιμών P_{ow} 825 ουσιών μέσω ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης (6)(8). Ο προσδιορισμός των όρων αλληλεπίδρασης διενεργείται σύμφωνα με ένα σύνολο κανόνων (6)(8)(9).

Μέθοδος Hansch και Leo

7. Με τη μέθοδο Hansch και Leo (4), η τιμή $\log P_{ow}$ υπολογίζεται ως εξής:

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

όπου f_i είναι μια σταθερά τμήματος, F_j ένας διορθωτικός όρος (παράγοντας), a_i και b_j η αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης. Με βάση πειραματικές τιμές P_{ow} προσδιορίστηκαν εμπειρικά ένας κατάλογος ατομικών και ομαδικών τιμών τμημάτων και ένας κατάλογος διορθωτικών όρων F_j . Οι διορθωτικοί όροι χωρίστηκαν σε πολλές διαφορετικές κατηγορίες (1)(4). Αναπτύχθηκαν πακέτα λογισμικού, ώστε να ληφθούν υπόψη όλοι οι κανόνες και οι διορθωτικοί όροι (3).

ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

8. Ο υπολογισμός του $\log P_{ow}$ πολύπλοκων μορίων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά, εάν το μόριο χωριστεί σε μεγαλύτερα τμήματα για τα οποία υπάρχουν αξιόπιστες τιμές $\log P_{ow}$, είτε από πίνακες (3)(4) είτε από υφιστάμενες μετρήσεις. Τα τμήματα αυτά (π.χ. ετεροκυκλικοί δακτύλιοι, ανθρακινόνη, αζωβενζόλιο) μπορούν να συνδυαστούν στη συνέχεια με τις τιμές π της μεθόδου Hansch ή με τις σταθερές τμημάτων της μεθόδου Rekker ή της μεθόδου Leo.

Παρατηρήσεις

- i) Οι μέθοδοι υπολογισμού εφαρμόζονται μόνο σε μερικώς ή πλήρως ιοντιζόμενες ουσίες, όταν λαμβάνονται υπόψη οι αναγκαίοι διορθωτικοί παράγοντες.
- ii) Εάν μπορεί να υποτεθεί η ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, πρέπει να προστεθούν οι αντίστοιχοι διορθωτικοί όροι (περίπου +0,6 έως +1,0 μονάδες του $\log P_{ow}$). Ενδείξεις για την παρουσία τέτοιων δεσμών μπορούν να ληφθούν από στερεοχημικά μοντέλα ή φασματοσκοπικά δεδομένα.
- iii) Εάν υπάρχει πιθανότητα περισσότερων από μίας ταυτομερών μορφών, ως βάση του υπολογισμού θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η πιο πιθανή μορφή.
- iv) Οι αναθεωρήσεις των καταλόγων με τις σταθερές τμημάτων θα πρέπει να ακολουθούνται προσεκτικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Νέα Υόρκη (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (Νέα Υόρκη) και Οξφόρδη (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, Νέα Υόρκη (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, Νέα Υόρκη (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) Το κεφάλαιο Γ.3 αντικαθίσταται από το εξής κείμενο:

«Γ.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΦΥΚΗ (ΑΛΓΕΣ) ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 201 του ΟΟΣΑ (2006· το παράρτημα διορθώθηκε το 2011). Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος δοκιμών έπρεπε να επεκταθεί, ώστε να συμπεριληφθούν πρόσθετα είδη οργανισμών, και να επικαιροποιηθεί, ώστε να καλυφθούν οι απαιτήσεις που αφορούν την εκτίμηση επικινδυνότητας και την ταξινόμηση των χημικών ουσιών. Η αναθεώρηση αυτή ολοκληρώθηκε με βάση τη μεγάλη πρακτική πείρα, την επιστημονική πρόοδο όσον αφορά τις μελέτες τοξικότητας σε φύκη και την ευρεία κανονιστική χρήση στο διάστημα που μεσολάβησε από την πρώτη έγκριση της μεθόδου.
2. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Σκοπός της παρούσας δοκιμής είναι να προσδιοριστούν οι επιδράσεις μιας χημικής ουσίας στην ανάπτυξη μικροφυκών (μικροαλγών) και/ή κυανοβακτηριδίων των γλυκών υδάτων. Οργανισμοί δοκιμής που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε ασυνεχείς καλλιέργειες κατά κανόνα για χρονικό διάστημα 72 ωρών. Παρά τη σχετικά μικρή διάρκεια της δοκιμής, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις σε πολλές γενεές.
4. Η απόκριση του συστήματος είναι η μείωση της ανάπτυξης σε μια σειρά καλλιιεργειών φυκών (μονάδες δοκιμής) που εκτίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η απόκριση αξιολογείται σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση έκθεσης, σε σύγκριση με τη μέση ανάπτυξη ταυτόσημων καλλιιεργειών ελέγχου που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία. Για την πλήρη έκφραση της απόκρισης του συστήματος στις τοξικές επιδράσεις (βέλτιστη ευαισθησία), οι καλλιιεργειες αφήνονται να αναπτυχθούν εκθετικά χωρίς περιορισμούς, σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών στοιχείων και συνεχούς φωτισμού, για επαρκές χρονικό διάστημα, ώστε να μετρηθεί η μείωση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης.
5. Η ανάπτυξη και η αναστολή της ανάπτυξης προσδιορίζονται ποσοτικά με μετρήσεις της βιομάζας φυκών σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η βιομάζα φυκών ορίζεται ως το ξηρό βάρος ανά μονάδα όγκου, π.χ. mg φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Ωστόσο, είναι δύσκολο να μετρηθεί το ξηρό βάρος και, για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται παράμετροι υποκατάστασης. Από αυτές τις παραμέτρους, χρησιμοποιείται συχνότερα ο αριθμός κυττάρων. Άλλες παράμετροι που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα είναι ο κυτταρικός όγκος, ο φθορισμός, η οπτική πυκνότητα κ.λπ. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο συντελεστής μετατροπής της μετρούμενης παραμέτρου υποκατάστασης σε βιομάζα.
6. Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως $E_x C_x$ (π.χ. $E_x C_{50}$).
7. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκριση που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τη βιομάζα στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως $E_y C_x$ (π.χ. $E_y C_{50}$).

8. Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Στις σχετικές με την υπό δοκιμή χημική ουσία πληροφορίες που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, ο βαθμός καθαρότητας, η σταθερότητα στο φως, η σταθερότητα στις συνθήκες της δοκιμής, οι ιδιότητες απορρόφησης του φωτός, η σταθερά pK_a και τα αποτελέσματα των μελετών μετατροπής, συμπεριλαμβανομένης της βιοαποικοδομησιμότητας στο νερό.
10. Η υδατοδιαλυτότητα, ο συντελεστής κατανομής σε μείγμα οκτανόλης-νερού (P_{ow}) και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι γνωστά και θα πρέπει να υπάρχει επικυρωμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, μέθοδος της οποίας η απόδοση ανάκτησης και το όριο ανίχνευσης θα πρέπει να αναφέρονται στην έκθεση.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:
- Η βιομάζα στις καλλιέργειες ελέγχου θα πρέπει να έχει αυξηθεί εκθετικά με συντελεστή τουλάχιστον 16 εντός των 72 ωρών που διαρκεί η δοκιμή. Αυτό αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $0,92 \text{ ημέρα}^{-1}$. Ο ρυθμός ανάπτυξης των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ειδών είναι συνήθως σημαντικά υψηλότερος (βλ. προσάρτημα 2). Το κριτήριο αυτό μπορεί να μην πληρούται όταν χρησιμοποιούνται είδη βραδύτερης ανάπτυξης από εκείνα που παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Στην περίπτωση αυτή, η διάρκεια της δοκιμής πρέπει να παρατείνεται μέχρι να επιτευχθεί τουλάχιστον δεκαεξαπλάσια αύξηση στις καλλιέργειες ελέγχου, ενώ η ανάπτυξη πρέπει να είναι εκθετική σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Η διάρκεια της δοκιμής είναι δυνατόν να συντομευθεί σε τουλάχιστον 48 ώρες, ώστε να διατηρηθεί η απεριόριστη εκθετική ανάπτυξη κατά τη δοκιμή, προκειμένου να επιτευχθεί ο ελάχιστος πολλαπλασιαστής 16.
 - Ο μέσος συντελεστής μεταβολής για τους τμηματικούς ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3, στην περίπτωση της δοκιμής 72 ωρών) των καλλιεργειών ελέγχου (βλ. προσάρτημα 1, σημείο "Συντελεστής μεταβολής") δεν πρέπει να υπερβαίνει το 35 %. Ο υπολογισμός του τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης περιγράφεται στο σημείο 49. Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται στη μέση τιμή των συντελεστών μεταβολής που υπολογίζεται για τις ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου.
 - Στις δοκιμές σε *Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus*, ο συντελεστής μεταβολής των μέσων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης ταυτόσημων καλλιεργειών ελέγχου σε όλη την περίοδο δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει το 7 %. Για άλλα είδη που χρησιμοποιούνται σπανιότερα στις δοκιμές, η αντίστοιχη τιμή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 %.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ring test) (1), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Το διχρωμικό κάλιο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως χημική ουσία αναφοράς για τα πράσινα φύκη. Είναι επιθυμητή η υποβολή της χημικής ουσίας αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον ανά εξάμηνο.

ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται με τη μεγαλύτερη ευχέρεια σε υδατοδιαλυτές ουσίες, οι οποίες είναι πιθανόν να παραμείνουν στο νερό υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Για τον έλεγχο πτητικών, ισχυρώς απορροφώμενων, έγχρωμων ή δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών ή χημικών ουσιών που μπορεί να επηρεάσουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ή ανόργανων στοιχείων στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, ενδέχεται να απαιτηθούν ορισμένες τροποποιήσεις της περιγραφόμενης διαδικασίας (π.χ. κλειστό σύστημα, εγκλιματισμός των δοκιμαστικών δοχείων). Καθοδήγηση σχετικά με ορισμένες κατάλληλες τροποποιήσεις παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) (3) και (4).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

14. Τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να είναι εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα στοιχεία του εξοπλισμού πρέπει να εκπλύνονται σχολαστικά, ώστε να εξασφαλίζεται η απουσία παρεμβολής οργανικών ή ανόργανων ξένων προσμειξέων στην ανάπτυξη των φυκών ή στη σύσταση των διαλυμάτων δοκιμής.

15. Κατά κανόνα, τα δοχεία δοκιμής είναι γυάλινες φιάλες, των οποίων οι διαστάσεις επιτρέπουν επαρκή όγκο καλλιέργειας για την εκτέλεση μετρήσεων στη διάρκεια της δοκιμής και επαρκή μεταφορά μάζας CO₂ από την ατμόσφαιρα (βλ. σημείο 30). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όγκος του υγρού πρέπει να επαρκεί για τους αναλυτικούς προσδιορισμούς (βλ. σημείο 37).
16. Επιπλέον, μπορεί να απαιτηθούν ορισμένα από τα ακόλουθα στοιχεία εξοπλισμού ή και όλα:
- Συσκευή καλλιέργειας: Συνιστάται η χρήση ερμαρίου ή θαλάμου, στο εσωτερικό του οποίου η επιλεγμένη θερμοκρασία επώασης μπορεί να διατηρείται στους ± 2 °C.
 - Φωτόμετρα: Αξίζει να επισημανθεί ότι η μέθοδος μέτρησης της φωτεινής έντασης, και ιδίως ο τύπος δέκτη (συλλέκτη), μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη τιμή. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται κατά προτίμηση με σφαιρικό (4 π) δέκτη (ο οποίος αποκρίνεται στο άμεσο και στο ανακλώμενο φως από όλες τις γωνίες πάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) ή με δέκτη 2 π (ο οποίος αποκρίνεται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες πάνω από το επίπεδο μέτρησης).
 - Εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της βιομάζας των φυκών: Ο αριθμός κυττάρων –η παράμετρος υποκατάστασης που χρησιμοποιείται συχνότερα για τη βιομάζα των φυκών– μπορεί να καταμετρηθεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μετρητή σωματιδίων, μικροσκοπίου με θάλαμο καταμέτρησης ή κυτταρόμετρου ροής. Άλλες παράμετροι υποκατάστασης για τη βιομάζα μπορούν να μετρηθούν με κυτταρόμετρο, φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο ή χρωματόμετρο. Είναι χρήσιμο να υπολογίζεται ο συντελεστής μετατροπής που συνδέει τον αριθμό κυττάρων με το ξηρό βάρος. Όταν χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο, ενδέχεται να απαιτούνται κυψελίδες οπτικής διαδρομής τουλάχιστον 4 cm, προκειμένου να λαμβάνονται χρήσιμες μετρήσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας.

Οργανισμοί δοκιμής

17. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη μη ενωμένων μικροφυκών και κυανοβακτηριδίων. Τα στελέχη που παρατίθενται στο προσάρτημα 2 έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για χρήση στη διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.
18. Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη, θα πρέπει να αναφέρεται το στέλεχος και/ή η προέλευση. Πρέπει να επιβεβαιώνεται η δυνατότητα διατήρησης της εκθετικής ανάπτυξης των επιλεγμένων φυκών δοκιμής σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής υπό τις επικρατούσες συνθήκες.

Θρεπτικό μέσο

19. Συνιστάται η χρήση δύο εναλλακτικών θρεπτικών μέσων: του μέσου του ΟΟΣΑ και του μέσου AAP. Η σύσταση αυτών των μέσων παρατίθεται στο προσάρτημα 3. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρχική τιμή του pH και η ρυθμιστική χωρητικότητα (ικανότητα ρύθμισης της αύξησης του pH) των δύο θρεπτικών μέσων είναι διαφορετικές. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δοκιμών ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο, ιδίως κατά τον έλεγχο ιοντιζόμενων ουσιών.
20. Η τροποποίηση των θρεπτικών μέσων ενδέχεται να είναι αναγκαία για ορισμένους σκοπούς, π.χ. για τον έλεγχο μετάλλων και παραγόντων χηλικής συμπλοκοποίησης ή για τη διεξαγωγή δοκιμών σε διαφορετικές τιμές pH. Η χρήση τροποποιημένου θρεπτικού μέσου πρέπει να περιγράφεται λεπτομερώς και να αιτιολογείται (3)(4).

Αρχική συγκέντρωση βιομάζας

21. Η αρχική βιομάζα πρέπει να είναι η ίδια σε όλες τις καλλιέργειες δοκιμής και αρκετά μικρή, ώστε να επιτρέπει την εκθετική ανάπτυξη σε όλη τη διάρκεια της περιόδου επώασης, χωρίς τον κίνδυνο να εξαντληθούν τα θρεπτικά στοιχεία. Η αρχική βιομάζα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5 mg/l σε ξηρό βάρος. Συνιστώνται οι ακόλουθες αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων:

Pseudokirchneriella subcapitata: $5 \times 10^3 - 10^4$ κύτταρα/ml

Desmodesmus subspicatus: $2-5 \times 10^3$ κύτταρα/ml

Navicula pelliculosa: 10^4 κύτταρα/ml

Anabaena flos-aquae: 10^4 κύτταρα/ml

Synechococcus leopoliensis: $5 \times 10^4 - 10^5$ κύτταρα/ml

Συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

22. Το εύρος συγκεντρώσεων στο οποίο είναι πιθανόν να σημειωθούν επιδράσεις μπορεί να προσδιοριστεί με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών προσδιορισμού του εύρους τιμών. Για την τελική και οριστική δοκιμή, θα πρέπει να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο, με λόγο προόδου που να μην υπερβαίνει το 3,2. Στην περίπτωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με επίπεδη καμπύλη απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση, ενδέχεται να δικαιολογείται υψηλότερος λόγος προόδου. Η σειρά των συγκεντρώσεων θα πρέπει κατά προτίμηση να καλύπτει το εύρος που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης των φυκών κατά 5-75 %.

Επαναλήψεις και μάρτυρες

23. Ο σχεδιασμός της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής μπορεί να τροποποιηθεί για να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των επαναλήψεων ανά συγκέντρωση. Οι επαναλήψεις για τον μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον τρεις και, ιδανικά, θα πρέπει να είναι διπλάσιες από τις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής.
24. Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί χωριστή σειρά διαλυμάτων δοκιμής για τον αναλυτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. σημεία 36 και 38).
25. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για τη διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ο σχεδιασμός της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει πρόσθετους μάρτυρες που να περιέχουν τον διαλύτη στην ίδια συγκέντρωση με εκείνη που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες δοκιμής.

Παρασκευή της ενοφθαλμισμένης καλλιέργειας

26. Για να προσαρμοστούν τα φύκη δοκιμής στις συνθήκες της δοκιμής και για να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όταν χρησιμοποιούνται για τον ενοφθαλμισμό των διαλυμάτων δοκιμής, παρασκευάζεται ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο δοκιμής 2-4 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Η βιομάζα των φυκών θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια να παρουσιάζει εκθετική ανάπτυξη μέχρι την έναρξη της δοκιμής. Η ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια επωάζεται υπό τις ίδιες συνθήκες με τις καλλιέργειες δοκιμής. Μετράται η αύξηση της βιομάζας στην ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια για να εξασφαλιστεί ότι η ανάπτυξη βρίσκεται στο φυσιολογικό πεδίο τιμών για το στέλεχος δοκιμής υπό τις συνθήκες καλλιέργειας. Παράδειγμα της διαδικασίας για την καλλιέργεια των φυκών παρέχεται στο προσάρτημα 4. Για να αποτρέπεται η σύγχρονη κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να απαιτείται ένα δεύτερο στάδιο πολλαπλασιασμού στην ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής

27. Όλα τα διαλύματα δοκιμής πρέπει να περιέχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις θρεπτικού μέσου και την ίδια αρχική βιομάζα φυκών δοκιμής. Τα διαλύματα δοκιμής με τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με την ανάμειξη ενός διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με θρεπτικό μέσο και ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια. Κατά κανόνα, τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάζονται με διάλυση της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.
28. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διαλύτες –π.χ. ακετόνη, t-βουτυλική αλκοόλη και διμεθυλοφορμαμίδιο– ως φορείς για την προσθήκη, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών (2)(3). Η συγκέντρωση του διαλύτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μl/l, ενώ θα πρέπει να προστίθεται διαλύτης στην ίδια συγκέντρωση σε όλες τις καλλιέργειες (συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών ελέγχου) της σειράς δοκιμών.

Επώαση

29. Τα δοχεία δοκιμής πωματίζονται με διαπερατά από τον αέρα πώματα. Τα δοχεία ανακινούνται και τοποθετούνται στη συσκευή καλλιέργειας. Κατά τη δοκιμή, είναι απαραίτητο να διατηρούνται τα φύκη σε εναιώρημα και να διευκολύνεται η μεταφορά CO₂. Για τον σκοπό αυτό, απαιτείται συνεχής ανατάραξη ή ανάδευση. Οι καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ 21 και 24 °C, με ανοχή ± 2 °C. Για είδη εκτός εκείνων που παρατίθενται στο προσάρτημα 2, π.χ. για τροπικά είδη, μπορεί να ενδείκνυται υψηλότερες θερμοκρασίες, υπό τον όρο ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Συνιστάται τυχαιοποιημένη τοποθέτηση των φιαλών στον επωαστήρα και καθημερινή αλλαγή των θέσεων τους.
30. Το pH του θρεπτικού μέσου ελέγχου δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Στην περίπτωση μετάλλων και χημικών ουσιών που ιοντίζονται εν μέρει σε τιμές pH γύρω από το pH της δοκιμής, ενδέχεται να είναι αναγκαίο να περιοριστεί η μεταβολή του pH, προκειμένου να ληφθούν αναπαραγώγιμα και σαφή αποτελέσματα. Μεταβολή του pH < 0,5 μονάδες είναι τεχνικά εφικτή και μπορεί να επιτευχθεί με την εξασφάλιση επαρκούς ταχύτητας μεταφοράς μάζας CO₂ από τον αέρα του περιβάλλοντος στο διάλυμα δοκιμής, π.χ. με αύξηση της ταχύτητας ανατάραξης. Άλλη δυνατότητα είναι η μείωση του απαιτούμενου CO₂ με μείωση της αρχικής βιομάζας ή της διάρκειας της δοκιμής.

31. Η επιφάνεια στην οποία επωάζονται οι καλλιέργειες θα πρέπει να φωτίζεται με συνεχές, ομοιόμορφο φως φθορισμού, π.χ. τύπου “ψυχρό λευκό φως” ή “φως ημέρας”. Τα στελέχη των φυκών και των κυανοβακτηριδίων έχουν διαφορετικές απαιτήσεις φωτός. Θα πρέπει να επιλέγεται η φωτεινή ένταση που είναι κατάλληλη για τον χρησιμοποιούμενο οργανισμό δοκιμής. Για τα συνιστώμενα είδη πράσινων φυκών, η φωτεινή ένταση στο επίπεδο των διαλυμάτων δοκιμής πρέπει να επιλέγεται από το εύρος τιμών $60-120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, μετρούμενη στο αποτελεσματικό από πλευράς φωτοσύνθεσης μήκος κύματος $400-700 \text{ nm}$ με κατάλληλο δέκτη. Ορισμένα είδη, ιδίως το *Anabaena flos-aquae*, αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε χαμηλότερη φωτεινή ένταση και μπορεί να υποστούν βλάβες σε υψηλή φωτεινή ένταση. Για τα είδη αυτά, θα πρέπει να επιλέγεται μέση φωτεινή ένταση από το εύρος τιμών $40-60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. (Στην περίπτωση φωτομέτρων που είναι βαθμονομημένα σε lux, το πεδίο τιμών $4\ 440-8\ 880 \text{ lux}$, προκειμένου για ψυχρό λευκό φως, αντιστοιχεί περίπου στη συνιστώμενη φωτεινή ένταση των $60-120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Η φωτεινή ένταση πρέπει να διατηρείται εντός $\pm 15 \%$ από τη μέση φωτεινή ένταση στην περιοχή επώασης.

Διάρκεια δοκιμής

32. Κατά κανόνα, η δοκιμή διαρκεί 72 ώρες. Ωστόσο, είναι δυνατόν να επιλέγονται μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, υπό τον όρο ότι πληρούνται όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 11.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

33. Η βιομάζα των φυκών σε κάθε φιάλη προσδιορίζεται τουλάχιστον κάθε ημέρα κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν οι μετρήσεις εκτελούνται σε μικρές ποσότητες που αφαιρούνται από το διάλυμα δοκιμής με σιφόνιο, οι τελευταίες δεν θα πρέπει να αναπληρώνονται.
34. Η βιομάζα μετράται με χειρωνακτική καταμέτρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο ή με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων (σε αριθμό κυττάρων και/ή βιοόγκο). Μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές τεχνικές, π.χ. κυτταρομετρία ροής, φθορισμός χλωροφύλλης *in vitro* ή *in vivo* (5)(6) ή οπτική πυκνότητα, εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ικανοποιητική συσχέτιση με τη βιομάζα στο εύρος των τιμών βιομάζας που σημειώνεται στη δοκιμή.
35. Το pH των διαλυμάτων μετράται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.
36. Εάν υπάρχει αναλυτική διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο χρησιμοποιούμενο εύρος συγκεντρώσεων, τα διαλύματα δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση ώστε να επαληθεύονται οι αρχικές συγκεντρώσεις και η διατήρηση των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη διάρκεια της δοκιμής.
37. Στις περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις έκθεσης είναι πιθανό να διαφέρουν από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά λιγότερο από 20 % στη διάρκεια της δοκιμής, ενδέχεται να αρκεί η ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, στο χαμηλό και στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και σε ένα επίπεδο κοντά στην αναμενόμενη EC_{50} . Συνιστάται η ανάλυση όλων των συγκεντρώσεων δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, όταν οι συγκεντρώσεις είναι απίθανο να παραμείνουν εντός των ορίων του 80-120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης. Προκειμένου για πηκτικές, ασταθείς ή ισχυρώς προσροφώμενες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, συνιστάται πρόσθετη δειγματοληψία για ανάλυση ανά 24 ώρες κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η απώλεια υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για τις συγκεκριμένες χημικές ουσίες ενδέχεται να χρειάζονται επιπλέον επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αρκεί να προσδιορίζονται μόνο σε ένα δοχείο επανάληψης για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνωνυμικό περιεχόμενο των δοχείων ανά επανάληψη).
38. Τα θρεπτικά μέσα δοκιμής που παρασκευάζονται ειδικά για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων έκθεσης κατά τη δοκιμή θα πρέπει να υποβάλλονται στην ίδια ακριβώς αγωγή όπως εκείνα που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή, δηλαδή να εμβολιάζονται με φύκη και να επωάζονται υπό πανομοιότυπες συνθήκες. Εάν απαιτείται ανάλυση της συγκέντρωσης της διαλυμένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ενδέχεται να είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός των φυκών από το θρεπτικό μέσο. Κατά προτίμηση, ο διαχωρισμός θα πρέπει να εκτελείται με φυγοκέντρηση σε χαμηλή ισχύ g, επαρκή για την καθίζηση των φυκών.
39. Εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης $\pm 20 \%$ σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασίζεται στις ονομαστικές ή τις μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση δεν βρίσκεται εντός του $\pm 20 \%$, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (3)(7).
40. Η δοκιμή αναστολής της ανάπτυξης φυκών είναι δυναμικότερο σύστημα δοκιμών από την πλειονότητα των υπόλοιπων δοκιμών βραχυπρόθεσμης τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι πραγματικές συγκεντρώσεις έκθεσης, ιδίως όταν ελέγχονται προσροφώμενες χημικές ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, η εξαφάνιση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το διάλυμα λόγω προσρόφησης στην αυξανόμενη βιομάζα φυκών δεν συνεπάγεται την απώλειά της από το σύστημα της δοκιμής. Κατά την ανάλυση του αποτελέσματος της δοκιμής, θα πρέπει να εξακριβώνεται κατά πόσον η μείωση της συγκέντρωσης της

υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην πορεία της δοκιμής συνοδεύεται από μείωση της αναστολής της ανάπτυξης. Εάν συμβαίνει αυτό, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο να εφαρμοστεί κατάλληλο μοντέλο που να περιγράφει τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (7). Εάν δεν συμβαίνει αυτό, μπορεί να ενδείκνυται να βασίζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων στις αρχικές (ονομαστικές ή μετρηθείσες) συγκεντρώσεις.

Άλλες παρατηρήσεις

41. Θα πρέπει να εκτελείται μικροσκοπική παρατήρηση ώστε να επαληθεύεται η φυσιολογική και υγιής εμφάνιση της ενοφθαλμισμένης καλλιέργειας και να εντοπίζονται τυχόν ανωμαλίες στην εμφάνιση των φυκών (οι οποίες έχουν ενδεχομένως προκληθεί από την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία) στο τέλος της δοκιμής.

Οριακή δοκιμή

42. Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή έχει προκύψει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 µg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξάγεται οριακή δοκιμή, η οποία συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας ελέγχου και μιας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 µg/l ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένδερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, με εξαίρεση τον αριθμό των επαναλήψεων αγωγής, που θα πρέπει να είναι τουλάχιστον έξι. Οι μεταβλητές απόκρισης της ομάδας ελέγχου και της ομάδας αγωγής μπορούν να αναλυθούν με στατιστική δοκιμή σύγκρισης των μέσων όρων, π.χ. δοκιμασία t του Student. Εάν οι διασπορές στις δύο ομάδες είναι άνισες, θα πρέπει να διεξάγεται προσαρμοσμένη δοκιμασία t για άνισες διασπορές.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χάραξη καμπυλών ανάπτυξης

43. Η βιομάζα των δοχείων δοκιμής μπορεί να εκφράζεται σε μονάδες της παραμέτρου υποκατάστασης που έχει χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις (π.χ. αριθμός κυττάρων, φθορισμός).
44. Καταχωρίζονται σε πίνακα οι εκτιμώμενες συγκεντρώσεις βιομάζας στις καλλιέργειες δοκιμής και στους μάρτυρες, καθώς και οι συγκεντρώσεις του υλικού δοκιμής και οι χρόνοι μέτρησης, τουλάχιστον σε ακέραιες ώρες, για τη χάραξη των καμπυλών ανάπτυξης. Στο πρώτο αυτό στάδιο μπορεί να φανούν χρήσιμες τόσο η λογαριθμική όσο και η γραμμική κλίμακα, αλλά η λογαριθμική κλίμακα είναι υποχρεωτική και, γενικά, παρουσιάζει ακριβέστερα τις μεταβολές του τύπου ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Σημειωτέον ότι το λογαριθμικό διάγραμμα της εκθετικής ανάπτυξης έχει τη μορφή ευθείας γραμμής, της οποίας η κλίση παρέχει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.
45. Με τη βοήθεια των διαγραμμάτων, εξετάζεται αν η ανάπτυξη στις καλλιέργειες ελέγχου είναι εκθετική με τον αναμενόμενο ρυθμό σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εξετάζονται με κριτικό πνεύμα όλα τα σημεία δεδομένων, καθώς και η εμφάνιση των διαγραμμάτων και ελέγχεται η πιθανότητα σφάλματος στα ανεπεξέργαστα δεδομένα και στις διαδικασίες. Ειδικότερα, ελέγχονται τα σημεία δεδομένων που φαίνεται να αποκλίνουν λόγω συστηματικού σφάλματος. Εάν είναι προφανές ότι μπορούν να εντοπιστούν λάθη στη διαδικασία και/ή να θεωρηθούν εξαιρετικά πιθανά, τα αντίστοιχα σημεία δεδομένων σημειώνονται ως ακραίες τιμές και δεν λαμβάνονται υπόψη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση. (Η μηδενική συγκέντρωση φυκών σε ένα από τα δύο ή τρία δοχεία επανάληψης μπορεί να υποδηλώνει εσφαλμένο εμβολιασμό ή ελλιπή καθαρισμό του δοχείου). Στην έκθεση δοκιμής πρέπει να αναφέρονται επακριβώς οι λόγοι απόρριψης ενός σημείου δεδομένων ως ακραίας τιμής. Αποδεκτοί λόγοι είναι μόνο τα (σπάνια) λάθη στη διαδικασία και όχι απλώς ο χαμηλός βαθμός ακρίβειας. Οι στατιστικές διαδικασίες για τον εντοπισμό των ακραίων τιμών έχουν περιορισμένη χρησιμότητα στην επίλυση προβλημάτων αυτού του είδους και δεν μπορούν να υποκαταστήσουν την κρίση του ειδικού. Οι ακραίες τιμές (που σημειώνονται ως τέτοιες) θα πρέπει κατά προτίμηση να συμπεριλαμβάνονται στα σημεία δεδομένων που απεικονίζονται μεταγενέστερα σε γραφικές παραστάσεις ή πίνακες.

Μεταβλητές απόκρισης

46. Σκοπός της δοκιμής είναι να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην ανάπτυξη φυκών. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, ώστε να ανταποκρίνονται στις διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες των κρατών μελών. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.
 - α) Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης υπολογίζεται με βάση τη λογαριθμική αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια της δοκιμής, εκφραζόμενη ανά ημέρα.
 - β) Απόδοση: Αυτή η μεταβλητή απόκρισης αντιστοιχεί στη βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα.

47. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με τη χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εφόσον τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι τιμές E_{C_x} που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ($E_r C_x$) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασίζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα ($E_y C_x$), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά των τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό εκθετικό τύπο ανάπτυξης των φυκών σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ή από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ή από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις άλλες προαναφερόμενες μεταβλητές. Η $E_y C_x$ εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους φυκών που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών στελεχών φυκών. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας σε τοξικούς παράγοντες μεταξύ ειδών φυκών ή ακόμα και μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.

Μέσος ρυθμός ανάπτυξης

48. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας από την ακόλουθη εξίσωση, η οποία εφαρμόζεται σε κάθε ένα από τα δοχεία ελέγχου και τα δοχεία αγωγής:

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

όπου:

μ_{i-j} = ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j ,

X_i = η βιομάζα σε χρόνο i , και

X_j = η βιομάζα σε χρόνο j .

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα ελέγχου υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

49. Υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (κατά κανόνα, ημέρες 0-3), με χρήση της ονομαστικής ενοφθαλμισμένης βιομάζας ως αρχικής τιμής και όχι της μετρηθείσας αρχικής τιμής, επειδή με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται συνήθως μεγαλύτερη ακρίβεια. Εάν ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της βιομάζας επιτρέπει τον αρκούντως ακριβή προσδιορισμό της μικρής βιομάζας ενοφθαλμισμένου (π.χ. κυτταρόμετρο ροής), μπορεί να χρησιμοποιείται η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση βιομάζας. Υπολογίζεται επίσης ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης, ως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για κάθε ημέρα της περιόδου δοκιμής (ημέρες 0-1, 1-2 και 2-3) και εξετάζεται αν ο ρυθμός ανάπτυξης των μαρτύρων παραμένει σταθερός (βλ. κριτήρια εγκυρότητας στο σημείο 11). Εάν την πρώτη ημέρα διαπιστωθεί ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σημαντικά χαμηλότερος από τον συνολικό μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη λανθάνουσας φάσης. Ενώ στις καλλιέργειες ελέγχου η λανθάνουσα φάση μπορεί να ελαχιστοποιείται και, πρακτικά, να εξαλείφεται με κατάλληλο πολλαπλασιασμό της προκαλλιέργειας, η λανθάνουσα φάση στις εκτιθέμενες καλλιέργειες μπορεί να υποδηλώνει ανάκαμψη μετά το πρώτο τοξικό στρες ή ελαττωμένη έκθεση λόγω απώλειας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (όπου συμπεριλαμβάνεται η ρόφηση στη βιομάζα φυκών) μετά την αρχική έκθεση. Ως εκ τούτου, για την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, μπορεί να υπολογιστεί ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης. Οι ουσιαστικές διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης.

50. Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης για κάθε επανάληψη αγωγής από την εξίσωση [2]:

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

όπου:

$%I_T$ = η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,

μ_c = η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ) στην ομάδα ελέγχου,

μ_T = ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στην επανάληψη αγωγής.

51. Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής, πρέπει να χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς της εκατοστιαίας αναστολής οι μάρτυρες με διαλύτη και όχι οι μάρτυρες χωρίς διαλύτη.

Απόδοση

52. Η απόδοση υπολογίζεται ως η βιομάζα στο τέλος της δοκιμής μείον την αρχική βιομάζα για κάθε μεμονωμένο δοχείο ελέγχου και δοχείο αγωγής. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνδεδεόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης ($% I_y$) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε επανάληψη αγωγής από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

$% I_y$ = η εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης,

Y_T = η μέση τιμή της απόδοσης στην ομάδα ελέγχου,

Y_T = η τιμή της απόδοσης στην επανάληψη αγωγής.

Χάραξη της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης

53. Σχεδιάζεται διάγραμμα της εκατοστιαίας αναστολής σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Το διάγραμμα αυτό εξετάζεται ενδελεχώς και απορρίπτονται τα σημεία δεδομένων που ενδεχομένως σημειώθηκαν ως ακραίες τιμές κατά το πρώτο στάδιο. Συνδέονται τα σημεία δεδομένων με ομαλή γραμμή, με το μάτι ή με παρεμβολή με τη βοήθεια υπολογιστή, ώστε να ληφθεί μια πρώτη εικόνα της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται λεπτομερέστερη μέθοδος, κατά προτίμηση στατιστική μέθοδος με τη χρήση υπολογιστή. Ανάλογα με τη σκοπούμενη χρήση, την ποιότητα (ακρίβεια) και τον όγκο των δεδομένων, καθώς και με τη διαθεσιμότητα εργαλείων ανάλυσης δεδομένων, είναι δυνατόν να αποφασιστεί (μερικές φορές, μάλιστα, δικαιολογείται απόλυτα) να τερματιστεί η ανάλυση των δεδομένων στο στάδιο αυτό και απλώς να ληφθούν οι βασικές τιμές EC_{50} και EC_{10} (και/ή EC_{20}) από την προσαρμοσμένη με το μάτι καμπύλη (βλ. επίσης το σημείο κατωτέρω σχετικά με τις διεγερτικές επιδράσεις). Βάσιμοι λόγοι για τη μη εφαρμογή στατιστικής μεθόδου μπορούν να είναι, μεταξύ άλλων, οι εξής:

- Τα δεδομένα δεν είναι κατάλληλα ώστε, εάν εφαρμόζονταν μέθοδοι με τη χρήση υπολογιστή, να παράγαν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από εκείνα που δίνει η κρίση του ειδικού. Στις περιπτώσεις αυτές, μάλιστα, ορισμένα προγράμματα υπολογιστή ενδέχεται να μην προσφέρουν καν αξιόπιστη λύση (οι επαναληπτικές διαδικασίες μπορεί να μην συγκλίνουν κ.λπ.).
- Οι αποκρίσεις ανάπτυξης που οφείλονται σε διέγερση δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν επαρκώς με τη χρήση των διαθέσιμων προγραμμάτων υπολογιστή (βλ. κατωτέρω).

Στατιστικές διαδικασίες

54. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, μετά από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης –π.χ. σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (8)–, αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθύνθουν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (8). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πρότυπες μέθοδοι ανάλυσης με τη χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται ώστε να μπορούν να εφαρμόζονται σε δεδομένα ανάπτυξης ή βιομάζας. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (9), (10) και (11). Η χρήση της ανάλυσης μη γραμμικής παλινδρόμησης περιγράφεται λεπτομερέστερα στο προσάρτημα 5.

55. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x . Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής. Ωστόσο, εάν η μη γραμμική προσαρμογή καμπύλης είναι δύσκολη ή ανέφικτη, λόγω υπερβολικής σκεδαστικότητας των δεδομένων, το πρόβλημα μπορεί να παρακαμφθεί με την εφαρμογή της παλινδρόμησης στους μέσους όρους των ομάδων ως πρακτικό μέσο περιορισμού της επιρροής των ύποπτων ακραίων τιμών. Η χρήση αυτής της εναλλακτικής επιλογής θα πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση δοκιμής ως παρέκκλιση από την κανονική διαδικασία, οφειλόμενη στο γεγονός ότι η προσαρμογή της καμπύλης με τις τιμές των επιμέρους επαναλήψεων δεν απέδωσε ικανοποιητικό αποτέλεσμα.
56. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να ληφθούν εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (13).
57. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση της NOEC, όσον αφορά τις επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον ρυθμό ανάπτυξης, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με τεχνικές ανάλυσης της διασποράς (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμασία Dunnett ή η δοκιμασία Williams (12)(14)(15)(16)(17). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διασπορά. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (17). Κατάλληλες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία Levene και η δοκιμασία Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως ο έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (11).
58. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε φύκη. Φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης) και, κατά προτίμηση, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20} .

Διέγερση της ανάπτυξης

59. Μερικές φορές παρατηρείται διέγερση της ανάπτυξης (αρνητική αναστολή) σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε όρμηση ("τοξική διέγερση") είτε στην προσθήκη διεγερτικών αυξητικών παραγόντων, μέσω του υλικού δοκιμής, στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται. Σημειώτεον ότι η προσθήκη ανόργανων θρεπτικών στοιχείων δεν προβλέπεται να έχει άμεση επίδραση, επειδή το θρεπτικό μέσο δοκιμής διατηρεί περίσσεια θρεπτικών στοιχείων σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Εάν η διέγερση σε χαμηλή δόση δεν είναι ακραία, συνήθως μπορεί να αγνοηθεί στους υπολογισμούς της EC_{50} . Ωστόσο, εάν είναι ακραία ή εάν πρόκειται να υπολογιστεί τιμή EC_x για χαμηλή τιμή του x , ενδέχεται να χρειαστούν ειδικές διαδικασίες. Η απαλοιφή των αποκρίσεων διέγερσης από την ανάλυση δεδομένων πρέπει, κατά το δυνατόν, να αποφεύγεται και, εάν το διαθέσιμο λογισμικό προσαρμογής καμπυλών δεν μπορεί να δεχθεί ελάσσονα διέγερση, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap. Σε περίπτωση ακραίας διέγερσης, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλου όρμησης (18).

Μη τοξική αναστολή της ανάπτυξης

60. Τα υλικά δοκιμής που απορροφούν το φως μπορούν να προκαλέσουν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, επειδή η σκίαση περιορίζει τη διαθέσιμη ποσότητα φωτός. Αυτά τα είδη επιδράσεων, που οφείλονται σε φυσικά αίτια, θα πρέπει να διαχωρίζονται από τις τοξικές επιδράσεις με τροποποίηση των συνθηκών δοκιμής και να αναφέρονται χωριστά. Σχετική καθοδήγηση παρέχεται στις δημοσιεύσεις (2) και (3).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

61. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- φυσική υπόσταση και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας·
- δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας (προσομείξεις).

Υπό δοκιμή είδος:

- στέλεχος, προμηθευτής ή πηγή και χρησιμοποιηθείσες συνθήκες καλλιέργειας.

Συνθήκες δοκιμής:

- ημερομηνία έναρξης της δοκιμής και διάρκεια της δοκιμής·
- περιγραφή του σχεδιασμού της δοκιμής: δοχεία δοκιμής, όγκοι καλλιιεργειών, πυκνότητα βιομάζας στην αρχή της δοκιμής·
- σύνθεση του θρεπτικού μέσου·
- συγκεντρώσεις δοκιμής και επαναλήψεις (π.χ. αριθμός επαναλήψεων, αριθμός συγκεντρώσεων δοκιμής και χρησιμοποιηθείσα γεωμετρική πρόοδος)·
- περιγραφή της παρασκευής των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης διαλυτών κ.λπ·
- συσκευή καλλιέργειας·
- φωτεινή ένταση και ποιότητα του φωτός (πηγή, ομοιογένεια)·
- θερμοκρασία·
- ελεγχθείσες συγκεντρώσεις: ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής και τυχόν αποτελέσματα των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Θα πρέπει επίσης να αναφέρονται η απόδοση ανάκτησης της μεθόδου και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού στη μήτρα δοκιμής·
- όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών·
- μέθοδος προσδιορισμού της βιομάζας και απόδειξη συσχέτισης της μετρούμενης παραμέτρου με το ξηρό βάρος.

Αποτελέσματα:

- τιμές pH στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σε κάθε αγωγή·
- βιομάζα κάθε φιάλης σε κάθε σημείο μέτρησης και μέθοδος μέτρησης της βιομάζας·
- καμπύλες ανάπτυξης (διάγραμμα της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου)·
- υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τις επαναλήψεις·
- γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης·
- εκτιμήσεις της τοξικότητας για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και NOEC, εφόσον έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό·
- εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά)·
- διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο αγωγής·
- τυχόν άλλες παρατηρηθείσες επιδράσεις, π.χ. μορφολογικές μεταβολές στα φύκη·
- συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης τυχόν επιρροής ως προς την έκβαση της δοκιμής λόγω παρακλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test (Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 8692: Ποιότητα νερού — Δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης αλγών γλυκού νερού με μονοκυτταρικές πράσινες άλγες).
- (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 waster 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, Παρίσι.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples (ΕΛΟΤ ISO 5667-16 Ποιότητα νερού — Δειγματοληψία — Μέρος 16: Καθοδήγηση για βιοδοκιμασίες δειγμάτων).

- (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) Slovacey, 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, Παρίσι.
 - (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, Νέα Υόρκη.
 - (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.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός, εκφραζόμενο ως προς δεδομένο όγκο, π.χ. της φυκών/λίτρο διαλύματος δοκιμής. Η βιομάζα ορίζεται συνήθως ως μάζα, αλλά στην παρούσα μέθοδο δοκιμών η λέξη αυτή χρησιμοποιείται για να δηλώσει μάζα ανά όγκο. Επίσης, στην παρούσα δοκιμή μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός κυττάρων, ο φθορισμός κ.λπ. Ως εκ τούτου, ο όρος “βιομάζα” αναφέρεται και σε αυτά τα μέτρα υποκατάστασης.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Συντελεστής μεταβολής: αδιάστατο μέτρο της μεταβλητότητας μιας παραμέτρου, το οποίο ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς τον μέσο όρο. Μπορεί επίσης να εκφραστεί σε ποσοστό επί τοις εκατό. Η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης σε ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

1. Υπολογίζεται ο επί τοις εκατό συντελεστής μεταβολής του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τους ημερήσιους/τμηματικούς ρυθμούς ανάπτυξης για καθεμία από τις ταυτόσημες καλλιέργειες.
2. Εξάγεται ο μέσος όρος όλων των τιμών που υπολογίστηκαν στο σημείο 1, ώστε να προκύψει η μέση τιμή του συντελεστή μεταβολής του ημερήσιου/τμηματικού ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στις ταυτόσημες καλλιέργειες ελέγχου.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του οργανισμού δοκιμής κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιείται το σύμβολο “E_xC” για τον ρυθμό ανάπτυξης και το σύμβολο “E_xC” για την απόδοση.

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης: το πλήρες συνθετικό μέσο καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσονται τα φύκη δοκιμής, όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της χημικής ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγηθεί πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ'επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η συγκέντρωση δοκιμής που είναι αμέσως μικρότερη από τη LOEC.

Μεταβλητή απόκρισης: μεταβλητή για την εκτίμηση της τοξικότητας, η οποία προκύπτει, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από κάθε μετρούμενη παράμετρο που περιγράφει τη βιομάζα. Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών, οι ρυθμοί ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από τη μέτρηση της βιομάζας απευθείας ή μέσω οποιασδήποτε από τις αναφερόμενες παραμέτρους υποκατάστασης.

Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης: μεταβλητή απόκρισης η οποία ορίζεται ως το ηλικίο της διαφοράς των φυσικών λογαριθμών μιας παρατηρούμενης παραμέτρου (στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, της βιομάζας) προς το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Απόδοση: η τιμή μετρούμενης μεταβλητής στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης, διαφορά που εκφράζει την αύξηση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Προσάρτημα 2

ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΔΕΙΧΘΕΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Πράσινα φύκη

Pseudokirchneriella subcapitata (παλαιότερα γνωστό ως *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (παλαιότερα γνωστό ως *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Διάτομα

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Κυανοβακτηρίδια

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Πηγές στελεχών

Τα συνιστώμενα στελέχη διατίθενται ως μονοκαλλιέργειες φυκών από τις ακόλουθες συλλογές (με αλφαβητική σειρά):

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

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

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

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
ΗΠΑ.

Εμφάνιση και χαρακτηριστικά των συνιστώμενων ειδών

| | <i>P. subcapitata</i> | <i>D. subspicatus</i> | <i>N. pelliculosa</i> | <i>A. flos-aquae</i> | <i>S. leopoliensis</i> |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Εμφάνιση | Καμπύλα, συστραμμένα μεμονωμένα κύτταρα | Ωοειδή, ως επί το πλείστον μεμονωμένα κύτταρα | Ράβδοι ή βέργες | Αλυσίδες ωοειδών κυττάρων | Ράβδοι ή βέργες |
| Διαστάσεις (μήκος × πλάτος) μm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Κυτταρικός όγκος (μm ³ /κύτταρο) | 40-60 ⁽¹⁾ | 60-80 ⁽¹⁾ | 40-50 ⁽¹⁾ | 30-40 ⁽¹⁾ | 2,5 ⁽²⁾ |
| Κυτταρικό ξηρό βάρος (mg/κύτταρο) | 2-3 × 10 ⁻⁸ | 3-4 × 10 ⁻⁸ | 3-4 × 10 ⁻⁸ | 1-2 × 10 ⁻⁸ | 2-3 × 10 ⁻⁹ |
| Ρυθμός ανάπτυξης ⁽³⁾ (ημέρα ⁻¹) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0 – 2,4 |

⁽¹⁾ Μετρούμενος με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων

⁽²⁾ Υπολογιζόμενος από τις διαστάσεις

⁽³⁾ Ο συνηθέστερα παρατηρούμενος ρυθμός ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο του ΟΟΣΑ, με φωτεινή ένταση περίπου 70 μE m⁻² s⁻¹ και σε θερμοκρασία 21 °C

Ειδικές συστάσεις για την καλλιέργεια και τον χειρισμό των συνιστώμενων για τη δοκιμή ειδών***Pseudokirchneriella subcapitata* και *Desmodesmus subspicatus***

Τα συγκεκριμένα πράσινα φύκη είναι γενικά εύκολο να διατηρηθούν σε διάφορα μέσα καλλιέργειας. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα διατίθενται από τις συλλογές καλλιεργείων. Τα κύτταρα είναι κατά κανόνα μεμονωμένα, ενώ η κυτταρική πυκνότητα μπορεί να μετρηθεί εύκολα με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων ή μικροσκόπιο.

Anabaena flos-aquae

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιεργείων. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μην αφήνεται η ασυνεχής καλλιέργεια να αναπτυχθεί πέραν της λογαριθμικής φάσης κατά την ανανέωση, επειδή η ανάκτηση είναι δύσκολη στο σημείο αυτό.

Το *Anabaena flos-aquae* σχηματίζει συσσωματώματα από επικαλυπτόμενες αλυσίδες κυττάρων. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυτών μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Όταν χρησιμοποιείται μικροσκοπική καταμέτρηση ή ηλεκτρονικός μετρητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ενδέχεται να απαιτείται θραύση των εν λόγω συσσωματωμάτων.

Για τη θραύση των αλυσίδων, προκειμένου να μειωθεί η μεταβλητότητα του αριθμού κυττάρων, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η επίδραση ηχητικών κυμάτων. Η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το απαιτούμενο για τη θραύση των αλυσίδων σε μικρότερα τεμάχια είναι δυνατόν να καταστρέψει τα κύτταρα. Η ένταση των ηχητικών κυμάτων και η διάρκεια της επίδρασής τους πρέπει να είναι πανομοιότυπες σε κάθε αγωγή.

Καταμετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο αρκετά πεδία (τουλάχιστον 400 κύτταρα) για να διευκολυνθεί η αντιστάθμιση της μεταβλητότητας. Με τον τρόπο αυτό, βελτιώνεται η αξιοπιστία των μικροσκοπικών προσδιορισμών της πυκνότητας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρονικός μετρητής σωματιδίων για τον προσδιορισμό του συνολικού κυτταρικού όγκου των φυκών *Anabaena* μετά τη θραύση των αλυσίδων κυττάρων με επιμελή εφαρμογή ηχητικών κυμάτων. Η ενέργεια των ηχητικών κυμάτων πρέπει να ρυθμίζεται, ώστε να αποτρέπεται η διάρρηξη των κυττάρων.

Χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας (vortex) ή ανάλογη κατάλληλη μέθοδος για να εξασφαλιστούν η καλή ανάμειξη και η ομοιογένεια του εναιωρήματος φυκών με το οποίο εμβολιάζονται τα δοχεία δοκιμής.

Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να τοποθετούνται σε περιστροφικές ή παλινδρομικές τράπεζες ανακίνησης, ρυθμισμένες σε ταχύτητα περίπου 150 στροφών ανά λεπτό. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η περιοδική ανακίνηση, προκειμένου να περιορίζεται η τάση του *Anabaena* να σχηματίζει συστάδες. Εάν σχηματιστούν συστάδες, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα δείγματα για τις μετρήσεις της βιομάζας να είναι αντιπροσωπευτικά. Για τη διάσπαση των συστάδων των φυκών, μπορεί να χρειαστεί ζωηρή ανακίνηση πριν από τη δειγματοληψία.

Synechococcus leopoliensis

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα παρέχονται από τις συλλογές καλλιιεργειών.

Το *Synechococcus leopoliensis* αναπτύσσεται σε μεμονωμένα ραβδοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα είναι πολύ μικρά, γεγονός που περιπλέκει τη χρήση μικροσκοπικής καταμέτρησης για τον προσδιορισμό της βιομάζας. Οι ηλεκτρονικοί μετρητές σωματιδίων που είναι κατάλληλα εξοπλισμένοι για την καταμέτρηση σωματιδίων μεγέθους περίπου 1 μm είναι χρήσιμοι. Μπορούν επίσης να εφαρμοστούν μετρήσεις φθορισμού *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορα θρεπτικά μέσα για τη διατήρηση μητρικών καλλιιεργειών. Πληροφορίες σχετικά με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα παρέχονται από τις συλλογές καλλιιεργειών. Σημειωτέον ότι το θρεπτικό μέσο απαιτείται να περιέχει πυριτικό άλας.

Το *Navicula pelliculosa* ενδέχεται να σχηματίζει συσσωματώματα υπό ορισμένες συνθήκες καλλιιεργειας. Λόγω της παραγωγής λιπιδίων, τα κύτταρα των φυκών τείνουν μερικές φορές να συσσωρεύονται στο επιφανειακό υμένιο. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να εφαρμόζονται ειδικά μέτρα κατά τη λήψη των επιμέρους δειγμάτων για τον προσδιορισμό της βιομάζας, ώστε τα δείγματα που λαμβάνονται να είναι αντιπροσωπευτικά. Ενδέχεται να απαιτείται ζωηρή ανατάραξη, π.χ. με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

Προσάρτημα 3

Θρεπτικά μέσα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα από τα ακόλουθα δύο θρεπτικά μέσα:

- Το θρεπτικό μέσο του ΟΟΣΑ: το πρωτότυπο θρεπτικό μέσο της κατευθυντήριας γραμμής TG 201 του ΟΟΣΑ, σύμφωνα επίσης με το πρότυπο ISO 8692.
- Το θρεπτικό μέσο AAP της EPA (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ), σύμφωνα επίσης με την ASTM.

Κατά την παρασκευή των ανωτέρω θρεπτικών μέσων πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Σύνθεση του θρεπτικού μέσου AAP (US EPA) και του θρεπτικού μέσου της TG 201 του ΟΟΣΑ

| Συστατικό | AAP | | ΟΟΣΑ | |
|--------------------------------------------------------|----------|------------|---------|------------|
| | mg/l | mM | mg/l | mM |
| 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 | |

Η μοριακή αναλογία του EDTA προς τον σίδηρο υπερβαίνει ελαφρά τη μονάδα. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η καθίζηση σιδήρου και, ταυτόχρονα, ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων των ιόντων βαρέων μετάλλων.

Στη δοκιμή με το διάτομο *Navicula pelliculosa* πρέπει να προστίθεται $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ και στα δύο θρεπτικά μέσα, ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 1,4 mg Si/l.

Το pH του θρεπτικού μέσου επιτυγχάνεται στην κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του ανθρακικού συστήματος του μέσου και της μερικής πίεσης του CO_2 στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το pH στους 25 °C συνδέεται, κατά προσέγγιση, με τη μοριακή συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων με τη σχέση:

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

Με 15 mg NaHCO_3/l επιτυγχάνεται $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (θρεπτικό μέσο US EPA) και με 50 mg NaHCO_3/l επιτυγχάνεται $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (θρεπτικό μέσο ΟΟΣΑ).

Στοιχειακή σύνθεση των θρεπτικών μέσων δοκιμής

| Στοιχείο | AAP mg/l | ΟΟΣΑ 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 |

Παρασκευή του θρεπτικού μέσου του ΟΟΣΑ

| Θρεπτικό στοιχείο | Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης 1: μακροθρεπτικά συστατικά | |
| 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 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 2: σίδηρος | |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 64 mg/l |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 100 mg/l |

| Θρεπτικό στοιχείο | Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης 3: ιχνοστοιχεία | |
| H ₃ BO ₃ | 185 mg/l |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 415 mg/l |
| ZnCl ₂ | 3 mg/l |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 1,5 mg/l |
| CuCl ₂ · 2H ₂ O | 0,01 mg/l |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 7 mg/l |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 4: όξινο ανθρακικό άλας | |
| NaHCO ₃ | 50 g/l |
| Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O | |

Τα διαλύματα παρακαταθήκης αποστειρώνονται με διήθηση μέσω μεμβράνης (μέση διάμετρος πόρων 0,2 μm) ή σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά). Τα διαλύματα φυλάσσονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 4 °C.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης 2 και 4 πρέπει να μην αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο αλλά με διήθηση μέσω μεμβράνης.

Παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο με την προσθήκη κατάλληλου όγκου των διαλυμάτων παρακαταθήκης 1-4 σε νερό:

Σε 500 ml αποστειρωμένου νερού προστίθενται:

10 ml διαλύματος παρακαταθήκης 1

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 2

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 3

1 ml διαλύματος παρακαταθήκης 4

Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με αποστειρωμένο νερό.

Το θρεπτικό μέσο αφήνεται να φθάσει σε κατάσταση ισορροπίας με το ατμοσφαιρικό CO₂ για επαρκή χρόνο — εάν είναι απαραίτητο, με τη διοχέτευση φυσαλίδων στείρου φιλτραρισμένου αέρα για μερικές ώρες.

Παρασκευή του θρεπτικού μέσου US EPA

- Σε περίπου 900 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού προστίθεται 1 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης 2.1–2.7 και το σύνολο αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.
- Τα διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζονται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Τα αντιδραστήρια 2.1, 2.2, 2.3 και 2.4 είναι δυνατόν να συνδυαστούν σε ένα ενιαίο διάλυμα παρακαταθήκης.

2.1 NaNO₃ 12,750 g.

2.2 MgCl₂ · 6H₂O 6,082 g.

- | | | |
|-----|----------------------------------------------------------|-----------------|
| 2.3 | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,205 g. |
| 2.4 | Διάλυμα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών (βλ. 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 | $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | Βλ. σημείωση 1. |

Σημείωση 1: Χρησιμοποιείται μόνο για τα είδη διατόμων. Μπορεί να προστίθεται κατευθείαν (202,4 mg) ή μέσω διαλύματος παρακαταθήκης, κατά τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση Si στο θρεπτικό μέσο να είναι 20 mg/l.

3. Το διάλυμα παρακαταθήκης μικροθρεπτικών συστατικών παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων ουσιών σε 500 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού:

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 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. [(αιθυλενοδιητρίλο)τετραοξικό νάτριο]. |
| 3.9 | $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,005 mg Βλ. σημείωση 2. |

Σημείωση 2: Χρησιμοποιείται μόνο στο θρεπτικό μέσο για μητρικές καλλιέργειες ειδών διατόμων.

4. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή $7,5 \pm 0,1$ με διάλυμα NaOH ή HCl 0,1 N ή 1,0 N.
5. Το θρεπτικό μέσο διηθείται σε στείρο υποδοχέα μέσω είτε διηθητικής μεμβράνης των 0,22μm, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετρητής σωματιδίων, είτε ηθμού των 0,45μm, εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετρητής σωματιδίων.
6. Το θρεπτικό μέσο φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία περίπου 4 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Προσάρτημα 4

Παράδειγμα διαδικασίας για την καλλιέργεια φυκών**Γενικές παρατηρήσεις**

Σκοπός της καλλιέργειας με την ακόλουθη διαδικασία είναι να ληφθούν καλλιέργειες φυκών για δοκιμές τοξικότητας.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι, ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες φυκών δεν θα μολυνθούν από βακτηρίδια. Μπορεί να είναι επιθυμητές οι αξενικές (χωρίς παρουσία ξένων οργανισμών) καλλιέργειες, αλλά πρέπει να παρασκευάζονται και να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες φυκών.

Όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται υπό στείρες συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση με βακτηρίδια και άλλα φύκη.

Εξοπλισμός και υλικά

Βλ. μέθοδο δοκιμών: σημείο “Εργαστηριακός εξοπλισμός”.

Διαδικασίες για τη λήψη καλλιεργειών φυκών

Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων (θρεπτικών μέσων):

Όλα τα θρεπτικά άλατα του θρεπτικού μέσου παρασκευάζονται ως συμπυκνωμένα διαλύματα παρακαταθήκης και αποθηκεύονται στο σκοτάδι και υπό ψύξη. Τα διαλύματα αυτά αποστειρώνονται με διήθηση ή σε αυτόκαυστο.

Το θρεπτικό μέσο παρασκευάζεται με την προσθήκη της ενδεδειγμένης ποσότητας διαλύματος παρακαταθήκης σε στείρο απεσταγμένο νερό, με μέριμνα για την αποφυγή μολύνσεων. Όταν πρόκειται για στερεό μέσο, προστίθεται άγαρ σε αναλογία 0,8 τοις εκατό.

Μητρική καλλιέργεια:

Οι μητρικές καλλιέργειες είναι μικρές καλλιέργειες φυκών που μεταφέρονται τακτικά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο για να δράσουν ως αρχικό υλικό δοκιμής. Εάν οι καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται τακτικά, φέρονται σε σωλήνες με άγαρ υπό κλίση. Μεταφέρονται σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο τουλάχιστον ανά διμήνο.

Οι μητρικές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό μέσο (όγκος περίπου 100 ml). Όταν τα φύκη επωάζονται στους 20 °C με συνεχή φωτισμό, απαιτείται μεταφορά μία φορά την εβδομάδα.

Κατά τη μεταφορά, ποσότητα “παλαιάς” καλλιέργειας μεταφέρεται με αποστειρωμένα σιφόνια σε φιάλη με πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο, έτσι ώστε με τα είδη ταχείας ανάπτυξης η αρχική συγκέντρωση να είναι περίπου 100 φορές μικρότερη από ό,τι στην παλαιά καλλιέργεια.

Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός είδους μπορεί να προσδιοριστεί από την καμπύλη ανάπτυξης. Εάν αυτή είναι γνωστή, μπορεί να εκτιμηθεί η πυκνότητα στην οποία η καλλιέργεια θα πρέπει να μεταφερθεί σε νέο θρεπτικό μέσο. Ο σχετικός υπολογισμός πρέπει να γίνεται προτού η καλλιέργεια φθάσει στη φάση θανάτου.

Προκαλλιέργεια:

Η προκαλλιέργεια προορίζεται να προσφέρει την κατάλληλη ποσότητα φυκών για τον εμβολιασμό των καλλιεργειών δοκιμής. Η προκαλλιέργεια επωάζεται υπό τις συνθήκες δοκιμής και χρησιμοποιείται ενώ βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση ανάπτυξης, κατά κανόνα έπειτα από περίοδο επώασης 2-4 ημερών. Όταν οι καλλιέργειες φυκών περιέχουν παραμορφωμένα ή ανώμαλα κύτταρα, πρέπει να απορρίπτονται.

Προσάρτημα 5

Ανάλυση δεδομένων με μη γραμμική παλινδρόμηση

Γενικές παρατηρήσεις

Η απόκριση κατά τις δοκιμές σε φύκη και τις λοιπές δοκιμές μικροβιακής ανάπτυξης — αύξηση της βιομάζας — είναι εκ φύσεως συνεχής ή μετρική μεταβλητή: συνίσταται σε ταχύτητα διεργασίας, εάν χρησιμοποιείται ο ρυθμός ανάπτυξης, και στο ολοκλήρωμά της ως προς τον χρόνο, εάν έχει επιλεγεί η βιομάζα. Και τα δύο συσχετίζονται με την αντίστοιχη μέση απόκριση ταυτόσημων καλλιεργειών ελέγχου που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία και παρουσιάζουν μέγιστη απόκριση στις επιβαλλόμενες συνθήκες — κατά τη δοκιμή σε φύκη, το φως και η θερμοκρασία αποτελούν τους πρωταρχικούς καθοριστικούς παράγοντες. Το σύστημα είναι καταναμημένο ή ομοιογενές και η βιομάζα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συνεχές, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα επιμέρους κύτταρα. Για το σύστημα αυτό, η κατανομή της διασποράς του τύπου απόκρισης συνδέεται μόνο με τους πειραματικούς παράγοντες (περιγράφεται τυπικά από τη λογαριθμοκανονική ή την κανονική κατανομή του σφάλματος). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις τυπικές αποκρίσεις των βιοδοκιμασιών με δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές, όπου η ανοχή (με τυπική διωνυμική κατανομή) των επιμέρους οργανισμών υποτίθεται συχνά ότι είναι η κυρίαρχη συνιστώσα της διασποράς. Οι αποκρίσεις του μάρτυρα, εν προκειμένω, είναι μηδέν ή στο επίπεδο υποβάθρου.

Στην απλή περίπτωση, η κανονικοποιημένη ή σχετική απόκριση, r , μειώνεται με μονοτονία από το 1 (μηδενική αναστολή) έως το 0 (100 % αναστολή). Σημειωτέον ότι όλες οι αποκρίσεις ενέχουν σφάλμα και ότι φαινόμενη αρνητική αναστολή είναι δυνατόν να υπολογιστεί μόνο ως επακόλουθο τυχαίου σφάλματος.

Ανάλυση παλινδρόμησης

Μοντέλα

Σκοπός της ανάλυσης παλινδρόμησης είναι να περιγραφεί ποσοτικά η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης με τη μορφή μαθηματικής συνάρτησης παλινδρόμησης $Y = f(C)$ ή, συνιθιότερα, $F(Z)$, όπου $Z = \log C$. Η εφαρμογή της αντίστροφης συνάρτησης, $C = f^{-1}(Y)$, επιτρέπει τον υπολογισμό των τιμών της EC_x , όπως των EC_{50} , EC_{10} και EC_{20} , καθώς και των οικείων ορίων εμπιστοσύνης 95 %. Έχει αποδειχθεί ότι οι σχέσεις συγκέντρωσης-απόκρισης που προκύπτουν από τις δοκιμές αναστολής της ανάπτυξης φυκών περιγράφονται επιτυχώς από διάφορες απλές μαθηματικές συναρτήσεις. Στις συναρτήσεις αυτές περιλαμβάνονται, π.χ., η λογιστική εξίσωση, η ασύμμετρη εξίσωση του Weibull και η συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής — όλες σιγμοειδείς καμπύλες που τείνουν ασυμπτωτικά προς το μηδέν, όταν $C \rightarrow 0$, και προς το ένα, όταν $C \rightarrow \infty$.

Τελευταία, προτείνεται η χρήση μοντέλων συνεχούς συνάρτησης ορίου (π.χ. μοντέλο Κοοϊζμαν για την αναστολή της ανάπτυξης πληθυσμού, Κοοϊζμαν et al. 1996) αντί των ασυμπτωτικών μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν επιδράσεις σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα όριο, $EC_0 +$, το οποίο υπολογίζεται με προεκβολή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης μέχρι να τέμνει τον άξονα των συγκεντρώσεων, με την εφαρμογή απλής συνεχούς συνάρτησης που δεν είναι διαφορίσιμη στο αρχικό σημείο.

Σημειωτέον ότι η ανάλυση μπορεί να συνίσταται σε απλή ελαχιστοποίηση των αθροισμάτων των τετραγώνων των καταλοίπων (με την παραδοχή σταθερής διασποράς) ή των σταθμισμένων τετραγώνων, εάν αντισταθμίζεται η ετερογένεια της διασποράς.

Διαδικασία

Η διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: Επιλέγεται η κατάλληλη συναρτησιακή εξίσωση, $Y = f(C)$, και προσαρμόζεται στα δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση. Χρησιμοποιούνται, κατά προτίμηση, οι μετρήσεις από κάθε επιμέρους φιάλη αντί των μέσων τιμών των επαναλήψεων, ώστε να αντληθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες από τα δεδομένα. Από την άλλη πλευρά, σε περίπτωση μεγάλης διασποράς, η πρακτική εμπειρία έχει δείξει ότι οι μέσες τιμές των επαναλήψεων είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ακριβέστερη μαθηματική εκτίμηση, επηρεαζόμενη σε μικρότερο βαθμό από τα συστηματικά σφάλματα των δεδομένων, απ' ό,τι η εκτίμηση με κάθε επιμέρους σημείο δεδομένων που έγινε δεκτό.

Σχεδιάζεται το διάγραμμα της προσαρμοσμένης καμπύλης και των δεδομένων των μετρήσεων και εξετάζεται κατά πόσον η προσαρμογή της καμπύλης είναι η ενδεδειγμένη. Ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η ανάλυση των καταλοίπων. Εάν η συναρτησιακή σχέση που επιλέχθηκε για την προσαρμογή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης δεν περιγράφει ικανοποιητικά το σύνολο της εν λόγω καμπύλης ή κάποιο ουσιώδες τμήμα της, όπως την απόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέγεται άλλη δυνατότητα προσαρμογής της καμπύλης — π.χ. ασύμμετρη καμπύλη, όπως η συνάρτηση Weibull, αντί της συμμετρικής. Η αρνητική αναστολή ενδέχεται να αποτελέσει πρόβλημα, π.χ. με τη συνάρτηση της λογαριθμοκανονικής κατανομής, το οποίο απαιτεί ομοίως εναλλακτική συνάρτηση παλινδρόμησης. Δεν συνιστάται να δίνεται στις αρνητικές αυτές τιμές η τιμή μηδέν ή μικρή θετική τιμή, γιατί αυτό στρεβλώνει την κατανομή του σφάλματος. Για τον υπολογισμό των τιμών $EC_{\chi\mu\eta\rho\lambda\omicron\chi}$ μπορεί να ενδείκνυται χωριστές προσαρμογές σε τμήματα της καμπύλης, όπως

εκείνο που αντιστοιχεί στο χαμηλό επίπεδο αναστολής. Από την προσαρμοσμένη εξίσωση υπολογίζονται [με “αντίστροφη επίλυση”, $C = f^{-1}(Y)$] χαρακτηριστικές σημειακές τιμές της EC_x και αναφέρονται τουλάχιστον η EC_{50} και μία ή δύο εκτιμήσεις $EC_{\text{χαμηλό}}$. Η πρακτική εμπειρία από τη διενέργεια δοκιμών έχει δείξει ότι, κατά κανόνα, η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμών σε φύκη επιτρέπει εύλογα ακριβείς εκτιμήσεις στο επίπεδο αναστολής 10 %, εάν επαρκούν τα σημεία δεδομένων — εκτός εάν εμφανιστεί διέγερση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ως παράγοντας σύγχυσης. Συχνά, η ακρίβεια εκτίμησης της EC_{20} είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της EC_{10} , επειδή η EC_{20} βρίσκεται συνήθως στο σχεδόν ευθύγραμμο τμήμα της κεντρικής καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ερμηνεία της EC_{10} είναι δυνατόν να παρουσιάζει δυσκολίες, λόγω της διέγερσης της ανάπτυξης. Για τον λόγο αυτό, μολονότι η EC_{10} προκύπτει κατά κανόνα με επαρκή ακρίβεια, συνιστάται να αναφέρεται πάντα και η EC_{20} .

Συντελεστές στάθμισης

Επειδή η πειραματική διασπορά δεν είναι γενικά σταθερή και, συνήθως, περιλαμβάνει μια αναλογική συνιστώσα, αποτελεί πλεονέκτημα η συστηματική διενέργεια σταθμισμένης παλινδρόμησης. Κατά κανόνα, για την ανάλυση αυτή υποτίθεται ότι οι συντελεστές στάθμισης είναι αντιστρόφως ανάλογοι της διασποράς:

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

Πολλά προγράμματα παλινδρόμησης παρέχουν τη δυνατότητα ανάλυσης της σταθμισμένης παλινδρόμησης, περιλαμβάνοντας πίνακα με τους συντελεστές στάθμισης. Για λόγους διευκόλυνσης, οι συντελεστές στάθμισης θα πρέπει να κανονικοποιούνται πολλαπλασιαζόμενοι επί $n/\sum w_i$ (όπου n είναι ο αριθμός των σημείων δεδομένων), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με τη μονάδα.

Κανονικοποίηση των αποκρίσεων

Η κανονικοποίηση με βάση τη μέση τιμή απόκρισης των μαρτύρων δημιουργεί ορισμένα προβλήματα αρχής και οδηγεί σε σχετικά περίπλοκη δομή της διασποράς. Η διαίρεση των αποκρίσεων διά του μέσου όρου των αποκρίσεων των μαρτύρων, ώστε να ληφθεί η εκατοστιαία αναστολή, εισάγει ένα πρόσθετο σφάλμα, οφειλόμενο στο σφάλμα του μέσου όρου των μαρτύρων. Εάν το σφάλμα αυτό δεν είναι αμελητέο, οι συντελεστές στάθμισης και τα όρια εμπιστοσύνης της παλινδρόμησης πρέπει να διορθωθούν, ώστε να ληφθεί υπόψη η συνδιασπορά με τον μάρτυρα (Draper και Smith, 1981). Σημειώτεον ότι η μεγάλη ακρίβεια στην εκτίμηση της μέσης τιμής της απόκρισης των μαρτύρων έχει σημασία για την ελαχιστοποίηση της συνολικής διασποράς της σχετικής απόκρισης. Η διασπορά αυτή υπολογίζεται ως εξής:

(Ο δείκτης i αναφέρεται στο επίπεδο συγκέντρωσης i και ο δείκτης 0 στους μάρτυρες.)

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

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

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

$$\text{με κανονική κατανομή των δεδομένων και με επαναλήψεις } m_i \text{ και } m_0: \text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

η συνολική διασπορά της σχετικής απόκρισης Y_i λαμβάνει λοιπόν τη μορφή:

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

Το σφάλμα στον μέσο όρο των μαρτύρων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των επαναλήψεων μαρτύρων από τον οποίο εξήχθη ο μέσος όρος. Ως εκ τούτου, μερικές φορές δικαιολογείται η προσθήκη ιστορικών δεδομένων, με την οποία περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό το σφάλμα. Μια εναλλακτική διαδικασία συνίσταται στη μη κανονικοποίηση των δεδομένων και στην προσαρμογή των απόλυτων τιμών απόκρισης, συμπεριλαμβανομένης της τιμής της απόκρισης του μάρτυρα, η οποία όμως εισάγεται ως πρόσθετη παράμετρος για προσαρμογή με μη γραμμική παλινδρόμηση. Με τη συνήθη διπαμετρική εξίσωση παλινδρόμησης, η μέθοδος αυτή απαιτεί την προσαρμογή τριών παραμέτρων και, συνεπώς, περισσότερα σημεία δεδομένων από τη μη γραμμική παλινδρόμηση σε δεδομένα που έχουν κανονικοποιηθεί με τη χρήση προκαθορισμένης απόκρισης μάρτυρα.

Αντίστροφα διαστήματα εμπιστοσύνης

Ο υπολογισμός διαστημάτων εμπιστοσύνης στη μη γραμμική παλινδρόμηση με αντίστροφη επίλυση είναι σχετικά πολύπλοκος και δεν διατίθεται ως βασική επιλογή στα συνήθη στατιστικά προγράμματα υπολογιστών. Κατά προσέγγιση όρια εμπιστοσύνης είναι δυνατόν να ληφθούν από τα τυποποιημένα προγράμματα μη γραμμικής παλινδρόμησης με αναπαράμετροποίηση (Bruce και Versteeg, 1992), η οποία περιλαμβάνει νέα γραφή της μαθηματικής εξίσωσης, με τις επιθυμητές εκτιμήσεις σημείων, π.χ. EC_{10} και EC_{50} , ως παραμέτρους προς υπολογισμό. [Έστω η εξίσωση $I = f(\alpha, \beta, \text{συγκέντρωση})$ στην οποία το $f(\alpha, \beta, \text{συγκέντρωση})$ αντικαθίσταται με την ισοδύναμη συνάρτηση $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{συγκέντρωση})$ με χρήση των σχέσεων ορισμού $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ και $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$.

Πιο άμεσος υπολογισμός (Andersen et al, 1998) εκτελείται με τη διατήρηση της αρχικής εξίσωσης και τη χρήση αναπτύγματος Taylor γύρω από τις μέσες τιμές των r_i και r_0 .

Πρόσφατα, άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως οι μέθοδοι bootstrap. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από τις μετρήσεις και η συχνή νέα δειγματοληψία, η οποία κατευθύνεται από γεννήτρια τυχαίων αριθμών, για την εκτίμηση εμπειρικής κατανομής της διασποράς.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

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, Νέα Υόρκη.

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) Το κεφάλαιο Γ.11 αντικαθίσταται από το εξής κείμενο:

«Γ.11. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΙΛΥΣ, ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ (ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΜΜΩΝΙΟΥ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 209 του ΟΟΣΑ (2010). Με τη μέθοδο που περιγράφεται προσδιορίζεται η επίδραση μιας χημικής ουσίας στους μικροοργανισμούς ενεργοποιημένης ιλύος (κυρίως, βακτήρια) με μέτρηση του ρυθμού αναπνοής τους (οξείδωση άνθρακα και/ή αμμωνίου) υπό καθορισμένες συνθήκες, με την παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η μέθοδος δοκιμών βασίζεται στη δοκιμή της ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry) (1)(2), στην προηγούμενη κατευθυντήρια γραμμή (TG) 209 του ΟΟΣΑ (3) και στο αναθεωρημένο πρότυπο ISO 8192 (4). Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι να προσφέρει ταχεία μέθοδο εξέτασης με την οποία να είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στους μικροοργανισμούς της ενεργοποιημένης ιλύος κατά το βιολογικό (αερόβιο) στάδιο καθαρισμού στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμής μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως δείκτης των κατάλληλων μη ανασταλτικών συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών που πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές βιοαποικοδομησιμότητας (π.χ. κεφάλαια Γ.4 Α-ΣΤ, Γ.9, Γ.10, Γ.12 και Γ.29 του παρόντος παραρτήματος, TG 302C του ΟΟΣΑ). Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή μπορεί να εκτελεστεί ως δοκιμή διαλογής, παρόμοια με τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών ή με την οριακή δοκιμή (βλ. σημείο 39), λαμβανομένης υπόψη μόνο της συνολικής αναπνοής. Ωστόσο, τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή όταν πρόκειται για δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας (κεφάλαια Γ.4 Α-ΣΤ και Γ.29 του παρόντος παραρτήματος), για τις οποίες η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Πράγματι, η απουσία αναστολής στη συγκεκριμένη δοκιμή αναπνοής δεν συνεπάγεται αυτόμάτως μη ανασταλτικές συνθήκες στη δοκιμή άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας των κεφαλαίων Γ.4 Α-ΣΤ ή Γ.29 του παρόντος παραρτήματος.

2. Γενικά, η δοκιμή αναστολής της αναπνοής φαίνεται ότι έχει εφαρμοστεί με επιτυχία από τότε που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά αλλά, σε ορισμένες περιπτώσεις, αναφέρθηκαν εσφαλμένα αποτελέσματα, π.χ. (2) (4) (5). Οι καμπύλες αναπνοής σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση είναι ενίοτε διφασικές, οι καμπύλες δόσης-απόκρισης έχουν παραμορφωθεί και οι τιμές EC_{50} κυμαίνονται σε μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα (5). Έρευνες έχουν δείξει ότι αυτά τα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν η ενεργοποιημένη ιλύς που χρησιμοποιείται στη δοκιμή νιτροποιείται σημαντικά και η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει μεγαλύτερη επίδραση στην οξείδωση του αμμωνίου απ' ό,τι στη γενική ετεροτροφική οξείδωση. Κατά συνέπεια, τα εσφαλμένα αποτελέσματα μπορεί να διορθωθούν με τη διενέργεια επιπλέον δοκιμών στις οποίες θα χρησιμοποιείται ειδικός αναστολέας νιτροποίησης. Εάν προσδιοριστεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου με και χωρίς τον εν λόγω αναστολέα, π.χ. την Ν-αλλυλοθειουρία (ATU), μπορούν να υπολογιστούν οι αντίστοιχοι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου κατά τη συνολική, ετεροτροφική οξείδωση και τη νιτροποίηση (4) (7) (8). Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να προσδιοριστούν οι ανασταλτικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις δύο διεργασίες και μπορούν να υπολογιστούν, με τον συνηθισμένο τρόπο, οι τιμές EC_{50} τόσο για την οξείδωση οργανικού άνθρακα (ετεροτροφική οξείδωση) όσο και για την οξείδωση αμμωνίου (νιτροποίηση). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σε σπάνιες περιπτώσεις, η ανασταλτική επίδραση της Ν-αλλυλοθειουρίας μπορεί να εξουδετερωθεί εν μέρει ή πλήρως εάν δημιουργηθούν σύμπλοκα με υπό δοκιμή χημικές ουσίες ή συμπληρώματα του θρεπτικού μέσου, π.χ. ιόντα Cu^{++} (6). Τα ιόντα Cu^{++} είναι ιδιαίτερα σημαντικά για το βακτήριο *Nitrosomonas*, αλλά είναι τοξικά σε υψηλότερη συγκέντρωση.
3. Η νιτροποίηση κατά την αερόβια επεξεργασία λυμάτων συνιστά απαραίτητο στάδιο για την απομάκρυνση αζωτούχων ενώσεων από λύματα μέσω απονίτρωσης αέριων προϊόντων. Η ανάγκη αυτής της διεργασίας έχει καταστεί πιεστική ιδιαίτερα στις ευρωπαϊκές χώρες. Η ΕΕ έχει πλέον θεσπίσει χαμηλότερα όρια όσον αφορά τη συγκέντρωση αζώτου στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα που απορρίπτονται στους υδάτινους αποδέκτες (1).
4. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μέθοδος που εκτιμά μόνο την επίδραση στις διεργασίες οξείδωσης οργανικού άνθρακα είναι κατάλληλη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτείται εξέταση της επίδρασης μόνο στη νιτροποίηση, ή στη νιτροποίηση και την οξείδωση οργανικού άνθρακα χωριστά, προκειμένου να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα και να κατανοηθούν οι επιδράσεις.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

5. Οι ρυθμοί αναπνοής των δειγμάτων ενεργοποιημένης ιλύος που τροφοδοτούνται με συνθετικά απόβλητα μετρώνται σε ερμητικά κλειστή κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου έπειτα από χρόνο επαφής 3 ωρών. Με βάση ένα ρεαλιστικό σενάριο έκθεσης, θα μπορούσαν να ενδεικνύονται μεγαλύτεροι χρόνοι επαφής. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία βιοαποικοδομείται γρήγορα –π.χ. αβιοτικά μέσω υδρόλυσης– ή είναι πτητική και η συγκέντρωση δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιείται επιπλέον μια συντομότερη περίοδος έκθεσης, π.χ. 30 λεπτών. Η ευαισθησία κάθε παρτίδας ενεργοποιημένης ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται με τη βοήθεια κατάλληλης χημικής ουσίας αναφοράς την ημέρα της έκθεσης. Κατά κανόνα, η δοκιμή χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η EC_x (π.χ. η EC_{50}) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίπτωσης (NOEC).
6. Η αναστολή πρόσληψης οξυγόνου από μικροοργανισμούς που οξειδώνουν τον οργανικό άνθρακα μπορεί να εκφράζεται χωριστά από την αναστολή πρόσληψης οξυγόνου από μικροοργανισμούς που οξειδώνουν το αμμώνιο, εάν μετρηθούν οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου με και χωρίς την Ν-αλλυλοθειουρία, έναν ειδικό αναστολέα της οξείδωσης του αμμωνίου σε νιτρώδη από τα νιτροποιητικά βακτήρια πρώτου σταδίου. Στην περίπτωση αυτή, η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου υπολογίζεται με τη σύγκριση του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου παρουσία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και του μέσου ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου των αντίστοιχων μαρτύρων που δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, τόσο με όσο και χωρίς τον ειδικό αναστολέα, την Ν-αλλυλοθειουρία.
7. Τυχόν πρόσληψη οξυγόνου που προκύπτει από αβιοτικές διεργασίες μπορεί να ανιχνευθεί με τον προσδιορισμό του ρυθμού της σε μείγματα που περιλαμβάνουν την υπό δοκιμή χημική ουσία, θρεπτικό μέσο συνθετικών αποβλήτων και νερό, και δεν περιλαμβάνουν ενεργοποιημένη ιλύ.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

8. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά η ταυτοποίηση (κατά προτίμηση, ο αριθμός CAS), η ονομασία (IUPAC), τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, τάσης ατμών, πτητικότητας και προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Κατά κανόνα, οι πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να ελεγχθούν επαρκώς μόνο εάν λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις (βλ. σημείο 21).

(1) Οδηγία 91/271/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 21ης Μαΐου 1991, για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων (ΕΕ L 135 της 30.5.1991, σ. 40).

ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

9. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές, δυσδιάλυτες και πτητικές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ενδέχεται να μην είναι πάντα δυνατόν να ληφθούν οι τιμές EC_{50} με χημικές ουσίες περιορισμένης διαλυτότητας, ενώ έγκυρα αποτελέσματα με πτητικές χημικές ουσίες μπορούν να ληφθούν μόνο υπό τον όρο ότι το μεγαλύτερο μέρος (π. χ. > 80 %) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παραμένει στο μείγμα της αντίδρασης στο τέλος της(των) περιόδου(-ων) έκθεσης. Όταν υπάρχει αμφιβολία ως προς τη σταθερότητα ή την πτητικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να υποβάλλονται επιπλέον αναλυτικά στοιχεία, ώστε να προσδιορίζεται ακριβέστερα η συγκέντρωση EC_x .

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

10. Οι χημικές ουσίες αναφοράς θα πρέπει να ελέγχονται περιοδικά, ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία της μεθόδου δοκιμών και των συνθηκών δοκιμής, και να ελέγχεται η ευαισθησία κάθε παρτίδας ενεργοποιημένης ιλύος που χρησιμοποιείται ως μικροβιακό ενοφθάλμισμα την ημέρα της έκθεσης. Ως αναστολέας αναφοράς συνιστάται η χημική ουσία 3,5-διχλωροφαινόλη (3,5-DCP), αφού είναι γνωστός αναστολέας της αναπνοής και χρησιμοποιείται σε πολλούς τύπους δοκιμών αναστολής/τοξικότητας (4). Επίσης, ως χημική ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο πενταένυδρος θειικός χαλκός (II), για την αναστολή της ολικής αναπνοής (9). Η Ν-μεθυλανιλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ειδική χημική ουσία αναφοράς για την αναστολή νιτροποίησης (4).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

11. Ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου των τυφλών μαρτύρων (που δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή χημική ουσία αναφοράς) δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος από 20 mg οξυγόνου ανά γραμμάριο ενεργοποιημένης ιλύος (ξηρό βάρος των αιωρούμενων στερεών) ανά ώρα. Εάν ο ρυθμός είναι χαμηλότερος, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με πλυμένη ενεργοποιημένη ιλύ ή με ιλύ από άλλη πηγή. Ο συντελεστής μεταβολής του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου στις επαναλήψεις ελέγχου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.
12. Στο πλαίσιο διεθνούς δοκιμής δακτυλίου (ring test) που διοργανώθηκε το 2004 από τον ISO (4) και κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ενεργοποιημένη ιλύς προερχόμενη από οικιακά λύματα, διαπιστώθηκε ότι η EC_{50} της 3,5-DCP κυμαινόταν μεταξύ 2 mg/l και 25 mg/l για τη ολική αναπνοή, μεταξύ 5 mg/l και 40 mg/l για την ετεροτροφική αναπνοή και μεταξύ 0,1 mg/l και 10 mg/l για την αναπνοή κατά τη νιτροποίηση. Εάν η EC_{50} της 3,5-DCP δεν βρίσκεται εντός του αναμενόμενου εύρους τιμών, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με ενεργοποιημένη ιλύ από άλλη πηγή. Η EC_{50} του πενταένυδρου θειικού χαλκού (II) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 53 και 155 mg/l για την ολική αναπνοή (9).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Δοχεία και συσκευές δοκιμής

13. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:
- δοχεία δοκιμής — π.χ. ποτήρια ζέσεως 1 000 ml που θα περιέχουν 500 ml μείγματος της αντίδρασης (βλ. 5 στο σχήμα 1)
 - κυψελίδες και συνδετήρες για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου· κατάλληλο ηλεκτρόδιο οξυγόνου· ερμητικά κλειστή κυψελίδα η οποία θα περιέχει το δείγμα χωρίς υπερκείμενο χώρο και θα διαθέτει καταγραφέα (π.χ. 7, 8, 9 στο σχήμα 1 του προσαρτήματος 2)· εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιείται φιάλη BOD με κατάλληλο προσαρμοστικό κολάρο ώστε το ηλεκτρόδιο οξυγόνου να συγκρατείται στον λαιμό της φιάλης (βλ. σχήμα 2 του προσαρτήματος 3). Για να αποφευχθεί η απώλεια υγρού λόγω υπερχειλίσσης κατά την εισαγωγή του ηλεκτροδίου οξυγόνου, συνιστάται να εισάγεται στην αρχή χοάνη ή γυάλινος σωλήνας μέσω του κολάρου, ή να χρησιμοποιούνται δοχεία με διευρυμένο περιτόμιο. Και στις δύο περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας ή εναλλακτική μέθοδος ανάδευσης, π.χ. αυτοκινούμενος ανιχνευτήρας ανάδευσης
 - μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητικές ράβδοι (καλυμμένες με αδρανές υλικό), που χρησιμοποιούνται στον θάλαμο μέτρησης και/ή στα δοχεία δοκιμής
 - διάταξη αερισμού: εάν είναι αναγκαίο, ο συμπιεσμένος αέρας θα πρέπει να διέλθει μέσα από κατάλληλο φίλτρο, ώστε να απομακρυνθούν σκόνης και έλαια, και μέσα από φιάλες έκπλυσης που περιέχουν νερό, ώστε να υγραποιηθεί. Το περιεχόμενο των δοχείων θα πρέπει να αεριστεί με σιφόνια Pasteur, ή άλλες διατάξεις αερισμού, που δεν απορροφούν χημικές ουσίες. Μπορεί να χρησιμοποιείται ανακινήτηρας ελλειψοειδούς κίνησης ο οποίος να λειτουργεί με ταχύτητες μεταξύ 150 και 250 rpm με φιάλες χωρητικότητας, π.χ. 2 000 ml, ώστε να καλύπτεται το απαιτούμενο οξυγόνο για την ιλύ και να παρακάμπτονται οι δυσκολίες που οφείλονται σε χημικές ουσίες που προκαλούν υπερβολικό αφρισμό, είναι πτητικές και, ως εκ τούτου, χάνονται, ή είναι δύσκολο να διασπαρούν με διαβίβαση αέρα. Κατά κανόνα, το σύστημα δοκιμής αποτελείται από μια σειρά ποτηριών ζέσεως που αερίζονται συνεχώς και τοποθετούνται διαδοχικά (π.χ. ανά διαστήματα των περίπου 10 - 15 λεπτών) και στη συνέχεια αναλύονται διαδοχικά. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται επικυρωμένος εξοπλισμός που επιτρέπει τον ταυτόχρονο αερισμό και τη μέτρηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου στα μείγματα

ε) πεχάμετρο·

στ) φυγόκεντρος, απλή επιτραπέζια φυγόκεντρος για ιλύ, με μέγιστη ταχύτητα 10 000 m/s².

Αντιδραστήρια

14. Αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Νερό

15. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, το οποίο να περιέχει λιγότερο από 1 mg/l DOC, εκτός εάν ορίζεται ρητά η χρήση νερού βρύσης χωρίς χλώριο.

Συνθετικά απόβλητα

16. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να παρασκευάζεται ώστε να περιέχει τα ακόλουθα συστατικά στις αναφερόμενες ποσότητες:

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| — πεπτόνη | 16 g |
| — εκχύλισμα κρέατος (ή συγκρίσιμο φυτικό εκχύλισμα) | 11 g |
| — ουρία | 3 g |
| — χλωριούχο νάτριο (NaCl) | 0,7 g |
| — διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂ · 2H ₂ O) | 0,4 g |
| — επταένυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄ · 7H ₂ O) | 0,2 g |
| — άνυδρο όξινο φωσφορικό κάλιο (K ₂ HPO ₄) | 2,8 g |
| — απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό έως 1 λίτρο | |

17. Το pH αυτού του διαλύματος θα πρέπει να είναι $7,5 \pm 0,5$. Εάν το παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο δεν χρησιμοποιείται αμέσως, θα πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 0 °C έως 4 °C, για μέγιστο διάστημα 1 εβδομάδας ή υπό συνθήκες που δεν αλλοιώνουν τη σύνθεσή του. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα συγκεκριμένα συνθετικά απόβλητα είναι 100 φορές πυκνότερα από αυτά που περιγράφονται στην τεχνική έκθεση του ΟΟΣΑ "Προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδομησιμότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα συνθετικά απορρυπαντικά" (11 Ιουνίου 1976), με την προσθήκη επιπλέον μονόξινου φωσφορικού καλίου.
18. Εναλλακτικά, τα συστατικά του θρεπτικού μέσου μπορούν να αποστειρώνονται χωριστά πριν από τη φύλαξή τους, ή μπορεί να προστίθενται η πεπτόνη και το εκχύλισμα κρέατος λίγο πριν από την εκτέλεση της δοκιμής. Το θρεπτικό μέσο, προτού χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να αναμειγνύεται πλήρως και, αν κρίνεται αναγκαίο, να προσαρμόζεται η τιμή του pH στο $7,5 \pm 0,5$.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Σε περίπτωση εύκολα υδατοδιαλυτών υπό δοκιμή χημικών ουσιών, θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης μόνο μέχρι το μέγιστο όριο υδατοδιαλυτότητας (οι καθιζήσεις δεν είναι αποδεκτές). Σε περίπτωση δυσδιάλυτων στο νερό ουσιών, τα μείγματα ουσιών με διαφορετική υδατοδιαλυτότητα και οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει να ζυγίζονται απευθείας στα δοχεία δοκιμής. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η χρήση διαλυμάτων παρακαταθήκης μπορεί να αποτελεί εναλλακτική, εάν διαλυμένες συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών προσδιορίζονται αναλυτικά στα δοχεία δοκιμής (πριν από την προσθήκη της ενεργοποιημένης ιλύος). Εάν παρασκευάζονται κλάσματα περιεχόμενα στο νερό (WAF), ο αναλυτικός προσδιορισμός των διαλυμένων συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στα δοχεία δοκιμής είναι επίσης ουσιώδης. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση οργανικών διαλυτών, μέσω διασποράς ή γαλακτωματοποιητών για να βελτιωθεί η διαλυτότητα. Όταν υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπό αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατόν να γίνεται υπερίχηση στα διαλύματα παρακαταθήκης και προηγούμενη ανάδευση στα εναιωρήματα, π.χ. ολονυκτίως.
20. Η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το pH στο σύστημα δοκιμής. Πριν από την εκτέλεση της δοκιμής, θα πρέπει να προσδιορίζεται το pH των μειγμάτων που υφίστανται αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία, στο πλαίσιο προκαταρκτικής δοκιμασίας, για να βεβαιωθεί κατά πόσον είναι αναγκαίο να προσαρμοστεί το pH πριν από την κυρίως δοκιμή και, ξανά, κατά την ημέρα της κυρίως δοκιμής. Τα διαλύματα/εναιωρήματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό θα πρέπει να εξουδετερώνονται πριν από την προσθήκη ενοφθαλμίσματος, αν κρίνεται αναγκαίο. Ωστόσο, επειδή η εξουδετέρωση μπορεί να μεταβάλει τις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας, θα μπορούσε να διενεργούνται περαιτέρω δοκιμές, ανάλογα με τους σκοπούς της μελέτης, ώστε να εκτιμάται η επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην ιλύ χωρίς προσαρμογή του pH.

21. Οι τοξικές επιδράσεις των πτητικών χημικών ουσιών, ιδίως σε δοκιμές κατά τις οποίες διοχετεύεται στο σύστημα αέριο με τη μορφή φυσαλίδων, μπορούν να ποικίλλουν σε ένταση λόγω απωλειών της ουσίας κατά την περίοδο έκθεσης. Θα πρέπει να δίνεται προσοχή όταν πρόκειται για τις ουσίες αυτές, δηλ. να διενεργείται ειδική ανάλυση των εν λόγω ουσιών στα μείγματα ελέγχου που τις περιέχουν και να τροποποιείται το σύστημα αερισμού.

Χημική ουσία αναφοράς

22. Εάν χρησιμοποιείται ως χημική ουσία αναφοράς η 3,5-διχλωροφαινόλη, θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα 1,00 g 3,5-διχλωροφαινόλης σε 1 000 ml νερού (15). Θα πρέπει να χρησιμοποιείται θερμό νερό και/ή υπερήχηση για να επιταχυνθεί η διάλυση· το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι χαραγής, αφού θα έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, θα πρέπει να βεβαιώνεται ότι δεν έχει μεταβληθεί η δομή της χημικής ουσίας αναφοράς. Το pH του διαλύματος θα πρέπει να ελέγχεται και, αν είναι αναγκαίο, να προσαρμόζεται σε pH 7 - 8 με NaOH ή H₂SO₄.
23. Εάν χρησιμοποιείται ως χημική ουσία αναφοράς πενταένυδρος θεικός χαλκός (II), χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 58 mg/l, 100 mg/l και 180 mg/l (συντελεστής 1,8). Η ουσία ζυγίζεται απευθείας στα δοχεία δοκιμής (29 - 50 - 90 mg για συνολικό όγκο 500 ml). Στη συνέχεια, διαλύεται σε 234 ml νερού βρύσης αποστειρωμένου σε αυτόκαυστο. Ο πενταένυδρος θεικός χαλκός (II) είναι ευδιάλυτη ουσία. Κατά την έναρξη της δοκιμής, προστίθενται 16 ml συνθετικών αποβλήτων και 250 ml ενεργοποιημένης ιλύος.

Ειδικός αναστολέας της νιτροποίησης

24. Θα πρέπει να παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης N-αλλυλοθειουρίας (ATU) 2,32 g/l. Με την προσθήκη 2,5 ml αυτού του διαλύματος παρακαταθήκης σε μείγμα επώασης τελικού όγκου 500 ml προκύπτει τελική συγκέντρωση 11,6 mg ATU/l (10⁻⁴ mol/l), η οποία είναι γνωστό ότι επαρκεί (4) για να προκαλέσει 100 % αναστολή της νιτροποίησης σε νιτροποιητική ενεργοποιημένη ιλύ που περιέχει 1,5 g/l αιωρούμενα στερεά.

Αβιοτικοί μάρτυρες

25. Σε σπάνιες περιπτώσεις, μια υπό δοκιμή χημική ουσία με ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες ενδέχεται να προκαλέσει μετρήσιμη αβιοτική κατανάλωση οξυγόνου. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, οι αβιοτικοί μάρτυρες είναι αναγκαίοι για να γίνεται διάκριση μεταξύ της αβιοτικής πρόσληψης οξυγόνου από την υπό δοκιμή χημική ουσία και της μικροβιακής αναπνοής. Οι αβιοτικοί μάρτυρες μπορούν να παρασκευάζονται με αφαίρεση του ενοφθαλμίσματος από τα μείγματα δοκιμής. Ομοίως, μπορούν να συμπεριλαμβάνονται αβιοτικοί μάρτυρες χωρίς ενοφθαλμισμό, όταν διενεργούνται υποστηρικτικές αναλυτικές μετρήσεις για να προσδιοριστεί η επιτευχθείσα συγκέντρωση κατά τη φάση έκθεσης της δοκιμής, π.χ. όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης δυσδιάλυτων στο νερό χημικών ουσιών των οποίων τα συστατικά παρουσιάζουν διαφορετική υδατοδιαλυτότητα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι αναγκαίο να παρασκευαστεί αβιοτικός μάρτυρας με αποστειρωμένο ενοφθαλμισμό (π.χ. με αυτόκαυστο ή με την προσθήκη αποστειρωτικών τοξικών ουσιών). Ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να παράγουν ή να καταναλώνουν οξυγόνο μόνο εάν η αντιδρώσα επιφάνεια είναι αρκετά μεγάλη, ακόμα και αν συνήθως απαιτούν πολύ υψηλότερη θερμοκρασία ή πίεση για να γίνει η αντίδραση. Ως προς αυτό, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στα υπεροξεία. Το αποστειρωμένο ενοφθαλμισμό παρέχει μεγάλη επιφάνεια.

Ενοφθαλμισμα

26. Για γενική χρήση, η ενεργοποιημένη ιλύς θα πρέπει να συλλέγεται από την έξοδο της δεξαμενής αερισμού, ή κοντά στην έξοδο της δεξαμενής, σε έναν σταθμό επεξεργασίας λυμάτων σε καλή κατάσταση λειτουργίας ο οποίος επεξεργάζεται, κατά κύριο λόγο, οικιακά λύματα. Με βάση τον σκοπό της δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κατάλληλοι τύποι ή πηγές ενεργοποιημένης ιλύος, όπως π.χ. η ιλύς που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο, σε ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών 2 g/l έως 4 g/l. Ωστόσο, οι τύποι ιλύος που προέρχονται από διαφορετικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι πιθανό να εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας.
27. Η ιλύς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μορφή με την οποία συλλέγεται, αλλά θα πρέπει να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια με καθίζηση για σύντομο χρονικό διάστημα, π.χ. 5 έως 15 λεπτά, και απόχυση της υπερκείμενης στιβάδας που αποτελείται από λεπτότερα σωματίδια ή με κοσκίνισμα (π.χ. με μέγεθος οπής 1 mm²). Εναλλακτικά, η ιλύς μπορεί να ομογενοποιείται σε αναμείκτη για περίπου 15 δευτερόλεπτα ή περισσότερο, αλλά απαιτείται προσοχή όσον αφορά τις δυνάμεις διάτμησης και τη μεταβολή της θερμοκρασίας που μπορεί να επέλθει σε περίπτωση ανάμειξης για μεγάλο χρονικό διάστημα.

28. Η έκπλυση της ιλύος είναι συχνά αναγκαία, π.χ. αν ο ρυθμός της ενδογενούς αναπνοής είναι βραδύς. Η ιλύς θα πρέπει, στην αρχή, να φυγοκεντρείται έως ότου παραχθούν καθαρό υπερκείμενο υγρό και συσσωματώματα στερεών σωματιδίων αποβλήτων, π.χ. 10 λεπτά σε περίπου $10\ 000\ \text{m/s}^2$. Το υπερκείμενο υγρό θα πρέπει να απορρίπτεται και η ιλύς θα πρέπει να επανεναιωρείται με ανατάραξη σε νερό βρύσης που δεν περιέχει χλώριο και, στη συνέχεια, το νερό έκπλυσης θα πρέπει να απομακρύνεται με επαναφυγοκέντρωση και εκ νέου απόρριψη. Η διαδικασία έκπλυσης και φυγοκέντρωσης θα πρέπει να επαναλαμβάνεται, αν κρίνεται αναγκαίο. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η ξηρή μάζα γνωστού όγκου της ιλύος που έχει επανεναιωρηθεί, η οποία συμπυκνώνεται με την αφαίρεση υγρού ή διαλύεται περαιτέρω σε νερό βρύσης που δεν περιέχει χλώριο για να επιτευχθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση στερεών σωματιδίων της ιλύος, δηλ. $3\ \text{g/l}$. Η ενεργοποιημένη ιλύς θα πρέπει να αερίζεται συνεχώς (π.χ. $2\ \text{l/λεπτό}$) στη θερμοκρασία της δοκιμής και, όταν είναι δυνατό, να χρησιμοποιείται την ημέρα της συλλογής. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, η ιλύς θα πρέπει να τροφοδοτείται καθημερινά με θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα ($50\ \text{ml}$ θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα ανά λίτρο ενεργοποιημένης ιλύος) για δύο επιπλέον ημέρες. Ακολούθως, η ιλύς χρησιμοποιείται για τη δοκιμή και τα αποτελέσματα θεωρούνται έγκυρα, υπό τον όρο ότι δεν έχει επέλθει καμία σημαντική μεταβολή στη δραστηριότητά της, με βάση τον ρυθμό της ενδογενούς ετεροτροφικής αναπνοής της και της αναπνοής της κατά τη νιτροποίηση.
29. Μπορεί να ανακύψουν δυσκολίες κατά την επώαση, σε περίπτωση αφρισμού σε τέτοιον βαθμό ώστε ο αφρός και τα στερεά σωματίδια της ιλύος που αυτός μεταφέρει να υπερχειλίζουν τα δοχεία αερισμού. Ενίοτε, ο αφρισμός μπορεί απλώς να προκαλείται από την παρουσία των συνθετικών αποβλήτων, αλλά αφρισμός θα πρέπει να αναμένεται σε περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι, ή περιέχει, επιφανειοδραστική ουσία. Η απώλεια στερεών σωματιδίων της ιλύος στα μείγματα δοκιμής θα έχει ως αποτέλεσμα τεχνητά μειωμένους ρυθμούς αναπνοής, οι οποίοι θα μπορούσαν εσφαλμένα να εκληφθούν ως αποτέλεσμα αναστολής. Επιπλέον, ο αφρισμός διαλύματος επιφανειοδραστικών ουσιών συγκεντρώνει την επιφανειοδραστική ουσία στο στρώμα του αφρού· η απώλεια αφρού από το σύστημα της δοκιμής θα ελαττώσει τις συγκεντρώσεις έκθεσης. Ο αφρισμός μπορεί να ελέγχεται με απλές μηχανικές μεθόδους (π.χ. περιστάσιακή ανάδευση με το χέρι με τη χρήση γυάλινης ράβδου) ή με την προσθήκη αντιαφριστικού παράγοντα σε μορφή σιλικονούχου γαλακτώματος που δεν περιέχει επιφανειοδραστική ουσία και/ή με την εφαρμογή της μεθόδου αερισμού με ανακίνηση των φιαλών. Εάν το πρόβλημα συνδέεται με την παρουσία των συνθετικών αποβλήτων, η σύνθεση των αποβλήτων θα πρέπει να τροποποιείται με την προσθήκη αντιαφριστικού παράγοντα σε αναλογία, π.χ., $50\ \text{ml/l}$. Εάν ο αφρισμός οφείλεται στην υπό δοκιμή χημική ουσία, η ποσότητα που απαιτείται για την ελάττωση του αφρού θα πρέπει να προσδιορίζεται στη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής και, στη συνέχεια, κάθε μεμονωμένο δοχείο αερισμού θα πρέπει να υποβάλλεται σε πανομοιότυπη αγωγή (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δεν περιέχουν αφρό, όπως οι τυφλοί μάρτυρες και τα δοχεία αναφοράς). Εάν χρησιμοποιούνται αντιαφριστικοί παράγοντες, δεν θα πρέπει να υπάρχει αλληλεπίδραση με το ενοφθάλμισμα και/ή την υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

30. Η αναστολή μπορεί να προσδιοριστεί για τρεις διαφορετικούς τύπους πρόσληψης οξυγόνου: την ολική, την αμιγώς ετεροτροφική και την οφειλόμενη στη νιτροποίηση. Κατά κανόνα, η μέτρηση της αναστολής της ολικής πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να επαρκεί. Οι επιδράσεις που έχουν η οξειδωση οργανικού άνθρακα και η οξειδωση αμμωνίου στην ετεροτροφική πρόσληψη οξυγόνου πρέπει να προσδιορίζονται όταν υπάρχει ειδική απαίτηση για τα δύο αυτά χωριστά τελικά σημεία σε σχέση με συγκεκριμένη χημική ουσία ή (κατά περίπτωση) για να ερμηνευθούν άτυπες καμπύλες δόσης-απόκρισης όσον αφορά την αναστολή της ολικής πρόσληψης οξυγόνου.

Συνθήκες δοκιμής

31. Η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία $20 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Μείγματα δοκιμής

32. Τα μείγματα δοκιμής (εμφανίζονται ως F_T στον πίνακα 1) που περιέχουν νερό, θρεπτικό υλικό από συνθετικά απόβλητα και την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να παρασκευάζονται ώστε να λαμβάνονται διαφορετικές ονομαστικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. πίνακα 1 για ενδεικτικές τιμές όγκου των συστατικών). Το pH θα πρέπει να προσαρμόζεται στο $7,5 \pm 0,5$, αν είναι αναγκαίο. Τα μείγματα θα πρέπει να διαλύονται με νερό και το ενοφθάλμισμα θα πρέπει να προστίθεται για να ληφθούν ίσοι τελικοί όγκοι στα δοχεία και να ξεκινήσει ο αερισμός.

Μείγματα αναφοράς

33. Τα μείγματα (F_R) θα πρέπει να παρασκευάζονται με τη χημική ουσία αναφοράς, π.χ. 3,5-διχλωροφαινόλη, αντί της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, κατά τον ίδιο τρόπο με τα μείγματα δοκιμής.

Τυφλοί μάρτυρες

34. Οι τυφλοί μάρτυρες (F_B) θα πρέπει να παρασκευάζονται στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης, όταν πρόκειται για δοκιμές στις οποίες τα ποτήρια ζέσεως τοποθετούνται διαδοχικά ανά διαστήματα. Όταν εκτελούνται δοκιμές που χρησιμοποιούν εξοπλισμό ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον δύο τυφλοί μάρτυρες σε κάθε παρτίδα ταυτόχρονης ανάλυσης. Οι τυφλοί μάρτυρες περιέχουν ίσο όγκο ενεργοποιημένης ιλύος και συνθετικού θρεπτικού μέσου, αλλά δεν περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή τη χημική ουσία αναφοράς. Θα πρέπει να διαλύονται με νερό στον ίδιο όγκο με τα μείγματα δοκιμής και αναφοράς.

Αβιοτικοί μάρτυρες

35. Εάν είναι απαραίτητο, για παράδειγμα εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι γνωστό ή πιθανολογείται ότι έχει ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες, θα πρέπει να παρασκευάζεται μείγμα F_A , για να μετράται η αβιοτική κατανάλωση οξυγόνου. Το μείγμα θα πρέπει να περιέχει τις ίδιες ποσότητες υπό δοκιμή χημικής ουσίας και θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα και τον ίδιο όγκο με τα μείγματα δοκιμής, αλλά να μην περιέχει ενεργοποιημένη ιλύ.

Γενική διαδικασία και μετρήσεις

36. Τα μείγματα δοκιμής, τα μείγματα αναφοράς και οι τυφλοί και οι αβιοτικοί μάρτυρες επωάζονται στη θερμοκρασία δοκιμής υπό συνθήκες αναγκαστικού αερισμού (0,5 - 1 l/min), ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου πάνω από το 60 - 70 % του κορεσμού και να διατηρούνται οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα. Η ανάδευση των καλλιιεργειών είναι επίσης απαραίτητη για να διατηρούνται οι κροκίδες ιλύος σε εναιώρημα. Η επώαση θεωρείται ότι ξεκινά όταν το ενοφθάλμισμα της ενεργοποιημένης ιλύος έρχεται για πρώτη φορά σε επαφή με τα άλλα συστατικά του τελικού μείγματος. Στο τέλος της επώασης, μετά τους καθορισμένους χρόνους έκθεσης, οι οποίοι διαρκούν συνήθως 3 ώρες, τα δείγματα λαμβάνονται για να μετρηθεί ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στην κυψελίδα που προορίζεται για τον συγκεκριμένο σκοπό (σχήμα 2 του προσαρτήματος 3) ή σε πλήρως γεμάτη φιάλη BOD. Ο τρόπος με τον οποίο ξεκινά η επώαση εξαρτάται επίσης από τη χωρητικότητα του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για να μετρηθούν οι ρυθμοί κατανάλωσης οξυγόνου. Για παράδειγμα, εάν περιλαμβάνει έναν μόνο αισθητήρα οξυγόνου, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται μεμονωμένα. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να παρασκευάζονται τα διάφορα μείγματα που είναι αναγκαία για τη δοκιμή με συνθετικά απόβλητα, χωρίς να προστίθεται το ενοφθάλμισμα, και οι απαιτούμενες ποσότητες ιλύος θα πρέπει να προστίθενται σε κάθε δοχείο της σειράς. Κάθε επώαση θα πρέπει να ξεκινά με τη σειρά, ανά κατάλληλα χρονικά διαστήματα, π.χ. 10 έως 15 λεπτών. Εναλλακτικά, το σύστημα μέτρησης μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερους από έναν αισθητήρες οι οποίοι διευκολύνουν τις πολλαπλές ταυτόχρονες μετρήσεις· σ' αυτή την περίπτωση, το εμβόλιο μπορεί να προστίθεται την ίδια στιγμή στις κατάλληλες ομάδες δοχείων.
37. Η ονομαστική συγκέντρωση ενεργοποιημένης ιλύος σε όλα τα δείγματα δοκιμής και αναφοράς και στους τυφλούς (αλλά όχι αβιοτικούς) μάρτυρες είναι 1,5 g/l των αιωρούμενων στερεών. Η κατανάλωση οξυγόνου θα πρέπει να μετράται έπειτα από έκθεση 3 ωρών. Κατά περίπτωση, θα πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις έπειτα από επιπλέον έκθεση διάρκειας 30 λεπτών, όπως περιγράφεται προηγουμένως στο σημείο 5.

Νιτροποιητική ικανότητα της ιλύος

38. Για να αποφασιστεί κατά πόσον η ιλύς έχει την ικανότητα να νιτροποιεί και, εάν ναι, με ποιο ρυθμό, θα πρέπει να παρασκευαστούν μείγματα (F_B), όπως τα μείγματα τυφλών μαρτύρων και τα άλλα μείγματα "ελέγχου" (F_N), τα οποία όμως περιέχουν επίσης N-αλλυλοθειουρία σε αναλογία 11,6 mg/l. Τα μείγματα θα πρέπει να αερίζονται και να επωάζονται σε θερμοκρασία $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ επί 3 ώρες. Ακολούθως, θα πρέπει να μετρώνται οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου και να υπολογίζεται ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης.

Μοντέλα δοκιμών

Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών

39. Εκτελείται προκαταρκτική δοκιμή, κατά περίπτωση, για να εκτιμηθεί το εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που είναι απαραίτητες στην οριστική δοκιμή για τον προσδιορισμό της αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου. Εναλλακτικά, η απουσία αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου από την υπό δοκιμή χημική ουσία στο πλαίσιο προκαταρκτικής δοκιμής μπορεί να αποδεικνύει ότι η οριστική δοκιμή είναι περιττή. Ωστόσο, θα πρέπει να διενεργούνται δοκιμές εις τριπλούν με την υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της προκαταρκτικής δοκιμής (κατά κανόνα 1 000 mg/l· τιμή η οποία εξαρτάται από τις απαιτήσεις δεδομένων).

Πίνακας 1

Παραδείγματα μειγμάτων για την προκαταρκτική δοκιμή

| Αντιδραστήριο | Αρχική συγκέντρωση | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας | 10 g/l | | | | |
| Διάλυμα παρακαταθήκης συνθετικού θρεπτικού μέσου | Βλ. σημείο 16 | | | | |
| Εναιώρημα παρακαταθήκης ενεργοποιημένης ιλύος | 3 g/l αιωρούμενα στερεά | | | | |
| Συστατικά των μειγμάτων | Χορήγηση δόσεων στα δοχεία δοκιμής ^(α) | | | | |
| | F _{T1} | F _{T2} | F _{T3-5} | F _{B1-2} | F _A |
| Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml) (σημεία 19 έως 21) | 0,5 | 5 | 50 | 0 | 50 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης θρεπτικού υλικού από συνθετικά απόβλητα (ml) (σημείο 16) | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Εναιώρημα ενεργοποιημένης ιλύος (ml) (σημεία 26 έως 29) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Νερό (σημείο 15) | 233,5 | 229 | 184 | 234 | 434 |
| Συνολικός όγκος των μειγμάτων (ml) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Συγκεντρώσεις στο μείγμα | | | | | |
| Εναιώρημα δοκιμής (mg/l) Ενεργοποιημένη ιλύς | 10 | 10 | 1 000 | 0 | 1 000 |
| (αιωρούμενα στερεά) (mg/l) | 1 500 | 1 500 | 1 500 | 1 500 | 0 |

^(α) Θα πρέπει να ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη χημική ουσία αναφοράς, για να λαμβάνονται φιάλες F_{R1-3}.

40. Στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. 10 mg/l, 100 mg/l και 1 000 mg/l με έναν τυφλό μάρτυρα και, αν είναι απαραίτητο, τουλάχιστον τρεις αβιοτικοί μάρτυρες με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. ενδεικτικά τον πίνακα 1). Στην ιδανική περίπτωση, η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν θα πρέπει να έχει καμία επίδραση στην κατανάλωση οξυγόνου. Εάν κρίνεται σκόπιμο, θα πρέπει να υπολογίζονται οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου και ο ρυθμός νιτροποίησης στη συνέχεια, θα πρέπει να υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής. Ανάλογα με τον σκοπό της δοκιμής, είναι επίσης πιθανό να προσδιορίζεται απλώς η τοξικότητα μιας οριακής συγκεντρώσεως, π.χ. 1 000 mg/l. Εάν δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε αυτή τη συγκέντρωση, δεν είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι δυσδιάλυτες στο νερό ουσίες, τα μείγματα των οποίων τα συστατικά παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό υδατοδιαλυτότητας και οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει να ζυγίζονται απευθείας στα δοχεία δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος που προσορίζεται για το διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να αντικαθίσταται με νερό αραίωσης.

Οριστική δοκιμή

Αναστολή της συνολικής πρόσληψης οξυγόνου

41. Στη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα εύρος συγκεντρώσεων που να προκύπτει από την προκαταρκτική δοκιμή. Για τον υπολογισμό της NOEC και της EC_x (π.χ. EC₅₀) συνιστάται, στις περισσότερες περιπτώσεις, να χρησιμοποιούνται έξι μάρτυρες και πέντε συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά με πέντε επαναλήψεις. Η δοκιμή με τον αβιοτικό μάρτυρα δεν χρειάζεται να επαναληφθεί, εάν δεν υπήρξε πρόσληψη οξυγόνου κατά την προκαταρκτική δοκιμή, αλλά, εάν συντελείται σημαντική πρόσληψη, τότε θα πρέπει να περιλαμβάνονται αβιοτικοί μάρτυρες για κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η ευαισθησία της ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται με τη βοήθεια της ουσίας αναφοράς 3,5-διχλωροφαινόλη. Η ευαισθησία της ιλύος θα πρέπει να ελέγχεται για κάθε σειρά δοκιμών, αφού είναι γνωστό ότι η ευαισθησία παρουσιάζει διακυμάνσεις. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα λαμβάνονται από τα δοχεία δοκιμής έπειτα από 3 ώρες, και μετά την πάροδο επιπλέον 30 λεπτών, αν κρίνεται αναγκαίο, για να μετρηθεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου στην κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου. Οι συγκεκριμένοι ρυθμοί αναπνοής του μάρτυρα και των μειγμάτων δοκιμής υπολογίζονται με βάση τα στοιχεία που συλλέγονται στη συνέχεια, υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής με βάση την εξίσωση 7 κατωτέρω.

Διαφοροποίηση μεταξύ της αναστολής της ετεροτροφικής αναπνοής και της νιτροποίησης

42. Η χρήση του ειδικού αναστολέα της νιτροποίησης, ATU, επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των ανασταλτικών επιδράσεων που έχουν οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες στην ετεροτροφική οξείδωση και, εάν αφαιρεθεί ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου παρουσία της ATU από τον συνολικό ρυθμό πρόσληψης (χωρίς την παρουσία ATU), μπορούν να υπολογιστούν οι επιδράσεις στον ρυθμό νιτροποίησης. Θα πρέπει να παρασκευάζονται δύο σειρές μειγμάτων αντίδρασης σύμφωνα με τα μοντέλα δοκιμών για την EC₅₀ ή την NOEC τα οποία περιγράφονται στο σημείο 41, αλλά, συμπληρωματικά, η ATU θα πρέπει να προστίθεται σε κάθε μείγμα της μίας από τις δύο σειρές σε τελική συγκέντρωση 11,6 mg/l, που έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει πλήρως τη νιτροποίηση σε ιλύ που περιλαμβάνει αιωρούμενα στερεά σε συγκεντρώσεις έως 3 000 mg/l (4). Οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να μετρώνται μετά την περίοδο έκθεσης· αυτές οι άμεσες τιμές εκφράζουν μόνο την ετεροτροφική αναπνοή, οι δε διαφορές μεταξύ αυτών των τιμών και των αντίστοιχων ρυθμών ολικής αναπνοής εκφράζουν τη νιτροποίηση. Στη συνέχεια, υπολογίζονται οι διάφοροι βαθμοί αναστολής.

Μετρήσεις

43. Μετά την(τις) περίοδο(όδους) έκθεσης, θα πρέπει να μεταφερθεί ένα δείγμα από το πρώτο δοχείο αερισμού στην κυψελίδα που περιέχει ηλεκτρόδιο οξυγόνου (σχήμα 1 του προσαρτήματος 2) και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να μετριέται αμέσως. Σε περίπτωση συστήματος με περισσότερα από ένα ηλεκτρόδια, οι μετρήσεις μπορούν να γίνονται ταυτόχρονα. Είναι σημαντικό η ανάδευση (με τη βοήθεια καλυμμένου μαγνήτη) να γίνεται με την ίδια ταχύτητα με εκείνη που χρησιμοποιείται όταν το ηλεκτρόδιο βαθμονομείται, ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο καθέτηρας ανταποκρίνεται με την ελάχιστη δυνατή καθυστέρηση στη μεταβολή των συγκεντρώσεων οξυγόνου, και να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν τακτικές και αναπαραγώγιμες μετρήσεις οξυγόνου στα δοχεία μέτρησης. Συνήθως, το σύστημα αυτοκινούμενου ανιχνευτήρα ανάδευσης που περιέχει ορισμένα ηλεκτρόδια οξυγόνου θεωρείται κατάλληλο. Η κυψελίδα θα πρέπει να εκπλένεται με νερό έπειτα από κάθε μέτρηση. Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιείται για την πλήρωση μιας φιάλης BOD (σχήμα 2 του προσαρτήματος 3) η οποία να διαθέτει μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, θα πρέπει να εισάγεται στον λαιμό της φιάλης ένας αισθητήρας οξυγόνου με προσαρμοστικό κολάρο και να τίθεται σε λειτουργία ο μαγνητικός αναδευτήρας. Και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να μετριέται συνεχώς και να καταγράφεται για περίοδο διάρκειας 5 έως 10 λεπτών, συνήθως, ή έως ότου η συγκέντρωση οξυγόνου μειωθεί σε επίπεδα κάτω των 2 mg/l. Το ηλεκτρόδιο θα πρέπει να αφαιρείται, το μείγμα θα πρέπει να μεταφέρεται εκ νέου στο δοχείο αερισμού και η διαδικασία αερισμού και ανάδευσης θα πρέπει να συνεχίζεται, εάν κριθεί αναγκαία η μέτρηση έπειτα από μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης.

Επαλήθευση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

44. Για ορισμένους σκοπούς, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να μετρηθεί η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης που περιέχουν:

- δυσδιάλυτες στο νερό ουσίες,
- μείγματα με συστατικά τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό υδατοδιαλυτότητας, ή
- ευδιάλυτες στο νερό ουσίες, στις οποίες όμως η συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης προσεγγίζει το μέγιστο όριο υδατοδιαλυτότητας,

το διαλυμένο κλάσμα είναι άγνωστο, και η πραγματική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μεταφέρεται στα δοχεία δοκιμής δεν είναι γνωστή. Για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης, είναι απαραίτητη η αναλυτική εκτίμηση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής. Για λόγους διευκόλυνσης, η αναλυτική εκτίμηση θα πρέπει να πραγματοποιείται πριν από την προσθήκη του ενοφθαλμίσματος. Επειδή στα δοχεία δοκιμής θα μεταφέρονται μόνο διαλυμένα κλάσματα, οι συγκεντρώσεις που θα μετρώνται ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χαμηλές.

45. Για να αποφευχθούν χρονοβόρες και δαπανηρές αναλύσεις, συνιστάται να ζητείται απλώς η υπό δοκιμή χημική ουσία απευθείας μέσα στα δοχεία δοκιμής και, για μεταγενέστερους υπολογισμούς, να λαμβάνεται ως βάση η αρχική ονομαστική συγκέντρωση που ζητήθηκε. Δεν είναι απαραίτητο να γίνεται διαφοροποίηση μεταξύ διαλυμένων, αδιάλυτων ή προσροφημένων κλασμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, γιατί όλα αυτά τα κλάσματα εμφανίζονται υπό πραγματικές συνθήκες και στους σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων και ενδέχεται να ποικίλλουν ανάλογα με τη σύνθεση των λυμάτων. Ο σκοπός της μεθόδου δοκιμής είναι να εκτιμηθεί ρεαλιστικά η μη ανασταλτική συγκέντρωση και δεν ενδείκνυται να εξετάζεται λεπτομερώς ποια κλάσματα συμβάλλουν στην αναστολή των οργανισμών της ενεργοποιημένης ιλύος. Τέλος, οι προσροφητικές ουσίες θα πρέπει επίσης να ζητούνται απευθείας μέσα στα δοχεία δοκιμής, για τα οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται σιλανιωμένο γυαλί, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες μέσω της προσρόφησης.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Υπολογισμός των ρυθμών πρόσληψης οξυγόνου

46. Οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να υπολογίζονται με βάση τον μέσο όρο των μετρούμενων τιμών, π.χ. με βάση το γραμμικό τμήμα των γραφημάτων της συγκέντρωσης οξυγόνου συναρτήσει του χρόνου, ενώ οι υπολογισμοί θα πρέπει να περιορίζονται στις συγκεντρώσεις οξυγόνου μεταξύ 2,0 mg/l και 7,0 mg/l, αφού οι υψηλότερες και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί, με τη σειρά τους, να επηρεάσουν τους ρυθμούς κατανάλωσης. Μερικές φορές είναι αναπόφευκτο και αναγκαίο να χρησιμοποιούνται ζώνες συγκεντρώσεων που βρίσκονται πάνω ή κάτω από αυτές τις τιμές, π.χ. όταν η αναπνοή καταστέλλεται έντονα και, κατά συνέπεια, γίνεται πολύ αργή ή εάν μια συγκεκριμένη ενεργοποιημένη ιλύς αναπνέει πολύ γρήγορα. Αυτό είναι αποδεκτό, υπό τον όρο ότι τα διευρυμένα τμήματα της καμπύλης πρόσληψης είναι ευθύγραμμα και η κλίση τους δεν μεταβάλλεται όταν περνά από τα όρια των 2,0 mg/l ή 7,0 mg/l O₂. Τα τυχόν μη ευθύγραμμα τμήματα της καμπύλης δηλώνουν ότι το σύστημα μέτρησης σταθεροποιείται ή ότι ο ρυθμός πρόσληψης μεταβάλλεται, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των ρυθμών αναπνοής. Ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να εκφράζεται σε χιλιοστογραμμάρια ανά λίτρο ανά ώρα (mg/lh) ή σε χιλιοστογραμμάρια ανά γραμμάριο ξηρής ιλύος ανά ώρα (mg/gh). Ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου, R, σε mg/lh, μπορεί να υπολογίζεται ή να παρεμβάλλεται με βάση το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης της καταγεγραμμένης μείωσης του οξυγόνου σύμφωνα με την εξίσωση 1:

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

όπου:

Q₁ είναι η συγκέντρωση οξυγόνου στην αρχή του επιλεγμένου ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης (mg/l).

Q₂ είναι η συγκέντρωση οξυγόνου στο τέλος του επιλεγμένου ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης (mg/l).

Δ_t είναι το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο μετρήσεων (min).

47. Ο ειδικός ρυθμός αναπνοής (R_s) εκφράζεται ως η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται ανά γραμμάριο ξηρού βάρους της ιλύος ανά ώρα (mg/gh), σύμφωνα με την εξίσωση 2:

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

όπου SS είναι η συγκέντρωση αιωρούμενων στερών στο μείγμα δοκιμής (g/l).

48. Οι διάφοροι δείκτες του R που μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους είναι οι εξής:

S ειδικός ρυθμός

T συνολικός ρυθμός αναπνοής

N ρυθμός αναπνοής λόγω νιτροποίησης

H ρυθμός ετεροτροφικής αναπνοής

A ρυθμός αναπνοής λόγω αβιοτικών διεργασιών

B ρυθμός αναπνοής με βάση τυφλές δοκιμασίες (μέσος όρος)

Υπολογισμός του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης

49. Η σχέση μεταξύ ολικής αναπνοής (R_T), αναπνοής λόγω νιτροποίησης (R_N) και ετεροτροφικής αναπνοής (R_H) δίνεται από την εξίσωση 3:

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

όπου:

R_N είναι ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης (mg/lh).

R_T είναι ο μετρηθείς ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου από τον τυφλό μάρτυρα (χωρίς ATU· F_B) (mg/lh).

R_H είναι ο μετρηθείς ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου από τον τυφλό μάρτυρα με την προσθήκη ATU (F_N) (mg/lh).

50. Η σχέση αυτή ισχύει για τις τιμές των τυφλών μαρτύρων (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), των αβιοτικών μαρτύρων (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) και των δοκιμασιών με υπό δοκιμή χημικές ουσίες (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Οι ειδικοί ρυθμοί αναπνοής υπολογίζονται ως εξής:

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

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

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

51. Εάν η τιμή του R_N είναι αμελητέα (π.χ. < 5 % του R_T στους τυφλούς μάρτυρες) κατά την προκαταρκτική δοκιμή, μπορεί να υποτεθεί ότι η ετεροτροφική πρόσληψη οξυγόνου ισούται με την ολική πρόσληψη και ότι δεν συντελείται νιτροποίηση. Εάν οι δοκιμές εξετάζουν τις επιδράσεις στους ετεροτροφικούς και τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εναλλακτική πηγή ενεργοποιημένης ιλύος. Διενεργείται οριστική δοκιμή εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι ρυθμοί πρόσληψης οξυγόνου καταστρέφονται σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπολογισμός του ποσοστού αναστολής

52. Το ποσοστό αναστολής, I_T , της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δίνεται από την εξίσωση 7:

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

53. Ομοίως, το ποσοστό αναστολής της ετεροτροφικής πρόσληψης οξυγόνου, I_H , σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δίνεται από την εξίσωση 8:

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

54. Τέλος, η αναστολή της πρόσληψης οξυγόνου λόγω νιτροποίησης, I_N , σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δίνεται από την εξίσωση 9:

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

55. Το ποσοστό αναστολής της πρόσληψης οξυγόνου θα πρέπει να σχεδιάζεται ως συνάρτηση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (καμπύλη αναστολής, βλ. σχήμα 3 του προσαρτήματος 4). Καμπύλες αναστολής σχεδιάζονται για κάθε περίοδο αερισμού διάρκειας 3 ωρών ή έπειτα από την πάροδο επιπλέον 30 λεπτών. Η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αναστέλλει την πρόσληψη οξυγόνου κατά 50 % (EC_{50}) θα πρέπει να υπολογίζεται ή να παρεμβάλλεται με βάση τη συγκεκριμένη καμπύλη. Εάν είναι διαθέσιμα τα κατάλληλα στοιχεία, μπορούν να υπολογιστούν ή να παρεμβληθούν τα όρια εμπιστοσύνης 95 % της EC_{50} , η κλίση της καμπύλης και οι κατάλληλες τιμές που σηματοδοτούν την αρχή της αναστολής (π.χ. EC_{10} ή EC_{20}) και το τέλος της αναστολής (π.χ. EC_{80} ή EC_{90}).

56. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, δεδομένης της συχνά παρατηρούμενης μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων, μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να αρκεί να εκφραστούν τα αποτελέσματα και κατά τάξεις μεγέθους, π.χ.:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ 1 mg/l έως 10 mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ 10 mg/l έως 100 mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων EC_x

57. Οι τιμές της EC_x , συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο, υπολογίζονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους [π.χ. ανάλυση Probit, λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull, απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Kärber ή απλή παρεμβολή (11)]. Η EC_x λαμβάνεται εάν εισαχθεί στην εξίσωση τιμή που να αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x , οι μέσοι όροι ανά αγωγή (x) θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

Εκτίμηση NOEC

58. Εάν εφαρμόζεται στατιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό της NOEC, είναι απαραίτητο να υπάρχουν στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (κάθε μεμονωμένο δοχείο θεωρείται πανομοιότυπο). Θα πρέπει να ακολουθούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι σύμφωνα με το έγγραφο του ΟΟΣΑ με τίτλο Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται μέσω μονόπλευρου (μικρότερου) ελέγχου στατιστικής υπόθεσης με $p \leq 0,05$.

Έκθεση δοκιμής

59. Στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

- κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, καθαρότητα·
- φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. $\log K_{ow}$, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και πιθανά στοιχεία σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. προσρόφηση σε ενεργοποιημένη ιλύ·

Σύστημα δοκιμής

- πηγή, συνθήκες λειτουργίας του σταθμού επεξεργασίας λυμάτων και φύση των εισροών που λαμβάνει, συγκέντρωση, προεπεξεργασία και διατήρηση της ενεργοποιημένης ιλύος·

Συνθήκες δοκιμής

- θερμοκρασία δοκιμής, pH κατά τη δοκιμή και διάρκεια της(των) περιόδου(-ων) έκθεσης·

Αποτελέσματα

- ειδική κατανάλωση οξυγόνου των μαρτύρων ($\text{mg O}_2/(\text{g ιλύος} \times \text{h})$ ·
- όλα τα δεδομένα που έχουν μετρηθεί, καμπύλη(-ες) αναστολής και μέθοδος υπολογισμού της EC_{50} ·
- EC_{50} και, εάν είναι δυνατόν, όρια εμπιστοσύνης 95 %, κατά περίπτωση EC_{20} , EC_{80} · ενδεχομένως η NOEC και οι εφαρμοστέες στατιστικές μέθοδοι, εάν δεν μπορεί να προσδιοριστεί η EC_{50} ·
- αποτελέσματα για την ολική αναπνοή και, κατά περίπτωση, για την ετεροτροφική αναπνοή και την αναπνοή λόγω νιτροποίησης·
- αβιοτική πρόσληψη οξυγόνου στον φυσικοχημικό μάρτυρα (που τυχόν χρησιμοποιείται)·
- ονομασία της χημικής ουσίας αναφοράς και αποτελέσματα με τη συγκεκριμένη χημική ουσία·
- κάθε παρατήρηση και παρέκκλιση από την τυποποιημένη διαδικασία που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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) ΟΟΣΑ (1984), Ενεργοποιημένη ιλύς, δοκιμή αναστολής της αναπνοής, κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών 209, Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμές χημικών ουσιών, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
 - (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 (ΕΛΟΤ EN ISO 8192 Ποιότητα νερού — Δοκιμή αναστολής της κατανάλωσης οξυγόνου από την ενεργό ιλύ για την οξείδωση του άνθρακα και του αμμωνίου).
 - (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 — συνοδεύει την κατευθυντήρια γραμμή 209 του ΟΟΣΑ. *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 (ΕΛΟΤ EN ISO 10634 Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρασκευή και την επεξεργασία των ελάχιστα υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων με προοπτική την αξιολόγηση της βιοδιασπασιμότητάς τους σε υδατικό περιβάλλον).
 - (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, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

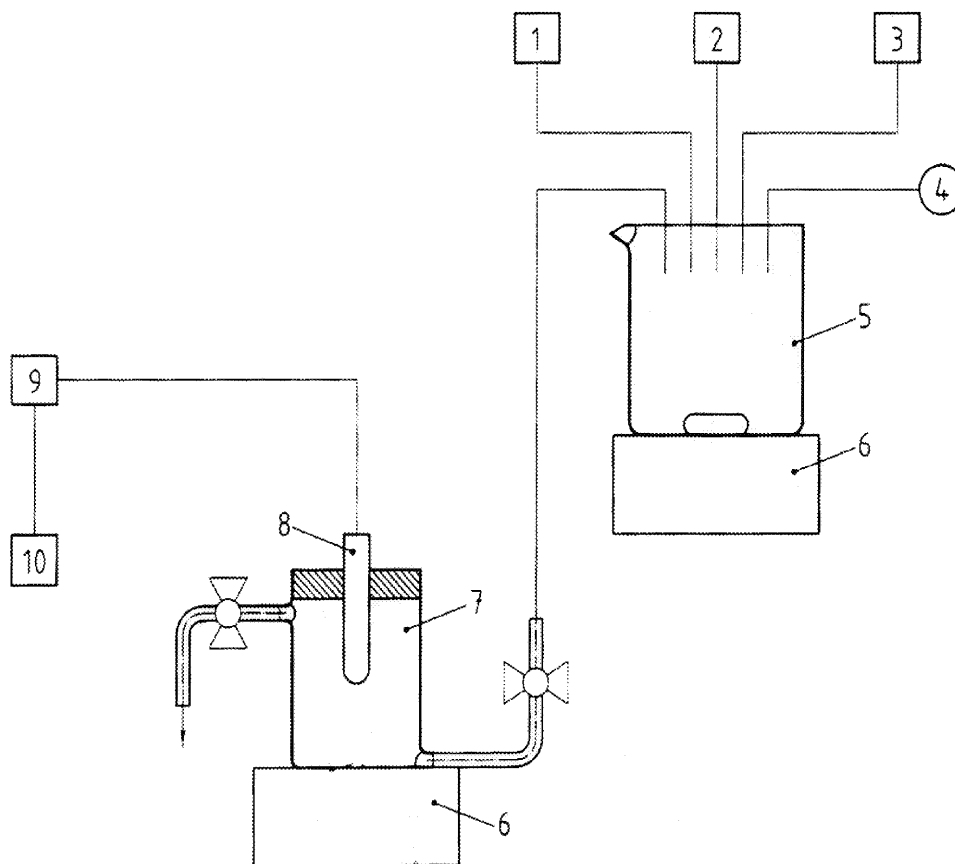
EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, η EC₅₀ είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση στο τελικό σημείο δοκιμής σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Σχήμα 1: Παραδείγματα συσκευών μέτρησης

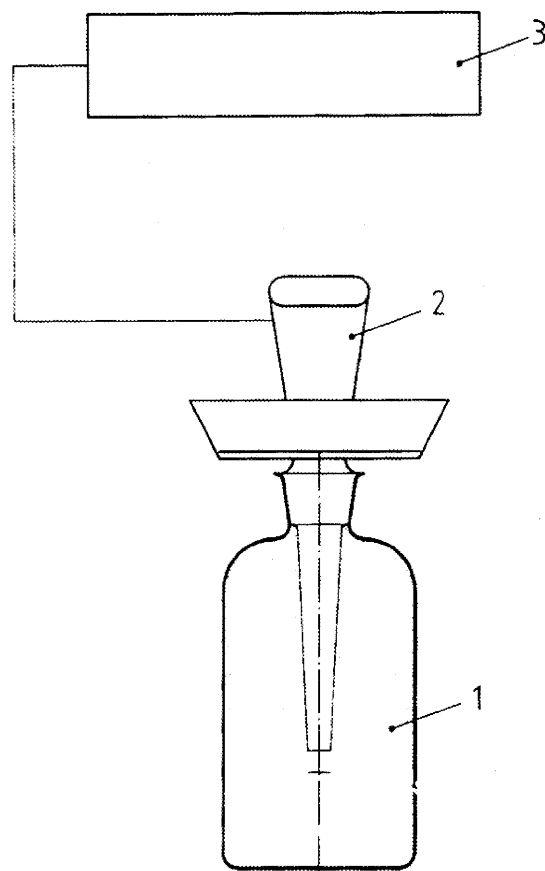


Επεξήγηση

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1 ενεργοποιημένη ιλύς | 6 μαγνητικός αναδευτήρας |
| 2 συνθετικό θρεπτικό μέσο | 7 κυψελίδα μέτρησης οξυγόνου |
| 3 υπό δοκιμή χημική ουσία | 8 ηλεκτρόδιο οξυγόνου |
| 4 αέρας | 9 συσκευή μέτρησης οξυγόνου |
| 5 δοχείο ανάμειξης | 10 καταγραφείας |

Προσάρτημα 3

Σχήμα 2: Παράδειγμα συσκευής μέτρησης με φιάλη BOD

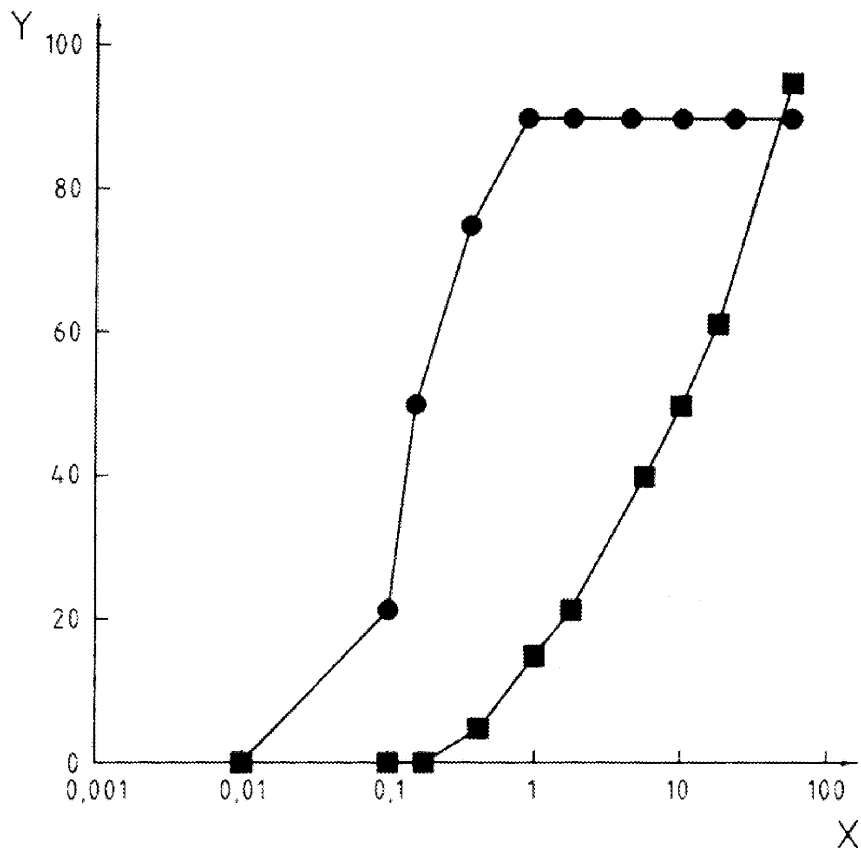


Επεξήγηση

- 1 δοχείο δοκιμής
- 2 ηλεκτρόδιο οξυγόνου
- 3 συσκευή μέτρησης οξυγόνου

Προσάρτημα 4

Σχήμα 3: Παράδειγμα καμπυλών αναστολής



Επεξήγηση

X συγκέντρωση 3,5-δichλωροφαινόλης (mg/l)

Y αναστολή (%)

■ αναστολή ετεροτροφικής αναπνοής με τη χρήση νιτροποιητικής ιλύος

● αναστολή νιτροποίησης με τη χρήση νιτροποιητικής ιλύος»

5) Το κεφάλαιο Γ.26 αντικαθίσταται από το εξής κείμενο:

«Γ.26 ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *LEMNA*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 221 του ΟΟΣΑ (2006). Έχει σχεδιαστεί με σκοπό την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών ουσιών στα υδρόβια φυτά των γλυκών υδάτων του γένους *Lemna* (κοινώς, λέμνα ή φακή του νερού). Βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους (1)(2)(3)(4)(5)(6), αλλά περιλαμβάνει τροποποιήσεις αυτών των μεθόδων, οι οποίες αποτυπώνουν τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνητικών εργασιών και διαβουλεύσεων για ορισμένα ζητήματα καίριας σημασίας. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών επικυρώθηκε με διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ring test) (7).

2. Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται η διεξαγωγή δοκιμών τοξικότητας με χρήση των ειδών *Lemna gibba* και *Lemna minor*, που έχουν αμφότερα μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν το αντικείμενο των προαναφερόμενων προτύπων. Η συστηματική κατάταξη του *Lemna spp.* είναι δύσκολη, γιατί περιπλέκεται από την ύπαρξη πληθώρας φαινοτύπων. Παρόλο που μπορεί να παρουσιαστεί γενετική μεταβλητότητα στην απόκριση της λέμνας σε τοξικούς παράγοντες, τα σχετικά με αυτό το αίτιο μεταβλητότητας δεδομένα δεν επαρκούν, προς το παρόν, ώστε να υποδειχθεί η χρήση συγκεκριμένου κλώνου κατά την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Σημειωτέον ότι η δοκιμή δεν διεξάγεται με αξενικές καλλιέργειες, λαμβάνονται όμως μέτρα σε διάφορα στάδια της διαδικασίας δοκιμής ώστε να ελαχιστοποιείται η μόλυνση από άλλους οργανισμούς.
3. Περιγράφεται λεπτομερώς η διεξαγωγή δοκιμών με ανανέωση (ημιστατικό και συνεχούς ροής σύστημα) και χωρίς ανανέωση (στατικό σύστημα) του διαλύματος δοκιμής. Ανάλογα με τους στόχους της δοκιμής και τις απαιτήσεις των κανονιστικών ρυθμίσεων, συνιστάται να εξετάζεται το ενδεχόμενο εφαρμογής των ημιστατικών και των συνεχών τεχνικών, π.χ. στην περίπτωση των χημικών ουσιών που χάνονται ταχέως από το διάλυμα, λόγω εξάτμισης, φωτοαποικοδόμησης, καθίζησης ή βιοαποικοδόμησης. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (8).
4. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

5. Εκθετικές καλλιέργειες φυτών του γένους *Lemna* αφήνονται να αναπτυχθούν ως μονοκαλλιέργειες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για περίοδο επτά ημερών. Σκοπός της δοκιμής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιδράσεων της χημικής ουσίας στη βλαστική αύξηση κατά την ανωτέρω περίοδο, με βάση εκτιμήσεις των επιλεγμένων μετρούμενων μεταβλητών. Ο αριθμός θαλλών είναι η πρωταρχική μετρούμενη μεταβλητή. Μετράται επίσης τουλάχιστον μία ακόμη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες χημικές ουσίες είναι δυνατόν να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' όση στον αριθμό θαλλών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιδράσεων της χημικής ουσίας, συγκρίνεται η ανάπτυξη στα διαλύματα δοκιμής με εκείνη των μαρτύρων και προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %), η οποία εκφράζεται ως EC_x (π.χ. EC_{50}).
6. Το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, εκφραζόμενη ως λογαριθμική αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Από τους μέσους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης που καταγράφονται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως $E_r C_x$ (π.χ. $E_r C_{50}$).
7. Μία επιπλέον μεταβλητή απόκρισης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι η απόδοση, η οποία ενδέχεται να απαιτείται για τη συμμόρφωση με ειδικές κανονιστικές απαιτήσεις σε ορισμένες χώρες. Η απόδοση ορίζεται ως η διαφορά των μετρούμενων μεταβλητών στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον τις μετρούμενες μεταβλητές στην αρχή της περιόδου έκθεσης. Από την απόδοση που καταγράφεται για μια σειρά διαλυμάτων δοκιμής, προσδιορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της απόδοσης κατά συγκεκριμένο ποσοστό x % (π.χ. 50 %) και εκφράζεται ως $E_y C_x$ (π.χ. $E_y C_{50}$).
8. Επιπροσθέτως, μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικά η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) και η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

9. Θα πρέπει να υπάρχει αναλυτική μέθοδος επαρκούς ευαισθησίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.
10. Στις σχετικές με την υπό δοκιμή χημική ουσία πληροφορίες που μπορεί να είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των συνθηκών δοκιμής περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η σταθερότητα στο νερό και στο φως, οι σταθερές pK_a και K_{ow} , η τάση ατμών και η βιοαποικοδομησιμότητα. Η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς του νόμου του Henry, η οποία δείχνει αν είναι πιθανόν να σημειωθούν σημαντικές απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της δοκιμής. Με τον τρόπο αυτό κρίνεται ευκολότερα αν πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερα μέτρα για τον έλεγχο των εν λόγω απωλειών. Σε περίπτωση που τα στοιχεία για τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι αβέβαια, συνιστάται να εκτιμώνται οι ιδιότητες αυτές υπό τις συνθήκες της δοκιμής, δηλαδή με το θρεπτικό μέσο και σε συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

11. Όταν ο έλεγχος του pH του θρεπτικού μέσου δοκιμής έχει ιδιαίτερη σημασία, π.χ. στις δοκιμές μετάλλων ή ασταθών στην υδρόλυση χημικών ουσιών, συνιστάται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό μέσο (βλ. σημείο 21). Περαιτέρω καθοδήγηση για τον έλεγχο χημικών ουσιών που οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δυσχεραίνουν τη δοκιμή τους παρέχονται στη δημοσίευση (8).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού θαλλών στον μάρτυρα πρέπει να είναι μικρότερος από 2,5 ημέρες (60 ώρες), τιμή που αντιστοιχεί περίπου σε επταπλασιασμό εντός επτά ημερών και σε μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $0,275 \text{ ημέρα}^{-1}$. Με τα θρεπτικά μέσα και τις συνθήκες δοκιμής που περιγράφονται στη παρούσα μέθοδο, το κριτήριο αυτό είναι δυνατόν να πληρούται σε στατικό σύστημα δοκιμής (5). Προβλέπεται επίσης ότι αυτό το κριτήριο θα πληρούται υπό συνθήκες ημιστατικής και συνεχούς δοκιμής. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού παρατίθεται στο σημείο 49.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

13. Είναι δυνατόν να υποβληθούν σε δοκιμή μία ή περισσότερες ουσίες αναφοράς, όπως η 3,5-διχλωροφαινόλη που χρησιμοποιήθηκε στη διεθνή δοκιμή δακτυλίου (ging test) (7), προκειμένου να ελεγχθεί η διαδικασία δοκιμής. Είναι σκόπιμο η ουσία αναφοράς να υποβάλλεται σε δοκιμές τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή, σε περίπτωση δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

14. Όλα τα τεμάχια εξοπλισμού που έρχονται σε επαφή με τα θρεπτικά μέσα δοκιμής πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και δοκιμές θα πρέπει να καθαρίζονται, ώστε να απομακρύνονται οι ξένες χημικές ουσίες που θα μπορούσαν να διεσθύνουν στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, και να είναι αποστειρωμένα. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να έχουν ικανό πλάτος, ώστε οι θαλλοί των διαφόρων αποικιών στα δοχεία ελέγχου να μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να αλληλεπικαλύπτονται στο τέλος της δοκιμής. Δεν έχει σημασία αν οι ρίζες αγγίζουν τον πυθμένα των δοχείων δοκιμής· συνιστάται όμως κάθε δοχείο δοκιμής να έχει ελάχιστο βάθος 20 mm και ελάχιστο όγκο 100 ml. Η επιλογή του τύπου του δοχείου δοκιμής δεν έχει κρίσιμη σημασία, εφόσον πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές. Τα γυάλινα ποτήρια ζέσεως, τα δοχεία κρυστάλλωσης ή τα γυάλινα τρυβλία Petri ενδεδειγμένων διαστάσεων έχουν αποδειχθεί όλα κατάλληλα. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να καλύπτονται, ώστε να ελαχιστοποιούνται η εξάτμιση και η τυχαία επιμόλυνση, και, παράλληλα, να είναι δυνατή η αναγκαία ανταλλαγή αέρα. Τα κατάλληλα δοχεία δοκιμής, και ιδίως τα καλύμματα, πρέπει να αποτρέπουν τη σκίαση και τις αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά του φωτός.
15. Οι καλλιέργειες και τα δοχεία δοκιμής δεν θα πρέπει να φυλάσσονται μαζί. Ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση χωριστών θαλάμων, επωαστήρων ή δωμάτων ανάπτυξης σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ο φωτισμός και η θερμοκρασία πρέπει να μπορούν να ρυθμίζονται και να διατηρούνται σταθερά (βλ. σημεία 35-36).

Οργανισμός δοκιμής

16. Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα δοκιμή είναι είτε ο *Lemna gibba* είτε ο *Lemna minor*. Σύντομες περιγραφές των ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές τοξικότητας παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Το φυτικό υλικό μπορεί να λαμβάνεται από συλλογή καλλιεργειών, από άλλο εργαστήριο ή από τον αγρό. Εάν τα φυτά συλλέγονται στον αγρό, θα πρέπει να διατηρούνται σε καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό μέσο με εκείνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, τουλάχιστον για οκτώ εβδομάδες πριν από τη χρήση τους. Οι αγροί από τους οποίους συλλέγονται τα φυτά των αρχικών καλλιεργειών πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς πηγές μόλυνσης. Εάν τα φυτά λαμβάνονται από άλλο εργαστήριο ή από συλλογή καλλιεργειών, θα πρέπει να διατηρούνται υπό ανάλογες συνθήκες για χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών εβδομάδων. Θα πρέπει πάντα να αναφέρονται η πηγή του φυτικού υλικού, καθώς και το είδος και ο κλώνος (εφόσον είναι γνωστός) που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή.
17. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονοκαλλιέργειες εμφανώς απαλλαγμένες από επιμόλυνση από άλλους οργανισμούς, όπως φύκη και πρωτόζωα. Τα υγιή φυτά του είδους *L. minor* συνιστανται σε αποικίες που περιλαμβάνουν δύο έως πέντε θαλλούς, ενώ οι υγιείς αποικίες του *L. gibba* είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν έως επτά θαλλούς.
18. Η ποιότητα και η ομοιομορφία των φυτών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή επηρεάζουν σημαντικά την έκβαση της και, συνεπώς, πρέπει να επιλέγονται επιμελώς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά, χωρίς ορατές αλλοιώσεις ή αποχρωματισμό (χλώρωση). Οι καλλιέργειες καλής ποιότητας χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης αποικιών με δύο τουλάχιστον θαλλούς. Ο μεγάλος αριθμός μεμονωμένων θαλλών αποτελεί ένδειξη περιβαλλοντικής καταπόνησης, π.χ. περιορισμός θρεπτικών στοιχείων, και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή φυτικό υλικό από τέτοιες καλλιέργειες.

Καλλιέργεια

19. Για να μειωθεί η συχνότητα διατήρησης της καλλιέργειας (π.χ. όταν δεν έχουν προγραμματιστεί δοκιμές σε λέμνα για κάποιο διάστημα), οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε συνθήκες ελαττωμένου φωτισμού και ελαττωμένης θερμοκρασίας (4-10 °C). Λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια παρέχονται στο προσάρτημα 3. Τα εμφανή σημεία επιμόλυνσης από φύκη ή άλλους οργανισμούς μπορεί να επιβάλλουν την επιφανειακή αποστείρωση ενός επιμέρους δείγματος θαλλών λέμνας, ακολουθούμενη από μεταφορά σε πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο (βλ. προσάρτημα 3). Στην περίπτωση αυτή, η υπόλοιπη επιμολυσμένη καλλιέργεια θα πρέπει να απορρίπτεται.
20. Τουλάχιστον επτά ημέρες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, επαρκής αριθμός αποικιών μεταφέρεται ασηπτικά σε στείρο θρεπτικό μέσο πρόσφατης παρασκευής και καλλιεργείται για 7-10 ημέρες υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής

21. Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά μέσα για το *Lemna minor* και το *Lemna gibba*, τα οποία περιγράφονται κατωτέρω. Θα πρέπει να μελετάται με προσοχή η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό μέσο δοκιμής [4-μορφολινο-προπανοσουλφονικό οξύ (MOPS, αριθ. CAS: 1132-61-2) στο θρεπτικό μέσο για το *L. minor* και NaHCO₃ στο θρεπτικό μέσο για το *L. gibba*], εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι ενδέχεται να αντιδράσει με την υπό δοκιμή χημική ουσία και να επηρεάσει την έκφραση της τοξικότητάς της. Αποδεκτό είναι επίσης το θρεπτικό μέσο Steinberg (9), εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.
22. Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. minor* συνιστάται τροποποιημένη έκδοση του θρεπτικού μέσου για τη λέμνα του Σουηδικού Ινστιτούτου Προτύπων (SIS). Η σύνθεση αυτού του θρεπτικού μέσου παρατίθεται στο προσάρτημα 4.
23. Για την καλλιέργεια και τις δοκιμές σε *L. gibba* συνιστάται το θρεπτικό μέσο 20X — AAP, που περιγράφεται στο προσάρτημα 4.
24. Κατάλληλο για το είδος *L. minor* είναι και το περιγραφόμενο στο προσάρτημα 4 θρεπτικό μέσο Steinberg, το οποίο, ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το *L. gibba*, εφόσον πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας.

Διαλύματα δοκιμής

25. Τα διαλύματα δοκιμής παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση διαλυμάτων παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρασκευάζονται, κατά κανόνα, με διάλυση της χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο.
26. Η υψηλότερη συγκέντρωση δοκιμής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει κανονικά να μην υπερβαίνει την υδατοδιαλυτότητα της χημικής ουσίας υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα φυτά *Lemna* spp. επιπλέον στην επιφάνεια και είναι δυνατόν να εκτεθούν σε χημικές ουσίες που συσσωρεύονται στη μεσεπιφάνεια νερού-αέρα (π.χ. δυσδιάλυτες στο νερό ή υδρόφοβες ή επιφανειοδραστικές χημικές ουσίες). Στις περιπτώσεις αυτές, η έκθεση θα οφείλεται σε υλικό που δεν είναι διαλυμένο, οι δε συγκεντρώσεις δοκιμής μπορεί να υπερβαίνουν την υδατοδιαλυτότητα, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε περίπτωση υπό δοκιμή χημικών ουσιών χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητο να παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης ή διασπορά της χημικής ουσίας με τη βοήθεια οργανικού διαλύτη ή μέσου διασποράς, ώστε να διευκολύνεται η προσθήκη ακριβών ποσοτήτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο θρεπτικό μέσο δοκιμής και να υποβοηθούνται η διασπορά και η διάλυσή της. Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών. Η χρήση βοηθητικών διαλυτών ή μέσων διασποράς δεν θα πρέπει να προκαλεί φυτοτοξικότητα. Για παράδειγμα, μεταξύ των διαλυτών ευρείας χρήσης που δεν προκαλούν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις έως 100 μL/l περιλαμβάνονται η ακετόνη και το διμεθυλοφορμαμίδιο. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης ή μέσο διασποράς, η τελική του συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται, να διατηρείται στο ελάχιστο επίπεδο (≤ 100 μl/l) και να είναι η ίδια σε κάθε αγωγή και μάρτυρα. Περαιτέρω καθοδήγηση για τη χρήση μέσων διασποράς παρέχεται στη δημοσίευση (8).

Ομάδες δοκιμής και ελέγχου

27. Η προηγούμενη γνώση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τη λέμνα, π.χ. μέσω δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών, διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Στην οριστική δοκιμή τοξικότητας θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής, διατεταγμένες σε γεωμετρική πρόοδο. Κατά προτίμηση, ο λόγος πρόοδου θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 3,2, αλλά επιτρέπεται να χρησιμοποιείται υψηλότερη τιμή, εάν η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης είναι επίπεδη. Εάν χρησιμοποιούνται λιγότερες από πέντε συγκεντρώσεις, η επιλογή αυτή θα πρέπει να αιτιολογείται. Σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις.

28. Για τον καθορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής (για τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών και/ή για την οριστική δοκιμή τοξικότητας), θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:
- Για τον προσδιορισμό της EC_{50} , η τιμή της θα πρέπει να περιλαμβάνεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, ώστε να εξασφαλίζεται το ενδεδειγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Για παράδειγμα, εάν πρόκειται να εκτιμηθεί η EC_{50} , η υψηλότερη συκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή EC_{50} . Εάν η τιμή EC_{50} βρίσκεται εκτός του εύρους των συγκεντρώσεων δοκιμής, τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης θα είναι μεγάλα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ενδεχομένως αδύνατη η ορθή αξιολόγηση της στατιστικής προσαρμογής του μοντέλου.
 - Εάν το ζητούμενο είναι η εκτίμηση των LOEC/NOEC, η χαμηλότερη συκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως χαμηλή, ώστε η ανάπτυξη να μην είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Επιπλέον, η υψηλότερη συκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι αρκούντως υψηλή, ώστε η ανάπτυξη να είναι σημαντικά μικρότερη από την ανάπτυξη του μάρτυρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων (εκτός εάν η υψηλότερη συκέντρωση βρίσκεται στο όριο διαλυτότητας ή το μέγιστο απαιτούμενο όριο συκέντρωσης, π.χ. 100 mg/l).
29. Κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνει μάρτυρες που συνίστανται σε θρεπτικό μέσο, αριθμό θαλλών και αποικιών, συνθήκες περιβάλλοντος και διαδικασίες ίδια με εκείνα των δοχείων δοκιμής, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν χρησιμοποιείται βοηθητικός διαλύτης ή μέσο διασποράς, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται πρόσθετη αγωγή ελέγχου με τον διαλύτη/μέσο διασποράς στην ίδια συκέντρωση με τη χρησιμοποιούμενη στα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ο αριθμός των πανομοιότυπων δοχείων ελέγχου (και, κατά περίπτωση, των δοχείων με τον διαλύτη) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος και, στην ιδανική περίπτωση, διπλάσιος από τον αριθμό των δοχείων που χρησιμοποιούνται για κάθε συκέντρωση δοκιμής.
30. Εάν δεν απαιτείται προσδιορισμός της NOEC, ο σχεδιασμός της δοκιμής είναι δυνατόν να τροποποιηθεί, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των συγκεντρώσεων και να μειωθεί ο αριθμός των δοχείων ανά συκέντρωση. Ωστόσο, τα δοχεία ελέγχου πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία.

Έκθεση

31. Αποικίες αποτελούμενες από 2 έως 4 ορατούς θαλλούς μεταφέρονται από την καλλιέργεια του ενοφθαλμίσματος ασηπτικά και με τυχαίοποιημένη κατανομή μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Κάθε δοχείο δοκιμής θα πρέπει να περιέχει συνολικά 9 έως 12 θαλλούς. Ο αριθμός των θαλλών και των αποικιών θα πρέπει να είναι ο ίδιος σε κάθε δοχείο δοκιμής. Η εμπειρία από την παρούσα μέθοδο και τα δεδομένα της δοκιμής δακτυλίου δείχνουν ότι η διεξαγωγή τριών επαναλήψεων ανά αγωγή, κατά την οποία κάθε δοχείο περιέχει αρχικά 9 έως 12 θαλλούς, αρκεί για την ανίχνευση διαφορών στην ανάπτυξη περίπου της τάξης του 4 έως 7 %, όταν η αναστολή υπολογίζεται με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης (10 έως 15 %, όταν υπολογίζεται με βάση την απόδοση) μεταξύ των ομάδων αγωγής (7).
32. Απαιτείται τυχαίοποιημένος σχεδιασμός για τη θέση των δοχείων δοκιμής στον επωαστήρα, ώστε να ελαχιστοποιείται η επιρροή των χωρικών διαφορών ως προς τη φωτεινή ένταση ή τη θερμοκρασία. Απαιτείται επίσης σχεδιασμός κατά συστάδες ή τυχαίοποιημένη επανατοποθέτηση των δοχείων μετά τις παρατηρήσεις (ή συχνότερη αλλαγή θέσης).
33. Εάν από προκαταρκτική δοκιμή σταθερότητας προκύπτει ότι δεν είναι δυνατόν να διατηρηθεί η συκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (δηλ. η μετρούμενη συκέντρωση μειώνεται κάτω του 80 % της μετρηθείσας αρχικής συκέντρωσης) σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής (7 ημέρες), συνιστάται ημιστατικό σύστημα δοκιμής. Στην περίπτωση αυτή, οι αποικίες θα πρέπει να εκτίθενται σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής και ελέγχου τουλάχιστον δύο φορές κατά τη δοκιμή (π.χ. την 3η και την 5η ημέρα). Η συχνότητα έκθεσης στο πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο θα εξαρτάται από τη σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: ενδέχεται να χρειαστεί μεγαλύτερη συχνότητα για τη διατήρηση σχεδόν σταθερών συγκεντρώσεων εξαιρετικά ασταθών ή πτητικών χημικών ουσιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να απαιτείται συνεχής διαδικασία (8)(10).
34. Το σενάριο έκθεσης μέσω εφαρμογής στο φύλλωμα (ψεκασμός) δεν καλύπτεται από την παρούσα μέθοδο δοκιμών· βλ. αντ' αυτής δημοσίευση (11).

Συνθήκες επώασης

35. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνεχής φωτισμός με θερμό ή ψυχρό λευκό φως φθορισμού, ώστε να εξασφαλίζεται φωτεινή ένταση η οποία επιλέγεται από το πεδίο τιμών $85\text{-}135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ισοδύναμο με 6 500-10 000 lux), μετρούμενη σε φωτοσυνθετικά ενεργό μήκος κύματος της ακτινοβολίας (400-700 nm), σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θαλλοί της λέμνας. Οι τυχόν διαφορές από την επιλεγμένη φωτεινή ένταση στην επιφάνεια όπου διεξάγεται η δοκιμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το $\pm 15\%$. Η μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης του φωτός, ιδίως δε ο τύπος του αισθητήρα, επηρεάζουν τη μετρούμενη τιμή. Οι σφαιρικοί αισθητήρες (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω και κάτω από το επίπεδο μέτρησης) και οι αισθητήρες συνημιτόνου (που αποκρίνονται στο φως το οποίο εκπέμπεται από όλες τις γωνίες επάνω από το επίπεδο μέτρησης) προτιμώνται έναντι των αισθητήρων μονής κατεύθυνσης και παρέχουν μεγαλύτερες ενδείξεις για τις πολυσημιακές φωτεινές πηγές του είδους που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο.

36. Η θερμοκρασία στα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να είναι 24 ± 2 °C. Το pH του θρεπτικού μέσου ελέγχου δεν θα πρέπει να αυξάνεται κατά περισσότερο από 1,5 μονάδες στη διάρκεια της δοκιμής. Ωστόσο, οι αποκλίσεις πέραν της 1,5 μονάδας δεν ακυρώνουν τη δοκιμή, εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας. Πρέπει να αποδίδεται μεγαλύτερη προσοχή στη μεταβολή του pH σε ειδικές περιπτώσεις, όπως κατά τη δοκιμή ασταθών χημικών ουσιών ή μετάλλων. Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στη δημοσίευση (8).

Διάρκεια

37. Η δοκιμή τερματίζεται 7 ημέρες μετά τη μεταφορά των φυτών στα δοχεία δοκιμής.

Μετρήσεις και αναλυτικοί προσδιορισμοί

38. Στην αρχή της δοκιμής μετράται και καταγράφεται ο αριθμός θαλλών στα δοχεία δοκιμής, με μέριμνα ώστε να καταμετρώνται οι προεξέχοντες ευδιάκριτοι θαλλοί. Οι αριθμοί θαλλών που φαίνονται φυσιολογικοί ή αφύσικοι πρέπει να προσδιορίζονται στην αρχή της δοκιμής, τουλάχιστον μία φορά ανά 3 ημέρες κατά την περίοδο έκθεσης (δηλ. τουλάχιστον 2 φορές στη διάρκεια της επταήμερης περιόδου) και στο τέλος της δοκιμής. Θα πρέπει να σημειώνονται οι αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών (π.χ. μεταβολή του μεγέθους και της εμφάνισης των θαλλών, ενδείξεις νέκρωσης, χλώρωσης ή κυφότητας, θραύση ή απώλεια πλευστότητας των αποικιών), καθώς και στο μήκος και στην όψη των ριζών. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται τα σημαντικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού μέσου δοκιμής (π.χ. παρουσία αδιάλυτων υλικών, ανάπτυξη φυκών στο δοχείο δοκιμής).
39. Εκτός από την καταμέτρηση των θαλλών κατά τη δοκιμή, εκτιμώνται και οι επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και σε μία (ή περισσότερες) από τις ακόλουθες μετρούμενες μεταβλητές:

i) συνολική θαλλική επιφάνεια·

ii) ξηρό βάρος·

iii) υγρό βάρος.

40. Η συνολική θαλλική επιφάνεια παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να προσδιορίζεται σε κάθε δοχείο δοκιμής και ελέγχου στην αρχή, στη διάρκεια και στο τέλος της δοκιμής. Το ξηρό ή το υγρό βάρος θα πρέπει να προσδιορίζεται στην αρχή της δοκιμής, σε δείγμα της καλλιέργειας του ενοφθαλμίσματος το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για την εκκίνηση της δοκιμής, καθώς και στο τέλος της δοκιμής στο φυτικό υλικό κάθε δοχείου δοκιμής και ελέγχου. Εάν δεν μετράται η θαλλική επιφάνεια, προτιμάται το ξηρό βάρος έναντι του υγρού βάρους.

41. Η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος και το υγρό βάρος μπορούν να προσδιορίζονται ως εξής:

i) **Συνολική θαλλική επιφάνεια:** Η συνολική θαλλική επιφάνεια όλων των αποικιών μπορεί να προσδιορίζεται με ανάλυση εικόνων. Είναι δυνατόν να αποτυπώνεται το περίγραμμα του δοχείου δοκιμής και των φυτών με βιντεοκάμερα (δηλ. με τοποθέτηση του δοχείου σε φωτοτράπεζα) και να ψηφιοποιείται η προκύπτουσα εικόνα. Στη συνέχεια, μπορεί να προσδιορίζεται η συνολική θαλλική επιφάνεια σε δοχείο δοκιμής με βαθμονόμηση με επίπεδα σχήματα γνωστού εμβαδού. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τον αποκλεισμό παρεμβολών που οφείλονται στο χέλιος του δοχείου. Εναλλακτική αλλά πιο επίπονη προσέγγιση είναι η λήψη φωτοτυπιών των δοχείων δοκιμής και των φυτών, η αποκοπή του προκύπτοντος περιγράμματος των αποικιών και ο προσδιορισμός της επιφάνειάς τους με αναλυτή φυλλικής επιφάνειας ή χαρτί γραφημάτων. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες τεχνικές (π.χ. αναλογία βάρους χαρτιού μεταξύ της επιφάνειας του περιγράμματος των αποικιών και της μοναδιαίας επιφάνειας).

ii) **Ξηρό βάρος:** Από κάθε δοχείο δοκιμής συλλέγονται όλες οι αποικίες και εκπλύνονται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Στυπώνονται για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού και, κατόπιν, ξηραίνονται στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Τα ενδεχόμενα θραύσματα ριζών θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται. Το ξηρό βάρος θα πρέπει να εκφράζεται με ακρίβεια τουλάχιστον 0,1 mg.

iii) **Υγρό βάρος:** Όλες οι αποικίες μεταφέρονται σε προζυγισμένους σωλήνες κατασκευασμένους από πολυστυρόλιο (ή άλλο αδρανές υλικό), με στρογγυλό πυθμένα που φέρει μικρές οπές (1 mm). Στη συνέχεια, οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στις 3 000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι σωλήνες, που περιέχουν τις στεγνές πλέον αποικίες, επαναζυγίζονται και υπολογίζεται το υγρό βάρος με αφαίρεση του βάρους του κενού σωλήνα.

Συχνότητα των μετρήσεων και των αναλυτικών προσδιορισμών

42. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός στατικής δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το pH κάθε αγωγής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν εφαρμόζεται σχεδιασμός ημιστατικής δοκιμής, το pH θα πρέπει να μετράται σε κάθε παρτίδα “πρόσφατου” διαλύματος δοκιμής, πριν από κάθε ανανέωση, καθώς και στα αντίστοιχα “έξαντλημένα” διαλύματα.

43. Η φωτεινή ένταση θα πρέπει να μετράται στον θάλαμο ανάπτυξης, τον επωαστήρα ή το δωμάτιο, σε σημεία που βρίσκονται στην ίδια απόσταση από τη φωτεινή πηγή όπως οι θάλλοι της λέμνας. Οι μετρήσεις θα πρέπει να εκτελούνται τουλάχιστον μία φορά στη διάρκεια της δοκιμής. Θα πρέπει να καταγράφεται, τουλάχιστον ημερησίως, η θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου σε υποκατάστατο δοχείο, το οποίο διατηρείται υπό τις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο ανάπτυξης, τον επωαστήρα ή το δωμάτιο.
44. Στη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε κατάλληλα διαστήματα. Η ελάχιστη απαίτηση για τις στατικές δοκιμές είναι ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.
45. Στις ημιστατικές δοκιμές, κατά τις οποίες η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμένεται ότι δεν θα παραμείνει εντός των ορίων της ονομαστικής συγκέντρωσης $\pm 20\%$, είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε ανάλυση όλα τα πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματα δοκιμής, καθώς και τα ίδια διαλύματα σε κάθε ανανέωση (βλ. σημείο 33). Ωστόσο, στην περίπτωση των δοκιμών κατά τις οποίες η μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διαφέρει περισσότερο από $\pm 20\%$ από την ονομαστική συγκέντρωση, αλλά μπορούν να προσκομιστούν επαρκή στοιχεία από τα οποία να προκύπτει ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι επαναλήψιμες και σταθερές (δηλ. κυμαίνονται μεταξύ 80 και 120 % της αρχικής συγκέντρωσης), είναι δυνατόν να εκτελείται χημικός προσδιορισμός μόνο για την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής. Σε κάθε περίπτωση, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πριν από την ανανέωση είναι αναγκαίο να προσδιορίζονται μόνο σε ένα από τα δοχεία επανάληψης για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ή στο συνενωμένο περιεχόμενο των δοχείων ανά επανάληψη).
46. Εάν χρησιμοποιείται συνεχής δοκιμή, ενδείκνυται σύστημα δειγματοληψίας ανάλογο με το περιγραφόμενο για τις ημιστατικές δοκιμές, το οποίο περιλαμβάνει ανάλυση στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής, χωρίς όμως μετρήσεις στα “εξαντλημένα” διαλύματα, που δεν ενδείκνυται στην προκειμένη περίπτωση. Στον συγκεκριμένο τύπο δοκιμής, θα πρέπει να ελέγχεται ημερησίως η ταχύτητα ροής του μέσου αραίωσης και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.
47. Εάν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διατηρήθηκε ικανοποιητικά εντός των ορίων της ονομαστικής ή μετρηθείσας αρχικής συγκέντρωσης $\pm 20\%$ σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να βασιστεί στις ονομαστικές ή μετρηθείσες αρχικές τιμές. Εάν η απόκλιση από την ονομαστική ή τη μετρηθείσα αρχική συγκέντρωση δεν βρίσκεται εντός του $\pm 20\%$, η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα πρέπει να βασίζεται στον γεωμετρικό μέσο όρο των συγκεντρώσεων κατά την έκθεση ή σε μοντέλα που περιγράφουν τη μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (8).

Οριακή δοκιμή

48. Σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. όταν από προκαταρκτική δοκιμή προκύπτει ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/l ή έως το όριο διαλυτότητάς της στο θρεπτικό μέσο δοκιμής (αναλόγως του ποια είναι μικρότερη), είναι δυνατόν να διεξάγεται οριακή δοκιμή, η οποία να συνίσταται σε σύγκριση των αποκρίσεων μιας ομάδας ελέγχου και μιας ομάδας αγωγής (συγκέντρωση ίση με 100 mg/l ή με το όριο διαλυτότητας). Συνιστάται ένδερμα να τεκμηριώνεται αυτό με ανάλυση της συγκέντρωσης έκθεσης. Η οριακή δοκιμή υπόκειται σε όλες τις συνθήκες δοκιμής και όλα τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται ανωτέρω, με εξαίρεση τον αριθμό των επαναλήψεων αγωγής, ο οποίος θα πρέπει να είναι διπλάσιος. Η ανάπτυξη στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα αγωγής είναι δυνατόν να υποβληθεί σε στατιστική ανάλυση με δοκιμή σύγκρισης μέσων όρων, π.χ. δοκιμασία t του Student.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Χρόνος διπλασιασμού

49. Για τον προσδιορισμό του χρόνου διπλασιασμού (T_d) του αριθμού θαλλών και την τήρηση αυτού του κριτηρίου εγκυρότητας στη μελέτη (σημείο 12), εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος στα δεδομένα που προκύπτουν από τα δοχεία ελέγχου:

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

όπου μ είναι ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο οποίος προσδιορίζεται όπως περιγράφεται στα σημεία 54-55.

Μεταβλητές απόκρισης

50. Η δοκιμή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη βλαστητική ανάπτυξη της λέμνας. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών περιγράφονται δύο μεταβλητές απόκρισης, δεδομένου ότι διαφορετικές δικαιοδοσίες έχουν διαφορετικές προτιμήσεις και κανονιστικές ανάγκες. Για να είναι τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεκτά σε όλα τα κράτη μέλη, οι επιδράσεις θα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση και των δύο μεταβλητών απόκρισης α) και β) που περιγράφονται κατωτέρω.
- α) *Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης*: Αυτή η μεταβλητή απόκριση υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του λογαρίθμου του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές του λογαρίθμου μιας άλλης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) με την πάροδο του χρόνου (εκφραζόμενες ανά ημέρα) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής. Η εν λόγω μεταβλητή αναφέρεται μερικές φορές ως σχετικός ρυθμός ανάπτυξης (12).
- β) *Απόδοση*: Αυτή η μεταβλητή απόκριση υπολογίζεται με βάση τις μεταβολές του αριθμού θαλλών και, επιπλέον, τις μεταβολές μιας άλλης μετρούμενης παραμέτρου (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) στους μάρτυρες και σε κάθε ομάδα αγωγής μέχρι το τέλος της δοκιμής.
51. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές τοξικότητας που υπολογίζονται με χρήση των ανωτέρω δύο μεταβλητών απόκρισης δεν είναι συγκρίσιμες και η διαφορά αυτή πρέπει να αναγνωρίζεται, όταν χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της δοκιμής. Εάν τηρούνται οι συνθήκες δοκιμής που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, οι τιμές EC_x που προκύπτουν από τον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ($E_r C_x$) είναι γενικά υψηλότερες από τα βασιζόμενα στην απόδοση αποτελέσματα ($E_y C_x$), λόγω της μαθηματικής βάσης της αντίστοιχης προσέγγισης. Αυτό δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως διαφορά ευαισθησίας μεταξύ των δύο μεταβλητών απόκρισης· πρόκειται απλώς για μαθηματική διαφορά τιμών. Η έννοια του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης βασίζεται στον γενικό εκθετικό τύπο ανάπτυξης των ειδών λέμνας σε απεριόριστες καλλιέργειες, όπου η τοξικότητα εκτιμάται με βάση τις επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς να εξαρτάται από την απόλυτη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του μάρτυρα ούτε από την κλίση της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης ούτε από τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα αποτελέσματα που βασίζονται στην απόδοση ως μεταβλητή απόκρισης εξαρτώνται από όλες τις άλλες προαναφερόμενες μεταβλητές. Η $E_y C_x$ εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του είδους λέμνας που χρησιμοποιείται σε κάθε δοκιμή, καθώς και από τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, ο οποίος μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κλώνων. Η συγκεκριμένη μεταβλητή απόκρισης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη σύγκριση της ευαισθησίας σε τοξικούς παράγοντες μεταξύ ειδών λέμνας ή ακόμα και διαφορετικών κλώνων. Μολονότι είναι προτιμότερο, από επιστημονική άποψη, να χρησιμοποιείται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την εκτίμηση της τοξικότητας, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει και εκτιμήσεις της τοξικότητας με βάση την απόδοση, προκειμένου να καλυφθούν οι κανονιστικές απαιτήσεις που ισχύουν σήμερα σε ορισμένες χώρες.
52. Οι εκτιμήσεις της τοξικότητας θα πρέπει να βασίζονται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη παράμετρο (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή ορισμένες χημικές ουσίες ενδέχεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές απ' ό,τι στον αριθμό θαλλών. Η επίδραση αυτή δεν ανιχνεύεται με τον υπολογισμό μόνο του αριθμού θαλλών.
53. Ο αριθμός θαλλών και κάθε άλλη μετρούμενη μεταβλητή που έχει καταγραφεί, δηλ. η συνολική θαλλική επιφάνεια, το ξηρό βάρος ή το υγρό βάρος, καταχωρίζονται σε πίνακα μαζί με τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για κάθε χρόνο μέτρησης. Η μετέπειτα ανάλυση δεδομένων, π.χ. για την εκτίμηση της LOEC, της NOEC ή της EC_x , θα πρέπει να βασίζεται στις τιμές κάθε επανάληψης και όχι στις μέσες τιμές που έχουν υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής.

Μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

54. Ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για συγκεκριμένη χρονική περίοδο υπολογίζεται ως η λογαριθμική αύξηση των μεταβλητών ανάπτυξης — αριθμός θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος) — από τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος εφαρμόζεται για κάθε επανάληψη ελέγχου και αγωγής:

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

όπου:

- μ_{i-j} : ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα i έως j ,
- N_i : η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή ελέγχου κατά τη χρονική στιγμή i ,

- N_j : η μετρούμενη μεταβλητή στο δοχείο δοκιμής ή ελέγχου κατά τη χρονική στιγμή j ,
- t : το χρονικό διάστημα i έως j .

Για κάθε ομάδα αγωγής και ομάδα ελέγχου υπολογίζεται η μέση τιμή του ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς.

55. Θα πρέπει να υπολογίζεται ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για τη συνολική διάρκεια της δοκιμής (η χρονική στιγμή “ i ” στον ανωτέρω τύπο είναι η αρχή της δοκιμής και η χρονική στιγμή “ j ” το τέλος της). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα, υπολογίζεται η μέση τιμή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διακύμανσης. Επιπλέον, θα πρέπει να υπολογίζεται ο τμηματικός ρυθμός ανάπτυξης με σκοπό την αξιολόγηση των επιδράσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη διάρκεια της περιόδου έκθεσης (π.χ. με εξέταση των λογαριθμικά μετασχηματισμένων καμπυλών ανάπτυξης). Οι ουσιώδεις διαφορές μεταξύ του τμηματικού και του μέσου ρυθμού ανάπτυξης υποδηλώνουν απόκλιση από τη σταθερή εκθετική ανάπτυξη και δικαιολογούν την ενδελεχή εξέταση των καμπυλών ανάπτυξης. Μια συντηρητική προσέγγιση στην περίπτωση αυτή θα ήταν η σύγκριση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης κατά το χρονικό διάστημα μέγιστης αναστολής μεταξύ των καλλιεργειών που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και των καλλιεργειών ελέγχου.
56. Στη συνέχεια, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης (I_r) για κάθε συγκέντρωση δοκιμής (ομάδα αγωγής) από τον ακόλουθο τύπο:

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

όπου:

- $\% I_r$: η εκατοστιαία αναστολή του μέσου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης,
- μ_C : η μέση τιμή του μ στον μάρτυρα,
- μ_T : η μέση τιμή του μ στην ομάδα αγωγής.

Απόδοση

57. Οι επιδράσεις στην απόδοση προσδιορίζονται με βάση δύο μετρούμενες μεταβλητές –τον αριθμό θαλλών και μία ακόμη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος)– των οποίων η παρουσία διαπιστώνεται σε κάθε δοχείο δοκιμής στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Στην περίπτωση του ξηρού ή του υγρού βάρους, η αρχική βιομάζα προσδιορίζεται σε δείγμα θαλλών που λαμβάνεται από την ίδια παρτίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών δοχείων (βλ. σημείο 20). Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και για κάθε μάρτυρα υπολογίζεται η μέση τιμή της απόδοσης, συνοδευόμενη από εκτίμηση της διασποράς. Η μέση εκατοστιαία αναστολή της απόδοσης ($\%I_y$) μπορεί να υπολογιστεί για κάθε ομάδα αγωγής με τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

- $\% I_y$: η εκατοστιαία μείωση της απόδοσης,
- b_c : η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα ελέγχου,
- b_T : η τελική βιομάζα μείον την αρχική βιομάζα στην ομάδα αγωγής.

Χάραξη των καμπυλών συγκέντρωσης-απόκρισης

58. Θα πρέπει να χαράσσονται καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης που να συνδέουν τη μέση τιμή της εκατοστιαίας αναστολής της μεταβλητής απόκρισης (I_r ή I_y , υπολογιζόμενη όπως υποδεικνύεται στο σημείο 56 ή 57) με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Εκτίμηση της EC_x

59. Οι εκτιμήσεις της EC_x (π.χ. της EC_{50}) θα πρέπει να βασίζονται τόσο στον μέσο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (E_iC_x), όσο και στην απόδοση (E_yC_x). Κάθεμία από τις μεταβλητές αυτές θα πρέπει να βασίζεται στον αριθμό θαλλών και σε μία πρόσθετη μετρούμενη μεταβλητή (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος), επειδή υπάρχουν υπό δοκιμή χημικές ουσίες που επιδρούν διαφορετικά στον αριθμό θαλλών απ' ό,τι σε άλλες μετρούμενες μεταβλητές. Επομένως, οι επιθυμητές παράμετροι τοξικότητας είναι τέσσερις τιμές EC_x για κάθε βαθμό αναστολής x που έχει υπολογιστεί: E_iC_x (αριθμός θαλλών)· E_xC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος)· E_yC_x (αριθμός θαλλών)· και E_yC_x (συνολική θαλλική επιφάνεια, ξηρό βάρος ή υγρό βάρος).

Στατιστικές διαδικασίες

60. Το ζητούμενο είναι να ληφθεί ποσοτική σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης με ανάλυση παλινδρόμησης. Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, έπειτα από γραμμικό μετασχηματισμό των δεδομένων απόκρισης –π.χ. σε μονάδες probit ή logit ή Weibull (13)–, αλλά προτιμώνται οι τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, με τις οποίες αντιμετωπίζονται καλύτερα οι αναπόφευκτες ανωμαλίες των δεδομένων και οι αποκλίσεις τους από τις ομαλές κατανομές. Κοντά στις περιοχές είτε της μηδενικής είτε της πλήρους αναστολής, οι ανωμαλίες αυτές ενδέχεται να μεγεθυνθούν από τον μετασχηματισμό και να αλλοιώσουν την ανάλυση (13). Σημειωτέον ότι οι συνήθεις μέθοδοι ανάλυσης με χρήση αποτελεσμάτων μετασχηματισμού probit, logit ή Weibull προορίζονται για δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (π.χ. θνησιμότητα ή επιβίωση) και πρέπει να τροποποιούνται για να καλύψουν δεδομένα ανάπτυξης ή απόδοσης. Ειδικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό των τιμών EC_x από συνεχή δεδομένα παρατίθενται στις δημοσιεύσεις (14), (15) και (16).
61. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης που πρόκειται να αναλυθεί, χρησιμοποιείται η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης για να υπολογιστούν σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x . Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει να προσδιορίζονται, για κάθε εκτίμηση, τα όρια εμπιστοσύνης 95 %. Η καλή προσαρμογή των δεδομένων απόκρισης στο μοντέλο παλινδρόμησης θα πρέπει να αξιολογείται με γραφική ή στατιστική μέθοδο. Η ανάλυση παλινδρόμησης θα πρέπει να εκτελείται με τη χρήση των αποκρίσεων της κάθε επανάληψης και όχι των μέσων όρων των ομάδων αγωγής.
62. Εάν τα διαθέσιμα μοντέλα/μέθοδοι παλινδρόμησης είναι ακατάλληλα για τα δεδομένα, μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις και όρια εμπιστοσύνης για την EC_{50} με γραμμική παρεμβολή με τη μέθοδο bootstrap (17).
63. Για την εκτίμηση της LOEC και, κατ' επέκταση, της NOEC, είναι αναγκαία η σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων αγωγής με την εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Στη συνέχεια, ο μέσος όρος για κάθε συγκέντρωση πρέπει να συγκρίνεται με τον μέσο όρο του μάρτυρα με κατάλληλη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης ή δοκιμής τάσης. Χρήσιμη για τον σκοπό αυτό μπορεί να είναι η δοκιμασία Dunnett ή η δοκιμασία Williams (18)(19)(20)(21). Είναι απαραίτητο να κρίνεται αν ευσταθεί η παραδοχή της ANOVA για ομοιογενή διασπορά. Η εκτίμηση αυτή μπορεί να διενεργηθεί γραφικά ή με επίσημη δοκιμή (22). Κατάλληλες δοκιμασίες είναι η δοκιμασία Levene και η δοκιμασία Bartlett. Εάν δεν ισχύει η παραδοχή της ομοιογένειας της διασποράς, αυτό είναι μερικές φορές δυνατόν να διορθωθεί με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Στις περιπτώσεις ακραίας ετερογένειας της διασποράς η οποία δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί με μετασχηματισμό, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο ανάλυσης με μεθόδους όπως ο έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τον προσδιορισμό της NOEC παρέχεται στη δημοσίευση (16).
64. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις υπαγόρευσαν τη σύσταση να εγκαταλειφθεί η έννοια της NOEC και να αντικατασταθεί από σημειακές εκτιμήσεις των τιμών EC_x βάσει παλινδρόμησης. Δεν έχει καθοριστεί κατάλληλη τιμή του x για την παρούσα δοκιμή σε λέμνα. Ωστόσο, φαίνεται να ενδείκνυται ένα εύρος 10 έως 20 % (ανάλογα με την επιλεγμένη μεταβλητή απόκρισης) και, κατά προτίμηση, θα πρέπει να αναφέρονται τόσο η EC_{10} όσο και η EC_{20} .

Υποβολή εκθέσεων

65. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του ορίου υδατοδιαλυτότητας·
- δεδομένα χημικής ταυτοποίησης (π.χ. αριθ. CAS), συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας (προσμεϊξεις).

Υπό δοκιμή είδος:

- επιστημονική ονομασία, κλώνος (εάν είναι γνωστός) και πηγή.

Συνθήκες δοκιμής:

- εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (στατική, ημιστατική ή συνεχής).
- ημερομηνία έναρξης της δοκιμής και διάρκεια της δοκιμής.
- θρεπτικό μέσο δοκιμής.
- περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού: δοχεία δοκιμής και καλύμματα, όγκοι διαλυμάτων, αριθμός αποικιών και θαλλών ανά δοχείο δοκιμής στην αρχή της δοκιμής.
- συγκεντρώσεις δοκιμής (ονομαστικές και μετρηθείσες, κατά περίπτωση) και αριθμός επαναλήψεων ανά συγκέντρωση.
- μέθοδοι παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και των διαλυμάτων δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης της ενδεχόμενης χρήσης διαλυτών ή μέσων διασποράς.
- θερμοκρασία κατά τη δοκιμή.
- φωτεινή πηγή, ένταση και ομοιογένεια.
- τιμές pH των θρεπτικών μέσων δοκιμής και ελέγχου.
- συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και μέθοδος ανάλυσης, με τα κατάλληλα δεδομένα αξιολόγησης της ποιότητας (μελέτες επικύρωσης, τυπικές αποκλίσεις ή όρια εμπιστοσύνης των αναλύσεων).
- μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού θαλλών και των τιμών άλλων μετρούμενων μεταβλητών, π.χ. ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια.
- όλες οι παρεκκλίσεις από την παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Αποτελέσματα:

- ανεπεξέργαστα δεδομένα: αριθμός θαλλών και τιμές άλλων μετρούμενων μεταβλητών για κάθε δοχείο δοκιμής και ελέγχου σε κάθε παρατήρηση και χρόνο ανάλυσης.
- μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για κάθε μετρούμενη μεταβλητή.
- καμπύλες ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση (συνιστάται να χαράσσονται με λογαριθμικό μετασχηματισμό των μετρούμενων μεταβλητών, βλ. σημείο 55).
- χρόνος διπλασιασμού / ρυθμός ανάπτυξης στον μάρτυρα, με βάση τον αριθμό θαλλών.
- υπολογισθείσες μεταβλητές απόκρισης για κάθε επανάληψη αγωγής, συνοδευόμενες από τους μέσους όρους και τον συντελεστή μεταβολής για τις επαναλήψεις.
- γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-επίδρασης.
- εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων για τις μεταβλητές απόκρισης, π.χ. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τιμές LOEC και/ή NOEC, εάν έχουν υπολογιστεί, και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους.
- εάν έχει χρησιμοποιηθεί τεχνική ANOVA, το ανιχνεύσιμο μέγεθος της επίδρασης (π.χ. η ελάχιστη σημαντική διαφορά).
- διέγερση της ανάπτυξης που ενδεχομένως διαπιστώθηκε σε οποιοδήποτε δοχείο αγωγής.
- τυχόν ορατά σημεία φυτοτοξικότητας, καθώς και παρατηρήσεις των διαλυμάτων δοκιμής.
- σύζησηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). σ. 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. 8 σελίδες.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 σελίδες.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 σελίδες (στα σουηδικά).
- (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 σελίδες.
- (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, Παρίσι.
- (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) ΟΟΣΑ. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, Παρίσι.
- (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.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί και συντμήσεις:

Βιομάζα: το ξηρό βάρος της ζώσας ύλης την οποία περιέχει ένας πληθυσμός. Στην παρούσα δοκιμή, μετρώνται συνήθως υποκατάστατα της βιομάζας, όπως ο αριθμός θαλλών ή η θαλλική επιφάνεια. Ως εκ τούτου, ο όρος βιομάζα αναφέρεται και σε αυτά τα υποκατάστατα μέτρα.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Χλώρωση: ο κίτρινος χρωματισμός του θαλλικού ιστού.

Κλώνος: οργανισμός ή κύτταρο που δημιουργείται με αγενή αναπαραγωγή από ένα μόνο άτομο. Συνεπώς, τα μέλη του ίδιου κλώνου είναι γενετικώς πανομοιότυπα.

Αποικία: συσσωμάτωμα μητρικών και θυγατρικών θαλλών (συνήθως 2 έως 4), συνδεδεμένων μεταξύ τους. Μερικές φορές, αναφέρεται ως φυτό.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διαλυμένης στο θρεπτικό μέσο δοκιμής, η οποία προκαλεί μείωση της ανάπτυξης της λέμνας κατά x % (π.χ. 50 %) εντός της δηλούμενης περιόδου έκθεσης (πρέπει να αναφέρεται επακριβώς, εάν διαφέρει από την πλήρη ή κανονική διάρκεια της δοκιμής). Για να δηλώνεται σαφώς αν η τιμή EC έχει προκύψει από τον ρυθμό ανάπτυξης ή από την απόδοση, χρησιμοποιούνται, αντίστοιχα, τα σύμβολα "E_tC" και "E_yC", ακολουθούμενα από τη μεταβλητή που μετρήθηκε, π.χ. E_tC (αριθμός θαλλών).

Συνεχής δοκιμή: η δοκιμή στην οποία τα διαλύματα δοκιμής αντικαθίστανται συνεχώς.

Θαλλός: ατομική/μεμονωμένη "φυλλοειδής" δομή του φυτού λέμνα. Πρόκειται για τη μικρότερη μονάδα, δηλ. άτομο, με ικανότητα αναπαραγωγής.

Κυφότητα: οι θαλλοί που εμφανίζουν εξόγκωμα ή διόγκωση.

Ανάπτυξη: η αύξηση της μετρούμενης μεταβλητής –π.χ. αριθμός θαλλών, ξηρό βάρος, υγρό βάρος ή θαλλική επιφάνεια– στη διάρκεια της δοκιμής.

Ρυθμός ανάπτυξης (μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης): η λογαριθμική αύξηση της βιομάζας κατά την περίοδο έκθεσης.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη ελεγχθείσα συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης (με $p < 0,05$) υπό την επίδραση της χημικής ουσίας, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, εντός δεδομένου χρόνου έκθεσης. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν βλαβερή επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγηθεί πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Μετρούμενες μεταβλητές: κάθε είδους μεταβλητή που μετράται, προκειμένου να εκφραστεί το τελικό σημείο της δοκιμής με χρήση μίας ή περισσότερων διαφορετικών μεταβλητών απόκρισης. Στην παρούσα μέθοδο, μετρούμενες μεταβλητές είναι ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος και το ξηρό βάρος.

Μονοκαλλιέργεια: καλλιέργεια με ένα μόνο είδος φυτού.

Νέκρωση: νεκρός (δηλ. λευκός ή διαποτισμένος με νερό) θαλλικός ιστός.

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η συγκέντρωση δοκιμής που είναι αμέσως μικρότερη από τη LOEC.

Φαινότυπος: τα αντιληπτά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού τα οποία καθορίζονται από την αλληλεπίδραση των γονιδίων του με το περιβάλλον του.

Μεταβλητές απόκρισης: μεταβλητές για την εκτίμηση της τοξικότητας, οι οποίες προκύπτουν, με διάφορες μεθόδους υπολογισμού, από τις μετρούμενες μεταβλητές που περιγράφουν τη βιομάζα. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, ο ρυθμός ανάπτυξης και η απόδοση είναι μεταβλητές απόκρισης που προκύπτουν από μετρούμενες μεταβλητές, όπως ο αριθμός θαλλών, η θαλλική επιφάνεια, το υγρό βάρος ή το ξηρό βάρος.

Ημιστατική δοκιμή (ανανέωσης): η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας το διάλυμα δοκιμής αντικαθίσταται ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Στατική δοκιμή: η δοκιμή στη διάρκεια της οποίας δεν ανανεώνεται το διάλυμα δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Τελικό σημείο της δοκιμής: περιγράφει, ως στόχο της δοκιμής, τον γενικό παράγοντα που θα μεταβληθεί υπό την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην παρούσα μέθοδο, το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναστολή της ανάπτυξης, η οποία μπορεί να εκφραστεί με διάφορες μεταβλητές απόκρισης, οι οποίες βασίζονται σε μία ή περισσότερες μετρούμενες μεταβλητές.

Θρεπτικό μέσο δοκιμής: το πλήρες συνθετικό θρεπτικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά της δοκιμής, όταν εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται, κατά κανόνα, στο θρεπτικό μέσο δοκιμής.

Απόδοση: ισούται με την τιμή της μετρούμενης μεταβλητής που εκφράζει τη βιομάζα στο τέλος της περιόδου έκθεσης μείον την τιμή της ίδιας μεταβλητής στην αρχή της περιόδου έκθεσης.

Προσάρτημα 2

Περιγραφή του φυτού *Lemna spp.*

Το υδρόβιο φυτό *Lemna spp.*, κοινώς λέμνα ή φακή του νερού, ανήκει στην οικογένεια των λεμνιδών (Lemnaceae), που περιλαμβάνει ορισμένα κοσμοπολίτικα είδη, ταξινομημένα σε τέσσερα γένη. Οι διαφορές τους ως προς την εμφάνιση και τη συστηματική κατάταξη έχουν περιγραφεί εκτενώς (1)(2). Τα είδη *Lemna gibba* και *Lemna minor* είναι αντιπροσωπευτικά των εύκρατων περιοχών και χρησιμοποιούνται ευρέως σε δοκιμές τοξικότητας. Και τα δύο αυτά είδη έχουν έναν επιπλέοντα ή βυθισμένο δισκοειδή βλαστό (θαλλό), ενώ από το κέντρο της κάτω επιφάνειας κάθε θαλλού εξέρχεται μια λεπτότατη ρίζα. Η *Lemna spp.* σπάνια παράγει άνθη και τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστητική αναπαραγωγή, παράγοντας νέους θαλλούς (3). Σε σύγκριση με τα φυτά μεγαλύτερης ηλικίας, τα νεαρότερα έχουν ασθενέστερο χρώμα και βραχύτερες ρίζες και αποτελούνται από δύο έως τρεις θαλλούς διαφορετικών μεγεθών. Το μικρό μέγεθος της λέμνας, η απλή δομή της, η αγενής αναπαραγωγή της και ο μικρός χρόνος γενεάς καθιστούν τα φυτά του γένους αυτού ιδιαίτερα κατάλληλα για εργαστηριακές δοκιμές (4)(5).

Λόγω πιθανών διειδικών διαφορών ως προς την ευαισθησία, μόνο οι συγκρίσεις ευαισθησίας εντός του ίδιου είδους είναι έγκυρες.

Παραδείγματα ειδών λέμνας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές: αναφορά των ειδών στη βιβλιογραφία

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. 8 σελίδες.

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 σελίδες (στα σουηδικά).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). σ. 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. 8 σελίδες.

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., Czyska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Πηγές ειδών λέμνας

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Τορόντο, Οντάριο, Καναδάς, M5S 3 B2
Τηλ.: +1-416-978-3641
Φαξ: +1-416-978-5878
Ηλ. ταχ.: jacreman@botany.utoronto.ca

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Στοκχόλμη
ΣΟΥΗΔΙΑ
Τηλ.: +46 8 674 7240
Φαξ: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Βερολίνο
ΓΕΡΜΑΝΙΑ
Ηλ. ταχ.: lemna@uba.de

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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, Ελβετία.
 - (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.
-

Προσάρτημα 3

Διατήρηση της μητρικής καλλιέργειας

Οι μητρικές καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4-10 °C) για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χωρίς να χρειάζεται να παρασκευαστούν εκ νέου. Το θρεπτικό μέσο για τη λέμνα μπορεί να είναι ίδιο με το θρεπτικό μέσο της δοκιμής, αλλά για τις μητρικές καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία μέσα.

Κατά διαστήματα, μερικά νεαρά φυτά χρώματος ανοικτού πράσινου μεταφέρονται με τεχνική ασηψίας σε νέα δοχεία καλλιέργειας τα οποία περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο. Στις συνθήκες χαμηλότερης θερμοκρασίας που υποδεικνύονται στη παρούσα μέθοδο, η υποκαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιείται ανά τρίμηνο κατ' ανώτατο όριο.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικώς καθαρά (εκπλυμένα με οξέα) και στείρα γυάλινα δοχεία καλλιέργειας και να εφαρμόζονται τεχνικές εργασίας σε συνθήκες ασηψίας. Εάν μολυνθεί η μητρική καλλιέργεια, π.χ. από φύκη ή μύκητες, απαιτούνται μέτρα για την εξάλειψη των επιμολυντικών οργανισμών. Στην περίπτωση των φυκών και των περισσότερων άλλων επιμολυντικών οργανισμών, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με επιφανειακή αποστείρωση. Λαμβάνεται δείγμα του μολυσμένου φυτικού υλικού και κόβονται οι ρίζες. Στη συνέχεια, το υλικό αυτό αναταράσσεται ζωηρά μέσα σε καθαρό νερό και εμβάπτιζεται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5 % (v/v) για χρονικό διάστημα μεταξύ 30 δευτερολέπτων και 5 λεπτών. Κατόπιν, το φυτικό υλικό εκπλύνεται με στείρο νερό και κατανέμεται σε έναν ορισμένο αριθμό δοχείων καλλιέργειας που περιέχουν πρόσφατα παρασκευασμένο θρεπτικό μέσο (παρτίδες). Η κατεργασία αυτή έχει ως επακόλουθο τον θάνατο πολλών θαλλών, ιδίως όταν η έκθεση διαρκεί περισσότερο χρόνο, αλλά ορισμένοι από τους επιζώντες είναι συνήθως απαλλαγμένοι από μόλυνση. Οι τελευταίοι μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν για τον επανεμβολιασμό νέων καλλιιεργειών.

Προσάρτημα 4

Θρεπτικά μέσα

Συνιστώνται διαφορετικά θρεπτικά μέσα για τα είδη *L. minor* και *L. gibba*. Για το *L. minor* συνιστάται τροποποιημένη έκδοση του θρεπτικού μέσου του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS), ενώ για το *L. gibba*, συνιστάται το θρεπτικό μέσο 20X AAR. Η σύνθεση των δύο μέσων παρατίθεται κατωτέρω. Κατά την παρασκευή των ανωτέρω θρεπτικών μέσων πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό μέσο του Σουηδικού Ινστιτούτου Τυποποίησης (SIS) για τη λέμνα

- Τα διαλύματα παρακαταθήκης I — V αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (120 °C, 15 λεπτά) ή με διήθηση μέσω μεμβράνης (διάμετρος πόρων 0,2 μm περίπου).
- Τα διαλύματα παρακαταθήκης VI και (προαιρετικά) VII αποστειρώνονται μόνο με διήθηση μέσω μεμβράνης και δεν πρέπει να θερμαίνονται σε αυτόκαυστο.
- Τα στείρα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Τα διαλύματα παρακαταθήκης I - V θα πρέπει να απορρίπτονται έπειτα από έξι μήνες, ενώ η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων παρακαταθήκης VI και (προαιρετικά) VII είναι ένας μήνας.

| Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης | Ουσία | Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/l) | Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/•l) | Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| | | | | Στοιχείο | Συγκέντρωση (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 (ρυθμιστικό διάλυμα) | 490 | 490 | — | — |

Για την παρασκευή 1 λίτρου θρεπτικού μέσου SIS προστίθενται σε 900 ml απιονισμένου νερού τα ακόλουθα:

- 10 ml διαλύματος παρακαταθήκης I
- 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης II
- 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης III
- 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης IV
- 1 ml διαλύματος παρακαταθήκης V
- 5 ml διαλύματος παρακαταθήκης VI
- 1 ml διαλύματος παρακαταθήκης VII (προαιρετικά)

Σημείωση: Για ορισμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες ενδέχεται να χρειάζεται ένα επιπλέον διάλυμα παρακαταθήκης VII [ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) — βλ. σημείο 11].

Ρυθμίζεται το pH στην τιμή $6,5 \pm 0,2$ με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH, και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό μέσο 20X AAP

Τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάζονται με στείρο απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Τα στείρα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους. Στις συνθήκες αυτές, η διάρκεια αποθήκευσης των διαλυμάτων παρακαταθήκης είναι τουλάχιστον 6-8 εβδομάδες.

Για το θρεπτικό μέσο 20X AAP παρασκευάζονται πέντε διαλύματα παρακαταθήκης θρεπτικών στοιχείων (A1, A2, A3, B και Γ), με χρήση χημικών ουσιών καθαρότητας αντιδραστήριου. Λαμβάνονται 20 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης θρεπτικών στοιχείων και προστίθενται σε περίπου 850 ml απιονισμένου νερού για να προκύψει το θρεπτικό μέσο. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή $7,5 \pm 0,1$ με 0,1 ή 1 mol HCl ή NaOH, και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,2 μm (περίπου) σε στείρο υποδοχέα.

Το θρεπτικό μέσο που προορίζεται για τη διεξαγωγή δοκιμών θα πρέπει να παρασκευάζεται 1-2 ημέρες πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να είναι δυνατόν να σταθεροποιηθεί το pH. Το pH του θρεπτικού μέσου θα πρέπει να ελέγχεται πριν από τη χρήση του και, εάν είναι απαραίτητο, να ρυθμίζεται εκ νέου με την προσθήκη διαλύματος NaOH ή HCl 0,1 ή 1 M, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

| Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης | Ουσία | Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/•l) (*) | Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/•l) (*) | Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | | | | Στοιχείο | Συγκέντρωση (mg/•l) (*) |
| A1 | NaNO ₃ | 26 | 510 | Na· N | 190· 84 |
| | MgCl ₂ · 6H ₂ O | 12 | 240 | Mg | 58,08 |
| | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 4,4 | 90 | Ca | 24,04 |
| A2 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ · O | 1,4 | 30 | K· P | 9,4· 3,7 |

| Αριθ. διαλύματος παρακαταθήκης | Ουσία | Συγκέντρωση στο διάλυμα παρακαταθήκης (g/l) (*) | Συγκέντρωση στο παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο (mg/l) (*) | Παρασκευαζόμενο θρεπτικό μέσο | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| | | | | Στοιχείο | Συγκέντρωση (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 |

(*) εκτός αντίθετης μνείας

Σημείωση: Η θεωρητικώς ενδεδειγμένη τελική συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων (η οποία αποτρέπει την αισθητή ρύθμιση του pH) είναι 15 mg/L και όχι 300 mg/L. Ωστόσο, η χρήση του θρεπτικού μέσου 20X AAP στο παρελθόν, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμής δακτυλίου για την παρούσα μέθοδο, έχει βασιστεί σε 300 mg/L. [I. Sims, P. Whitehouse και 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.]

Θρεπτικό μέσο Steinberg (κατά το πρότυπο ISO 20079)

Συγκεντρώσεις και διαλύματα παρακαταθήκης

Κατά το πρότυπο ISO 20079, το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Steinberg χρησιμοποιείται μόνο για το είδος *Lemna minor* (δεδομένου ότι μόνο το *Lemna minor* επιτρέπεται). ωστόσο, δοκιμές έχουν αποδείξει ότι είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρήση του και για το είδος *Lemna gibba*.

Κατά την παρασκευή του εν λόγω μέσου, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες καθαρότητας αντιδραστηρίου ή αναλυτικής καθαρότητας και απιονισμένο νερό.

Παρασκευάζεται το θρεπτικό μέσο από διαλύματα παρακαταθήκης ή από το πυκνό υλικό δεκαπλάσιας συγκέντρωσης, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης χωρίς καθίζηση.

Πίνακας 1

Θρεπτικό μέσο Steinberg σταθερού pH (τροποποιημένο κατά Altenburger)

| Συστατικό | | Θρεπτικό μέσο | |
|-------------------------------------------------------|---------------|---------------|--------|
| Μακροθρεπτικά στοιχεία | Μοριακό βάρος | 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 |

| Συστατικό | | Θρεπτικό μέσο | |
|------------------------------------------------------|---------------|---------------|--------|
| Μικροθρεπτικά στοιχεία | Μοριακό βάρος | 0,1 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, διένυδρο άλας με νάτριο | 372,24 | 1 500,00 | 4,03 |

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης (Μακροθρεπτικά στοιχεία)

| 1. Μακροθρεπτικά στοιχεία (σε 50πλάσια συγκέντρωση) | g/l |
|-------------------------------------------------------|-------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης 1: | |
| KNO ₃ | 17,50 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,63 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 2: | |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 5,00 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 3: | |
| Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 14,75 |

Πίνακας 3

Διαλύματα παρακαταθήκης (Μικροθρεπτικά στοιχεία)

| 2. Μικροθρεπτικά στοιχεία (σε 1 000πλάσια συγκέντρωση) | mg/l |
|--------------------------------------------------------|-------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης 4: | |
| H ₃ BO ₃ | 120,0 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 5: | |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 180,0 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 6: | |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 44,0 |

| 2. Μικροθρεπτικά στοιχεία (σε 1 000πλάσια συγκέντρωση) | mg/l |
|--------------------------------------------------------|----------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης 7: | |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 180,0 |
| Διάλυμα παρακαταθήκης 8: | |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 760,00 |
| EDTA, διένυδρο άλας με νάτριο | 1 500,00 |

- Τα διαλύματα παρακαταθήκης 2 και 3, και χωριστά διαλύματα παρακαταθήκης 4 έως 7 είναι δυνατόν να ενωθούν (λαμβάνομένων υπόψη των απαιτούμενων συγκεντρώσεων).
- Για να παραταθεί η διάρκεια αποθήκευσης, τα διαλύματα παρακαταθήκης θερμαίνονται σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά ή, εναλλακτικά, υποβάλλονται σε αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm). Στην περίπτωση του διαλύματος παρακαταθήκης 8, συνιστάται ένθερμα η αποστειρωτική διήθηση (ηθμός των 0,2 μm).

Παρασκευή του (τροποποιημένου) θρεπτικού μέσου Steinberg με την τελική συγκέντρωση

- Σε περίπου 900 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 20 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 1, 2 και 3 (βλ. πίνακα 2), ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση.
- Προστίθεται 1,0 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 4, 5, 6, 7 και 8 (βλ. πίνακα 3).
- Το pH θα πρέπει να είναι 5,5 +/- 0,2 (ρυθμίζεται με την προσθήκη του ελάχιστου δυνατού όγκου διαλύματος NaOH ή HCl).
- Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1 000 ml με νερό.
- Εάν τα διαλύματα παρακαταθήκης είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό θρεπτικό μέσο, το διάλυμα παρακαταθήκης 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).

Παρασκευή του πυκνού (τροποποιημένου) θρεπτικού μέσου Steinberg με δεκαπλάσια συγκέντρωση για ενδιάμεση αποθήκευση

- Σε περίπου 30 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 20 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 1, 2 και 3 (βλ. πίνακα 2), ώστε να αποφεύγεται η καθίζηση.
- Προστίθεται 1,0 ml από τα διαλύματα παρακαταθήκης 4, 5, 6, 7 και 8 (βλ. πίνακα 3). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 100 ml με νερό.
- Εάν τα διαλύματα παρακαταθήκης είναι αποστειρωμένα και χρησιμοποιείται το ενδεδειγμένο νερό, δεν απαιτείται περαιτέρω αποστείρωση. Εάν αποστειρώνεται το τελικό θρεπτικό μέσο, το διάλυμα παρακαταθήκης 8 θα πρέπει να προστίθεται μετά τη θέρμανση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 20 λεπτά).
- Το pH του θρεπτικού μέσου (τελική συγκέντρωση) θα πρέπει να είναι 5,5 ± 0,2.»

6) Προστίθενται τα ακόλουθα κεφάλαια Γ.31 έως Γ.46:

«Γ.31. ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΧΕΡΣΑΙΑ ΦΥΤΑ: ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΔΥΣΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμής είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 208 του ΟΟΣΑ (2006). Οι μέθοδοι δοκιμών επανεξετάζονται περιοδικά με βάση την επιστημονική πρόοδο και την εφαρμοσιμότητά τους στην κανονιστική χρήση. Η παρούσα επικαιροποιημένη μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί με σκοπό να εκτιμηθούν οι δυναμικές επιδράσεις των χημικών ουσιών στην ανάπτυξη και την ανάπτυξη σποροφύτων. Ως τέτοια, δεν καλύπτει τις χρόνιες επιδράσεις ή τις επιδράσεις στην αναπαραγωγή (δηλ. σπορόδεση, σχηματισμός ανθέων, ωρίμανση καρπών). Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι συνθήκες έκθεσης και οι ιδιότητες της χημικής ουσίας που πρόκειται να υποβληθεί σε δοκιμή, ώστε να εξασφαλίζεται ότι χρησιμοποιούνται οι ενδεικνυόμενες μέθοδοι δοκιμών (π.χ. κατά τη δοκιμή μετάλλων / μεταλλικών ενώσεων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις του pH και των αντίστοιχων αντισταθμιστικών ιόντων) (1). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν αφορά τα φυτά που εκτίθενται σε ατμούς χημικών ουσιών. Η μέθοδος εφαρμόζεται στις δοκιμές χημικών ουσιών εν γένει, βιοκτόνων και προϊόντων προστασίας των καλλιεργειών (γνωστών και ως φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή παρασιτοκτόνων). Έχει αναπτυχθεί με βάση υφιστάμενες μεθόδους (2) (3) (4) (5) (6) (7). Ελήφθησαν επίσης υπόψη άλλες παραπομπές που αφορούν τις δοκιμές σε φυτά (8) (9) (10). Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

2. Η δοκιμή εκτιμά τις επιδράσεις στην ανάπτυξη σποροφύτων και την αρχική ανάπτυξη ανώτερων φυτών έπειτα από έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία στο έδαφος (ή σε άλλη κατάλληλη μήτρα εδάφους). Οι σπόροι τοποθετούνται σε έδαφος που έχει υποστεί αγωγή με την υπό δοκιμή χημική ουσία, και εκτιμώνται οι επιδράσεις μετά την πάροδο συνήθως 14 έως 21 ημερών έπειτα από ανάπτυξη του 50 % των σποροφύτων στην ομάδα ελέγχου. Τα μετρούμενα τελικά σημεία είναι η οπτική εκτίμηση της ανάπτυξης σποροφύτων, το ξηρό βάρος των βλαστών (εναλλακτικά, το υγρό βάρος των βλαστών) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, το ύψος των βλαστών, καθώς και η εκτίμηση των εμφανών βλαβερών επιδράσεων σε διάφορα μέρη του φυτού. Αυτές οι μετρήσεις και οι παρατηρήσεις συγκρίνονται με τις αντίστοιχες για τα φυτά ελέγχου που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή.
3. Ανάλογα με την αναμενόμενη οδό έκθεσης, η υπό δοκιμή χημική ουσία είτε ενσωματώνεται στο έδαφος (ή, ενδεχομένως, σε τεχνητή μήτρα εδάφους) είτε εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους, κάτι που αντιπροσωπεύει ακριβώς την πιθανή οδό έκθεσης στη χημική ουσία. Η ενσωμάτωση στο έδαφος πραγματοποιείται με αγωγή του χύδην εδάφους. Μετά την εφαρμογή, το έδαφος μεταφέρεται σε δοχεία και, στη συνέχεια, οι σπόροι του συγκεκριμένου είδους φυτού φυτεύονται στο έδαφος. Οι επιφανειακές εφαρμογές πραγματοποιούνται σε έδαφος μέσα σε δοχείο στο οποίο έχουν ήδη φυτευθεί οι σπόροι. Στη συνέχεια, οι μονάδες δοκιμής (μάρτυρες και εδάφη που έχουν υποστεί αγωγή συν σπόροι) τοποθετούνται σε κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την εκβλάστηση/ανάπτυξη των φυτών.
4. Ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό, η δοκιμή μπορεί να διεξάγεται για τον προσδιορισμό της καμπύλης δόσης-απόκρισης, ή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα ως οριακή δοκιμή. Εάν τα αποτελέσματα από τη δοκιμή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο όριο τοξικότητας (π.χ. εάν διαπιστώνονται επιδράσεις που υπερβαίνουν το x %), διενεργείται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών με σκοπό να προσδιοριστεί το ανώτερο και το κατώτερο όριο τοξικότητας και, στη συνέχεια, δοκιμή σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες, με σκοπό τη χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης. Εφαρμόζεται κατάλληλη στατιστική ανάλυση, για να ληφθεί η αποτελεσματική συγκέντρωση EC_x ή η αποτελεσματική ποσότητα εφαρμογής ER_x (π.χ. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) για την(τις) πιο ευαίσθητη(-ες) ενδεικνυόμενη(-ες) παράμετρο(-τρους). Με αυτή τη δοκιμή μπορούν επίσης να υπολογιστούν η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

5. Οι ακόλουθες πληροφορίες είναι χρήσιμες για τον καθορισμό της αναμενόμενης οδού έκθεσης στη χημική ουσία και για τον σχεδιασμό της δοκιμής: ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα, η υδατοδιαλυτότητα, η διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες, ο συντελεστής κατανομής σε 1-οκτανόλη/νερό, η προσροφητική συμπεριφορά του εδάφους, η τάση ατμών, η χημική σταθερότητα στο νερό και στο φως, και η βιοαποικοδομησιμότητα.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν διαπιστώνεται κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:
 - η ανάπτυξη σποροφύτων είναι τουλάχιστον 70 %·
 - τα σπορόφυτα δεν παρουσιάζουν εμφανείς φυτοτοξικές επιδράσεις (π.χ. χλώρωση, νέκρωση, μάρανση, παραμόρφωση των φύλλων και των μίσχων) και τα φυτά παρουσιάζουν μόνο τη συνηθισμένη, για το συγκεκριμένο είδος, διακύμανση ως προς την ανάπτυξη και τη μορφολογία·
 - η μέση επιβίωση των σποροφύτων ελέγχου που έχουν αναδυθεί είναι τουλάχιστον 90 % κατά τη διάρκεια της δοκιμής·
 - οι περιβαλλοντικές συνθήκες για ένα συγκεκριμένο είδος είναι ταυτόσημες και τα θρεπτικά μέσα περιέχουν την ίδια ποσότητα μήτρας εδάφους, υποστηρικτικών θρεπτικών μέσων, ή υποστρώματος από την ίδια πηγή.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Η χημική ουσία αναφοράς μπορεί να υποβάλλεται σε δοκιμή ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για να επαληθευτεί ότι η εκτέλεση της δοκιμής και η απόκριση των συγκεκριμένων φυτών της δοκιμής, καθώς και οι συνθήκες της δοκιμής δεν έχουν μεταβληθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται οι παλαιότερες μετρήσεις της βιομάζας ή της ανάπτυξης των μαρτύρων, ώστε να αξιολογούνται οι επιδόσεις του συστήματος δοκιμής σε συγκεκριμένα εργαστήρια, και να λειτουργούν ως μέτρα ελέγχου της ενδοεργαστηριακής ποιότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Φυσικό έδαφος — Τεχνητό υπόστρωμα

8. Τα φυτά μπορούν να αναπτύσσονται σε δοχεία με αμμώδη πηλό, πηλώδη άμμο ή αμμοαργιλώδη πηλό, που να περιέχει έως 1,5 τοις εκατό οργανικό άνθρακα (περίπου 3 τοις εκατό οργανική ύλη). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί χώμα εμπορίου για γλάστρες ή μείγμα συνθετικού εδάφους που να περιέχει έως 1,5 τοις εκατό οργανικό άνθρακα. Τα αργιλώδη εδάφη δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, εάν είναι γνωστό ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία έχει υψηλή συγγένεια με την άργιλο. Το έδαφος αγρού θα πρέπει να διέρχεται από κόσκινο με σπές μεγέθους 2 mm, ώστε να ομογενοποιείται και να απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα σωματίδια. Θα πρέπει να δηλώνονται ο τύπος και η υφή, το ποσοστό (%) οργανικού άνθρακα, το pH και η περιεκτικότητα σε άλατα, καθώς και η ηλεκτρονική αγωγιμότητα του τελικού προετοιμασμένου εδάφους. Το έδαφος θα πρέπει να ταξινομείται σύμφωνα με τυποποιημένο σύστημα ταξινόμησης (11). Το έδαφος θα μπορούσε να υποβάλλεται σε παστερίωση ή σε θερμική επεξεργασία, ώστε να μειώνεται η επίδραση των παθογόνων του εδάφους.
9. Το φυσικό έδαφος μπορεί να περιπλέξει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και να αυξήσει τη μεταβλητότητα, λόγω των διαφορετικών φυσικών/χημικών ιδιοτήτων και μικροβιακών πληθυσμών. Με τη σειρά τους, αυτές οι μεταβλητές μεταβάλλουν την ικανότητα κατακράτησης υγρασίας, την ικανότητα δημιουργίας χημικών δεσμών, τον αερισμό και την περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία και ιχνοστοιχεία. Εκτός από τη μεταβλητότητα των συγκεκριμένων φυσικών παραγόντων, θα υπάρξει μεταβλητότητα και στις χημικές ιδιότητες, όπως στο pH και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (12) (13) (14).
10. Κατά κανόνα, τα τεχνητά υποστρώματα δεν χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή δοκιμών σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αλλά μπορεί να χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή δοκιμών σε χημικές ουσίες εν γένει ή όταν είναι επιθυμητό να ελαχιστοποιηθεί η μεταβλητότητα των φυσικών εδαφών και να αυξηθεί η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να αποτελούνται από αδρανή υλικά που ελαχιστοποιούν την αλληλεπίδραση με την υπό δοκιμή χημική ουσία, τον φορέα διαλύτη, ή και τα δύο. Έχει διαπιστωθεί ότι η εκπλυμένη με οξύ χαλαζιακή άμμος, ο ορυκτοβάμβακας και τα γυάλινα σφαιρίδια (π.χ. με διάμετρο 0,35 έως 0,85 mm) συνιστούν κατάλληλα αδρανή υλικά που απορροφούν ελάχιστα την υπό δοκιμή χημική ουσία (15), εξασφαλίζοντας έτσι τη μέγιστη διαθεσιμότητα της χημικής ουσίας στο σπορόφυτο μέσω πρόσληψης από τις ρίζες. Ορισμένα από τα ακατάλληλα υποστρώματα είναι ο βερμικουλίτης, ο περλίτης και άλλα εξαιρετικά απορροφητικά υλικά. Θα πρέπει να παρέχονται τα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των φυτών, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα φυτά δεν υφίστανται καταπόνηση λόγω ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων, κάτι που θα πρέπει να εκτιμάται, όταν είναι εφικτό, μέσω χημικής ανάλυσης ή με οπτική αξιολόγηση των φυτών ελέγχου.

Κριτήρια για την επιλογή των υπό δοκιμή ειδών

11. Τα είδη που επιλέγονται θα πρέπει να ανήκουν σε ικανοποιητικά εκτενές φάσμα –π.χ. όσον αφορά την ταξινομική πολυμορφία τους στο φυτικό βασίλειο, την κατανομή τους, την αφθονία τους, τα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους και την περιοχή της φυσικής παρουσίας τους–, ώστε να αναπτύσσεται ένα εύρος αποκρίσεων (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Για την επιλογή θα πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά των πιδανών υπό δοκιμή ειδών:
- τα είδη έχουν ομοιόμορφους σπόρους οι οποίοι είναι άμεσα διαθέσιμοι από αξιόπιστες τυποποιημένες πηγές και παράγουν σταθερή, αξιόπιστη και ομοιόμορφη εκβλάστηση, καθώς και ομοιόμορφη ανάπτυξη των σποροφύτων·
 - τα φυτά μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμές στο εργαστήριο και μπορούν να παράγουν αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα εντός της ίδιας εγκατάστασης δοκιμών ή μεταξύ διαφορετικών εγκαταστάσεων δοκιμών·
 - η ευαισθησία των υπό δοκιμή ειδών θα πρέπει να αντιστοιχεί στις αποκρίσεις των φυτών τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον που εκτίθεται στη χημική ουσία·
 - έχουν χρησιμοποιηθεί, ως έναν βαθμό, σε προηγούμενες δοκιμές τοξικότητας και η χρήση τους –π.χ. σε βιοδοκιμασίες ζιζανιοκτόνων, στο κοσκίνισμα βαρέων μετάλλων, σε δοκιμές αντοχής στην αλατότητα ή σε ανόργανες ουσίες, ή σε μελέτες αλληλοπάθειας– παρουσιάζει ευαισθησία σε μεγάλο φάσμα παραγόντων καταπόνησης·
 - είναι συμβατά με τις συνθήκες ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμών·
 - πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.

Ορισμένα από τα είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα σε δοκιμές κατά το παρελθόν παρατίθενται στο προσάρτημα 2, και τα πιθανά μη καλλιεργούμενα είδη παρατίθενται στο προσάρτημα 3.

12. Ο αριθμός των ειδών που θα υποβληθούν σε δοκιμές εξαρτάται από τις σχετικές κανονιστικές απαιτήσεις και, ως εκ τούτου, δεν προσδιορίζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

13. Η χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται σε κατάλληλο φορέα (π.χ. νερό, ακετόνη, αιθανόλη, αιθυλενογλυκόλη, αραβικό κόμμι, άμμος). Μπορούν επίσης να υποβληθούν σε δοκιμή τα μείγματα (παρασκευασμένα προϊόντα ή παρασκευάσματα) που περιέχουν ενεργά συστατικά και διάφορες βοηθητικές ουσίες.

Ενσωμάτωση στο έδαφος ή σε τεχνητό υπόστρωμα

14. Οι χημικές ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές ή αιωρούνται στο νερό μπορούν να προστίθενται σε νερό και, στη συνέχεια, το διάλυμα αναμειγνύεται με έδαφος με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης ανάδευσης. Αυτός ο τύπος δοκιμής μπορεί να ενδείκνυται σε περίπτωση που η έκθεση στη χημική ουσία πραγματοποιείται μέσω του εδάφους ή του ενδοπορικού νερού του εδάφους, και εάν υπάρχει κίνδυνος πρόσληψης από τις ρίζες. Η προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την υδατοχωρητικότητα του εδάφους. Ο όγκος του προστιθέμενου νερού θα πρέπει να είναι ίδιος για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, αλλά θα πρέπει να είναι περιορισμένος ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων εδάφους.
15. Οι χημικές ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη (π.χ. ακετόνη, αιθανόλη) και να αναμειγνύονται με άμμο. Στη συνέχεια, ο διαλύτης μπορεί να απομακρύνεται από την άμμο με τη βοήθεια ενός ρεύματος αέρα, με συνεχή ανάμειξη της άμμου. Η άμμος που έχει υποστεί αγωγή αναμειγνύεται με το πειραματικό έδαφος. Παρασκευάζεται δεύτερος μάρτυρας, ο οποίος αποτελείται μόνο από άμμο και διαλύτη. Σε κάθε επίπεδο της αγωγής και στον δεύτερο μάρτυρα προστίθενται ίσες ποσότητες άμμου, της οποίας ο διαλύτης αναμειγνύεται και απομακρύνεται. Όταν πρόκειται για στερεές και αδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, το ξηρό έδαφος και η χημική ουσία αναμειγνύονται σε κατάλληλη διάταξη ανάμειξης. Ακολούθως, το έδαφος προστίθεται στα δοχεία και οι σπόροι φυτεύονται αμέσως.
16. Σε περίπτωση που, αντί εδάφους, χρησιμοποιείται τεχνητό υπόστρωμα, οι χημικές ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές μπορούν να διαλύονται σε θρεπτικό διάλυμα ακριβώς πριν από την έναρξη της δοκιμής. Οι χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά μπορούν να αιωρούνται στο νερό με τη βοήθεια φορέα διαλύτη, θα πρέπει να προστίθενται μαζί με τον φορέα στο θρεπτικό διάλυμα. Οι μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες, για τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμος μη τοξικός υδατοδιαλυτός φορέας, θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη. Το διάλυμα αναμειγνύεται με άμμο ή γυάλινα σφαιρίδια, τοποθετείται σε περιστροφική συσκευή κενού και εξατμίζεται, σχηματίζοντας ενιαία επικάλυψη της χημικής ουσίας στην άμμο ή στα σφαιρίδια. Ένα ζυγισμένο τμήμα των σφαιριδίων θα πρέπει να εξάγεται με τον ίδιο οργανικό διαλύτη και τη χημική ουσία της δοκιμής πριν από την πλήρωση των δοχείων.

Επιφανειακή εφαρμογή

17. Στην περίπτωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμοποιείται συχνά ψεκάσμος της επιφάνειας του εδάφους με το διάλυμα δοκιμής. Ο σχεδιασμός και η χωρητικότητα όλου του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την εκτέλεση των δοκιμών, συμπεριλαμβανομένου του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή και τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να εξασφαλίζουν ότι οι δοκιμές στις οποίες αυτός χρησιμοποιείται μπορούν να διεξαχθούν με ακρίβεια και να παρέχουν αναπαραγωγίμη κάλυψη. Η κάλυψη θα πρέπει να είναι ομοιόμορφη σε όλες τις επιφάνειες του εδάφους. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να απομακρύνεται η πιθανότητα προσρόφησης των χημικών ουσιών από τον εξοπλισμό ή αντίδρασης τους με αυτόν (π.χ. πλαστικές σωληνώσεις και λιπόφιλες χημικές ουσίες ή εξαρτήματα και στοιχεία από χάλυβα). Η υπό δοκιμή χημική ουσία ψεκάζεται πάνω στην επιφάνεια του εδάφους, κατά προσομοίωση των συνήθων εφαρμογών με δεξαμενή ψεκάσμου. Γενικά, ο όγκος των ψεκασμών θα πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους που χρησιμοποιείται στη συνήθη γεωργική πρακτική και θα πρέπει να δηλώνεται (ποσότητα νερού κ.λπ.). Ο τύπος του ακροφυσίου που επιλέγεται θα πρέπει να εξασφαλίζει την ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειας του εδάφους. Σε περίπτωση που εφαρμόζονται διαλύτες και φορείς, θα πρέπει να δημιουργείται δεύτερη ομάδα φυτών ελέγχου, η οποία να λαμβάνει μόνο τον διαλύτη/φορέα. Αυτό δεν είναι απαραίτητο για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα τα οποία υποβάλλονται σε δοκιμή με τη μορφή παρασκευασμάτων.

Επαλήθευση της συγκέντρωσης/ποσότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

18. Οι συγκεντρώσεις/ποσότητες εφαρμογής πρέπει να επιβεβαιώνονται με κατάλληλη αναλυτική επαλήθευση. Εάν πρόκειται για διαλυτές χημικές ουσίες, η επαλήθευση όλων των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής μπορεί να επιβεβαιώνεται με ανάλυση της υψηλότερης συγκέντρωσης του διαλύματος δοκιμής, συνοδευόμενη από στοιχεία τεκμηρίωσης σχετικά με την επακόλουθη διάλυση και χρήση του βαθμονομημένου εξοπλισμού εφαρμογής (π.χ. βαθμονομημένα αναλυτικά γυάλινα σκεύη και όργανα, βαθμονόμηση του ψεκαστικού εξοπλισμού). Εάν πρόκειται για αδιάλυτες χημικές ουσίες, η επαλήθευση του σύνθετου υλικού πρέπει να παρέχεται με τη ζύγιση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προστίθεται στο έδαφος. Εάν απαιτείται απόδειξη της ομοιογένειας, μπορεί να κρίνεται αναγκαία η ανάλυση του εδάφους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σχεδιασμός της δοκιμής

19. Οι σπόροι του ίδιου είδους φυτεύονται σε δοχεία. Ο αριθμός των σπόρων που φυτεύονται σε κάθε δοχείο εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος του δοχείου και τη διάρκεια της δοκιμής. Ο αριθμός των φυτών ανά δοχείο θα πρέπει να παρέχει κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και να αποτρέπει τον υπερπληθυσμό κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Η μέγιστη πυκνότητα των φυτών θα πρέπει να είναι μεταξύ 3 — 10 σπόροι ανά 100 cm², ανάλογα με το μέγεθος των σπόρων. Για παράδειγμα, συνιστώνται ένα ή δύο φυτά αραβοσίτου, σόγιας, τομάτας, αγγουριού ή ζαχαρότευτλων ανά περιέκτη 15 cm· τρία φυτά κράμβης ή αρακά ανά περιέκτη 15 cm· και 5 έως 10 σπόροι κρεμμυδιού, σιταριού ή άλλοι μικροί σπόροι ανά περιέκτη 15 cm. Ο αριθμός των σπόρων και των δοχείων επανάληψης (ως επανάληψη ορίζεται το δοχείο και, γι' αυτό, τα φυτά του ίδιου δοχείου δεν αποτελούν επανάληψεις) θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη στατιστική ανάλυση (21). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η μεταβλητότητα θα είναι μεγαλύτερη για υποδοκιμή είδη για τα οποία χρησιμοποιείται μικρότερος αριθμός μεγάλων σπόρων ανά δοχείο (επανάληψη), σε σύγκριση με υποδοκιμή είδη για τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός μικρών σπόρων ανά δοχείο. Η φύτευση ίσου αριθμού σπόρων σε κάθε δοχείο μπορεί να ελαχιστοποιήσει αυτή τη μεταβλητότητα.
20. Η χρήση των ομάδων ελέγχου εξασφαλίζει ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις συνδέονται μόνο με την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή αποδίδονται μόνο στην εν λόγω έκθεση. Η κατάλληλη ομάδα ελέγχου θα πρέπει να είναι πανομοιότυπη από κάθε άποψη με την ομάδα δοκιμής, με εξαίρεση την έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Στο πλαίσιο συγκεκριμένης δοκιμής, όλα τα φυτά δοκιμής –συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων– θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή. Για να αποφεύγεται η μεροληψία, απαιτείται η τυχαία κατανομή των δοχείων δοκιμής και ελέγχου.
21. Οι σπόροι που είναι επικαλυμμένοι με εντομοκτόνο ή μυκητοκτόνο (δηλ. οι επενδυμένοι σπόροι) θα πρέπει να αποφεύγονται. Ωστόσο, η χρήση ορισμένων μη συστημικών μυκητοκτόνων επαφής (π.χ. Captan, Thiram) επιτρέπεται από ορισμένες κανονιστικές αρχές (22). Εάν υπάρχει κίνδυνος παρουσίας παθογόνων που μεταφέρονται με τον σπόρο, οι σπόροι μπορεί να εμποτίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε ασθενές διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5 % και, στη συνέχεια, να εκπλύνονται διεξοδικά με τρεχούμενο νερό και να ξηραίνονται. Δεν επιτρέπεται η θεραπευτική αγωγή με άλλο φυτοπροστατευτικό προϊόν.

Συνθήκες δοκιμής

22. Οι συνθήκες δοκιμής θα πρέπει να προσεγγίζουν τις συνθήκες που είναι αναγκαίες για την κανονική ανάπτυξη των υπό δοκιμή ειδών και ποικιλιών (στο προσάρτημα 4 παρατίθενται παραδείγματα συνθηκών δοκιμής). Τα αναδυόμενα φυτά θα πρέπει να διατηρούνται υπό ορθές φυτοκομικές πρακτικές σε θαλάμους ελεγχόμενου περιβάλλοντος, φυτότρα ή θερμοκήπια. Όταν χρησιμοποιούνται εγκαταστάσεις καλλιέργειας, αυτές οι πρακτικές περιλαμβάνουν συνήθως τον έλεγχο και την επαρκώς συχνή (π.χ. ημερήσια) καταγραφή της θερμοκρασίας, της υγρασίας, της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα, του φωτός (φωτεινή ένταση, μήκος κύματος, φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία) και της φωτοπερίοδου, των ποτιστικών μέσων κ.λπ., ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητική ανάπτυξη του φυτού, όπως εκτιμάται από τα φυτά ελέγχου του επιλεγμένου είδους. Οι θερμοκρασίες στα θερμοκήπια θα πρέπει να ελέγχονται μέσω συστημάτων αερισμού, θέρμανσης και/ή ψύξης. Κατά κανόνα, για την εκτέλεση δοκιμών σε θερμοκήπια συνιστώνται οι ακόλουθες συνθήκες:

— θερμοκρασία: 22 °C ± 10 °C·

— υγρασία: 70 % ± 25 %·

— φωτοπερίοδος: τουλάχιστον 16 ώρες φωτός·

— φωτεινή ένταση: 350 ± 50 μE/m²/s. Μπορεί να κρίνεται αναγκαίο να υπάρξει επιπλέον φωτισμός, εάν η ένταση μειώνεται σε λιγότερο από 200 μE/m²/s, μήκος κύματος 400 - 700 nm, εκτός εάν πρόκειται για είδη με χαμηλότερες απαιτήσεις φωτός.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες θα πρέπει να παρακολουθούνται και να δηλώνονται κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τα φυτά θα πρέπει να καλλιεργούνται σε μη πορώδη πλαστικά ή στιλβωμένα δοχεία τοποθετημένα επάνω σε δίσκο ή πιάτο. Η θέση των δοχείων μπορεί να αλλάζει κατά διαστήματα, ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα ως προς την ανάπτυξη των φυτών (λόγω των διαφορετικών συνθηκών δοκιμής στις εγκαταστάσεις καλλιέργειας). Τα δοχεία πρέπει να είναι αρκετά μεγάλα ώστε να επιτρέπουν την κανονική ανάπτυξη.

23. Τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους μπορούν να συμπληρώνονται εάν κρίνεται αναγκαίο, ώστε να διατηρείται ικανοποιητική ευρωστία του φυτού. Η αναγκαιότητα και το χρονοδιάγραμμα χορήγησης επιπλέον θρεπτικών στοιχείων μπορούν να αξιολογούνται με παρατήρηση των φυτών ελέγχου. Συνιστάται το πότισμα από το κάτω μέρος των δοχείων (π.χ. με τη χρήση φυτιλιών από υαλόνημα). Ωστόσο, το πότισμα από το επάνω μέρος μπορεί να χρησιμοποιείται στην αρχή για να διεγείρεται η εκβλάστηση των σπόρων και, σε περίπτωση εφαρμογής στην επιφάνεια του εδάφους, να διευκολύνεται η εισαγωγή της χημικής ουσίας στο έδαφος.

24. Οι συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το υπό δοκιμή είδος και την υπό δοκιμή χημική ουσία που εξετάζονται. Τα φυτά ελέγχου και τα φυτά που έχουν υποβληθεί σε αγωγή πρέπει να διατηρούνται στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη έκθεση (π.χ. πτητικών χημικών ουσιών) μεταξύ διαφορετικών αγωγών, καθώς και η έκθεση των μαρτύρων στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Δοκιμές σε μία συγκέντρωση/ποσότητα

25. Για να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση/ποσότητα μιας χημικής ουσίας με σκοπό την εκτέλεση δοκιμής σε μία μόνο συγκέντρωση ή ποσότητα (πρόκληση/όριο), πρέπει να εξετάζεται μια σειρά παραγόντων. Για τις χημικές ουσίες εν γένει, αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τις φυσικές/χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, πρέπει να εξετάζονται οι φυσικές/χημικές ιδιότητες και ο τρόπος χρήσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η μέγιστη συγκέντρωση ή ποσότητα εφαρμογής της, ο αριθμός εφαρμογών ανά περίοδο και/ή η παραμονή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για να προσδιοριστεί κατά πόσον μια γενική χημική ουσία διαθέτει φυτοτοξικές ιδιότητες, μπορεί να κρίνεται σκόπιμο να εκτελεστεί η δοκιμή σε μέγιστο επίπεδο 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους.

Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών

26. Εάν κρίνεται αναγκαίο, η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών θα μπορούσε να εκτελείται ώστε να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις/ποσότητες προς δοκιμή στο πλαίσιο οριστικής μελέτης δόσης-απόκρισης. Στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, οι συγκεντρώσεις/ποσότητες δοκιμής θα πρέπει να απέχουν πολύ μεταξύ τους (π.χ. 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους). Στην περίπτωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οι συγκεντρώσεις/ποσότητες θα μπορούσαν να βασίζονται στη συνιστώμενη ή μέγιστη συγκέντρωση/ποσότητα εφαρμογής, π.χ. 1/100, 1/10, 1/1 της συνιστώμενης ή μέγιστης συγκέντρωσης/ποσότητας εφαρμογής.

Δοκιμές σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες

27. Ο στόχος της δοκιμής σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες είναι να καθορίζεται η σχέση δόσης-απόκρισης και να προσδιορίζεται η τιμή της EC_x ή της ER_x σε σχέση με την ανάδυση, τη βιομάζα και/ή τις εμφανείς επιδράσεις σε σύγκριση με τους μάρτυρες που δεν έχουν εκτεθεί στην ουσία, όπως απαιτείται από τις κανονιστικές αρχές.
28. Ο αριθμός των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων και η μεταξύ τους απόσταση θα πρέπει να είναι ικανά ώστε να προσδιορίζονται αξιόπιστα η σχέση δόσης-απόκρισης και η εξίσωση παλινδρόμησης, και να παρέχεται εκτίμηση της EC_x ή της ER_x . Οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις/ποσότητες θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις τιμές της EC_x ή της ER_x οι οποίες πρέπει να προσδιοριστούν. Για παράδειγμα, εάν απαιτείται τιμή της EC_{50} , θα ήταν επιθυμητό να εκτελείται η δοκιμή σε ποσότητες που προκαλούν επίδραση 20 έως 80 %. Ο συνιστώμενος αριθμός των συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής για την επίτευξη αυτής της επίδρασης πρέπει να είναι τουλάχιστον πέντε σε γεωμετρική πρόοδο συν ένας μάρτυρας που δεν έχει υποβληθεί σε αγωγή, και ο παράγοντας της μεταξύ τους απόστασης δεν πρέπει να υπερβαίνει το τρία. Για κάθε ομάδα αγωγής και ελέγχου, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 και ο συνολικός αριθμός των σπόρων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20. Για να αυξηθεί η στατιστική ισχύς της δοκιμής, ενδέχεται να χρειαστούν περισσότερες επαναλήψεις εάν πρόκειται για φυτά με χαμηλό ρυθμό εκβλάστησης ή ποικίλη αυξητική συμπεριφορά. Εάν χρησιμοποιείται μεγαλύτερος αριθμός συγκεντρώσεων/ποσοτήτων δοκιμής, ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να μειωθεί. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η NOEC, μπορεί να χρειαστούν περισσότερες επαναλήψεις ώστε να εξασφαλιστεί η επιθυμητή στατιστική ισχύς (23).

Παρατηρήσεις

29. Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης, δηλ. από 14 έως 21 ημέρες μετά την ανάδυση του 50 % των φυτών ελέγχου (και των μαρτύρων με τον διαλύτη, κατά περίπτωση), τα φυτά εξετάζονται συχνά (τουλάχιστον σε εβδομαδιαία και, εάν είναι δυνατόν, σε ημερήσια βάση), ώστε να παρακολουθούνται η ανάδυση, η ορατή φυτοτοξικότητα και η θνησιμότητα. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να καταγράφεται η μέτρηση της ποσοστιαίας ανάπτυξης και της βιομάζας των φυτών που επιζούν, καθώς και οι εμφανείς βλαβερές επιδράσεις σε διάφορα μέρη του φυτού. Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν ανωμαλίες στην εμφάνιση των αναδυόμενων σποροφύτων, καθυστέρηση ανάπτυξης, χλώρωση, αποχρωματισμό, θνησιμότητα και επιδράσεις στην ανάπτυξη του φυτού. Η τελική βιομάζα μπορεί να μετράται με βάση το τελικό μέσο ξηρό βάρος των βλαστών των φυτών που επιζούν, με συλλογή των βλαστών στην επιφάνεια του εδάφους και με ξήρανσή τους μέχρι σταθερού βάρους στους 60 °C. Εναλλακτικά, η τελική βιομάζα μπορεί να μετράται με βάση το υγρό βάρος των βλαστών. Το ύψος των βλαστών μπορεί να είναι ένα άλλο τελικό σημείο, εάν απαιτείται από τις κανονιστικές αρχές. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ενιαίο σύστημα βαθμολόγησης για εμφανείς κακώσεις, ώστε να αξιολογούνται οι παρατηρήσιμες τοξικές αποκρίσεις. Παραδείγματα εκτέλεσης ποιοτικών και ποσοτικών οπτικών εκτιμήσεων παρέχονται στις βιβλιογραφικές παραπομπές (23) και (24).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Στατιστική ανάλυση*Δοκιμή σε μία συγκέντρωση/ποσότητα*

30. Τα δεδομένα για κάθε είδος φυτού θα πρέπει να αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλης στατιστικής μεθόδου (21). Θα πρέπει να δηλώνεται το επίπεδο της επίδρασης στη συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής, ή η αδυναμία επίτευξης συγκεκριμένης επίδρασης στη συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής (π.χ., $< x$ % της παρατηρούμενης επίδρασης σε συγκέντρωση ή ποσότητα y).

Δοκιμή σε πολλαπλές συγκεντρώσεις/ποσότητες

31. Η σχέση δόσης-απόκρισης καθορίζεται με εξίσωση παλινδρόμησης. Μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα μοντέλα: π.χ. για την εκτίμηση της EC_x ή της ER_x (π.χ. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) και των ορίων εμπιστοσύνης τους όσον αφορά την ανάδυσή θα μπορούσαν να είναι κατάλληλες η μέθοδος δεδομένων που δέχονται μόνο δύο τιμές, η μέθοδος μονάδων logit, probit ή Weibull, η μέθοδος Spearman-Kärber, η απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Kärber κ.ά. Για να εκτιμηθεί η ανάπτυξη των σποροφύτων (βάρους και ύψος) με τη μορφή συνεχών τελικών σημείων, η EC_x ή η ER_x και τα όρια εμπιστοσύνης τους μπορούν να εκτιμηθούν με τη βοήθεια κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης [π.χ. η ανάλυση με μη γραμμική παλινδρόμηση Bruce-Versteeg (25)]. Στο μέτρο του δυνατού, η R^2 θα πρέπει να είναι ίση με 0,7 ή υψηλότερη για τα πιο ευαίσθητα είδη και οι συγκεντρώσεις/ποσότητες δοκιμής που χρησιμοποιούνται να περιλαμβάνουν επιδράσεις 20 % έως 80 %. Εάν πρέπει να εκτιμηθεί η NOEC, θα πρέπει να προτιμάται η διενέργεια ισχυρών στατιστικών δοκιμών, οι οποίες θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την κατανομή δεδομένων (21) (26).

Έκθεση δοκιμής

32. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να παρουσιάζει τα αποτελέσματα των μελετών, λεπτομερή περιγραφή των συνθηκών δοκιμής, διεξοδική εξέταση των αποτελεσμάτων, ανάλυση των δεδομένων, καθώς και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανάλυση. Θα πρέπει να παρέχονται περιλήψη σε μορφή πίνακα και σύνοψη των αποτελεσμάτων. Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- δεδομένα χημικής ταυτοποίησης, σχετικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. $\log P_{ow}$, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών και πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τη συμπεριφορά της στο περιβάλλον, εάν είναι διαθέσιμες)·
- λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του διαλύματος δοκιμής και επαλήθευση των συγκεντρώσεων δοκιμής, όπως προσδιορίζονται στο σημείο 18.

Ελεγχόμενο είδος:

- λεπτομέρειες σχετικά με τον οργανισμό δοκιμής: είδος/ποικιλία, οικογένειες φυτών, επιστημονικές και κοινές ονομασίες, πηγή και ιστορικό του σπόρου με όσο το δυνατόν περισσότερες λεπτομέρειες (δηλ. όνομα του προμηθευτή, ποσοστό εκβλάστησης, τάξη μεγέθους του σπόρου, αριθμός παρτίδας, έτος σποράς ή καλλιεργητική περίοδος συλλογής, ημερομηνία αξιολόγησης της εκβλάστησης), βιωσιμότητα κ.λπ.·
- αριθμός των μονοκυττάρων και δικυττάρων ειδών που υποβλήθηκαν στη δοκιμή·
- σκεπτικό για την επιλογή των ειδών·
- περιγραφή της αποθήκευσης, της επεξεργασίας και της διατήρησης των σπόρων.

Συνθήκες δοκιμής:

- εγκαταστάσεις δοκιμών (π.χ. θάλαμος ανάπτυξης, φυτότρο και θερμοκήπιο)·
- περιγραφή του συστήματος της δοκιμής (π.χ. διαστάσεις των δοχείων, υλικό των δοχείων και ποσότητες εδάφους)·
- χαρακτηριστικά του εδάφους [υφή ή τύπος του εδάφους: κατανομή και ταξινόμηση των σωματιδίων του εδάφους, φυσικές και χημικές ιδιότητες, όπως το ποσοστό (%) οργανικής ύλης, το ποσοστό (%) οργανικού άνθρακα και το pH]·
- παρασκευή εδάφους/υποστρώματος (π.χ. έδαφος, τεχνητό έδαφος, άμμος και άλλα) πριν από τη δοκιμή·
- περιγραφή του θρεπτικού μέσου, εάν χρησιμοποιείται·

- εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: περιγραφή της μεθόδου εφαρμογής, περιγραφή του εξοπλισμού, βαθμός έκθεσης και όγκος, συμπεριλαμβανομένης της χημικής επαλήθευσης, περιγραφή της μεθόδου βαθμονόμησης και περιγραφή των περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την εφαρμογή·
- συνθήκες ανάπτυξης: φωτεινή ένταση (π.χ. PAR, φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία), φωτοπερίοδος, μέγιστες/ελάχιστες θερμοκρασίες, χρονοδιάγραμμα και μέθοδος ποτίσματος, γονιμοποίηση·
- αριθμός σπόρων ανά δοχείο, αριθμός φυτών ανά δόση, αριθμός επαναλήψεων (δοχείων) ανά βαθμό έκθεσης·
- είδος και αριθμός μαρτύρων (αρνητικοί και/ή θετικοί μάρτυρες, τυχόν μάρτυρας με τον διαλύτη)·
- διάρκεια της δοκιμής.

Αποτελέσματα:

- πίνακας όλων των τελικών σημείων για κάθε επανάληψη, συγκέντρωση/ποσότητα δοκιμής και είδος·
- αριθμός και ποσοστό ανάδυσης σε σύγκριση με τους μάρτυρες·
- μετρήσεις βιομάζας (ξηρό ή υγρό βάρος των βλαστών) των φυτών ως ποσοστό των μαρτύρων·
- ύψος των βλαστών των φυτών ως ποσοστό των μαρτύρων, εάν μετρώνται·
- ποσοστό εμφανών κακώσεων και ποιοτική και ποσοτική περιγραφή των εμφανών κακώσεων (χλώρωση, νέκρωση, μάρανση, παραμόρφωση των φύλλων και των μίσχων, καθώς και τυχόν απουσία επιδράσεων) που προκαλούνται από την υπό δοκιμή χημική ουσία σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου·
- περιγραφή της κλίμακας αξιολόγησης που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των εμφανών κακώσεων, εάν παρέχεται οπτική εκτίμηση·
- για μελέτες σε μία ποσότητα, θα πρέπει να δηλώνεται το ποσοστό των κακώσεων·
- οι τιμές της EC_x ή της ER_x (π.χ. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) και τα σχετικά όρια εμπιστοσύνης. Όταν διενεργείται ανάλυση παλινδρόμησης, θα πρέπει να παρέχεται το τυπικό σφάλμα για την εξίσωση παλινδρόμησης και το τυπικό σφάλμα για την εκτίμηση μεμονωμένων παραμέτρων (π.χ. κλίση, σημείο τομής)·
- οι τιμές NOEC (και LOEC), εάν υπολογίζονται·
- περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών και παραδοχών που χρησιμοποιούνται·
- γραφική απεικόνιση αυτών των δεδομένων και σχέση δόσης-απόκρισης του είδους που υποβάλλεται σε δοκιμή.

Αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη δοκιμή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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, Κεμπέκ, Καναδάς.
 - (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, Οντάριο, Καναδάς.
 - (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, σ. 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 σ., 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) ΟΟΣΑ (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, Παρίσι.
 - (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) Κεφάλαιο Γ.33 του παρόντος παραρτήματος: Δοκιμασία αναπαραγωγής γαισκολήκων (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Δραστικό συστατικό (δ.σ.) [ή δραστική ουσία (δ.ο.)]: το υλικό που έχει σχεδιαστεί ώστε να επιφέρει συγκεκριμένη βιολογική επίδραση (π.χ. καταπολέμηση των εντόμων, καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, καταπολέμηση των ζιζανίων στην περιοχή αγωγής), γνωστό και ως δραστικό συστατικό / δραστική ουσία τεχνικής καθαρότητας.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Προϊόντα προστασίας των καλλιεργειών ή φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή παρασιτοκτόνα: υλικά με συγκεκριμένη βιολογική δράση, τα οποία χρησιμοποιούνται σκόπιμα για να προστατεύσουν τις καλλιέργειες από τα παράσιτα (π.χ. μυκητιάσεις, έντομα και ανταγωνιστικά φυτά).

EC_x, x % συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης, ή ER_x, x % ποσότητα παρατηρούμενης επίδρασης: η συγκέντρωση ή η ποσότητα η οποία επιφέρει ανεπιθύμητη μεταβολή ή αλλοίωση x % στο τελικό σημείο δοκιμής που μετράται σε σχέση με τον μάρτυρα (π.χ. η μείωση κατά 25 % ή 50 % στην ανάδυση σποροφύτων, στο ύψος των βλαστών, στον τελικό αριθμό των φυτών που είναι παρόντα, ή η ανάλογη αύξηση των εμφανών κακώσεων θα συνιστούσε, αντίστοιχα, EC₂₅/ER₂₅ ή EC₅₀/ER₅₀).

Ανάδυση: η εμφάνιση του κολοπτιλίου ή του κοτυληδόνου επάνω από την επιφάνεια του εδάφους.

Σκεύασμα: το εμπορικό παρασκευασμένο προϊόν που περιέχει τη δραστική ουσία (το δραστικό συστατικό), γνωστό και ως τελικό σκεύασμα ⁽¹⁾ ή τυπικό τελικό προϊόν.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η ελάχιστη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη LOEC έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα, και υπερβαίνει την τιμή της NOEC.

Μη στοχευόμενα φυτά: τα φυτά που βρίσκονται εκτός της περιοχής των στοχοθετημένων φυτών. Για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ο όρος αυτός αφορά συνήθως τα φυτά που βρίσκονται εκτός της περιοχής αγωγής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η υψηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Φυτοτοξικότητα: επιβλαβείς αποκλίσεις (σύμφωνα με μετρήσεις και οπτικές εκτιμήσεις) από τη συνήθη εμφάνιση και πορεία ανάπτυξης των φυτών ως αντίδραση σε συγκεκριμένη χημική ουσία.

Επανάληψη: η πειραματική μονάδα που αντιπροσωπεύει την ομάδα ελέγχου και/ή την ομάδα αγωγής. Στις εν λόγω μελέτες, ως επανάληψη ορίζεται το δοχείο.

Οπτική εκτίμηση: αξιολόγηση της ορατής βλάβης έπειτα από παρατηρήσεις ως προς τη στήριξη, την ευρωστία, τη δυσμορφία, τη χλώρωση και τη νέκρωση του φυτού, καθώς και τη συνολική εμφάνισή του σε σύγκριση με μάρτυρα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

⁽¹⁾ Τελικό παρασκεύασμα: το παρασκευασμένο προϊόν που περιέχει τη δραστική χημική ουσία (το δραστικό συστατικό) που πωλείται στο εμπόριο.

Προσάρτημα 2

Κατάλογος ειδών που χρησιμοποιούνται συνήθως στίσε δοκιμές σε φυτά

| Οικογένεια | Είδος | Κοινή ονομασία |
|---------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------|
| DICOTYLEDONAE | | |
| Apiaceae (Umbelliferae) | <i>Daucus carota</i> | Καρότο |
| Asteraceae (Compositae) | <i>Helianthus annuus</i> | Ηλιανθος |
| Asteraceae (Compositae) | <i>Lactuca sativa</i> | Μαρούλι |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Sinapis alba</i> | Σινάπι άσπρο |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i> | Κινέζικο λάχανο |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica napus</i> | Ελαιοκράμβη |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> | Λάχανο |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Brassica rapa</i> | Γογγύλι (ρέβα) |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Lepidium sativum</i> | Κάρδαμο το εδώιμο |
| Brassicaceae (Cruciferae) | <i>Raphanus sativus</i> | Ραπάνι |
| Chenopodiaceae | <i>Beta vulgaris</i> | Ζαχαρότευτλο |
| Cucurbitaceae | <i>Cucumis sativus</i> | Αγγούρι |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>) | Σόγια |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Phaseolus aureus</i> | Φασόλι μούγκο |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Φασίολος ο νάνος και φασίολος ο κοινός |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Pisum sativum</i> | Μπιζέλι |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Trigonella foenum-graecum</i> | Τριγωνέλλα ή μοσχοσίταρο |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Lotus corniculatus</i> | Λωτός ο κερατιοφόρος |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Trifolium pratense</i> | Τριφύλλι το λειμώνιο |
| Fabaceae (Leguminosae) | <i>Vicia sativa</i> | Βίκος ο κοινός |
| Linaceae | <i>Linum usitatissimum</i> | Λινάρι |
| Polygonaceae | <i>Fagopyrum esculentum</i> | Φαγόπυρο το εδώιμο ή μαύρο σιτάρι |
| Solanaceae | <i>Solanum lycopersicon</i> | Τομάτα |

| Οικογένεια | Είδος | Κοινή ονομασία |
|----------------------------|--------------------------|-------------------|
| MONOCOTYLEDONAE | | |
| Liliaceae (Amarylladaceae) | <i>Allium cepa</i> | Κρεμμύδι |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Avena sativa</i> | Βρώμη |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Hordeum vulgare</i> | Κριθάρι |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Lolium perenne</i> | Λόλιο το πολυετές |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Oryza sativa</i> | Ρύζι |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Secale cereale</i> | Σίκαλη |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Sorghum bicolor</i> | Σόργο |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Triticum aestivum</i> | Σιτάρι |
| Poaceae (Gramineae) | <i>Zea mays</i> | Αραβόσιτος |

Κατάλογος πιθανών μη καλλιεργούμενων ειδών

Πιθανά είδη σύμφωνα με τον ΟΟΣΑ για τις δοκιμές τοξικότητας σε φυτά

Σημείωση: Ο ακόλουθος πίνακας παρέχει πληροφορίες για 52 μη καλλιεργούμενα είδη (οι παραπομπές για κάθε εγγραφή δίνονται εντός παρενθέσεων). Οι αναφερόμενοι ρυθμοί ανάδυσης προέρχονται από δημοσιευμένη βιβλιογραφία και παρέχονται μόνο ως γενική κατεύθυνση. Η προσωπική πείρα μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την πηγή του σπόρου και άλλους παράγοντες.

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαίτημα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Τοριλίδα της Ιαπωνίας) | A, B διαταραγμένες περιοχές, θαμνοστοιχίες, βοσκότοποι (16, 19) | 1,7 — 1,9 (14, 19) | L = D (14) | 0 (1, 19) | 5 (50 %) (19) | ψυχρή στρωμάτωση (7, 14, 18, 19) η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 19) καμία ειδική αγωγή (5) | POST (5) | | |
| ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Μαργαρίτα) | P χορτολιβαδικές εκτάσεις, αρόσιμες εκτάσεις, χλοοτάπητες (16, 19) | 0,09 — 0,17 (4, 19) | L = D (14) | 0 (4) | 3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18) | η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) καμία ειδική αγωγή (4, 14) | POST (4) | A, Δ, ΣΤ | 7 |
| <i>Centaurea cyanus</i> (Κύανος ή κενταύρια) | A αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαίτηματα (16) | 4,1 — 4,9 (4, 14) | L = D (14) | 0-3 (2, 4, 14) | 14-21 (100 %) (14) | καμία ειδική αγωγή (2, 4) | POST (2,4) | A, Δ, E, ΣΤ | 7 |
| <i>Centaurea nigra</i> (Κενταύρια η μελανή) | P αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαίτηματα (16, 19) | 2,4 — 2,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18) | η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (18, 19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 26) | POST (5, 22, 26) | A | |
| <i>Inula helenium</i> (Ίνουλα ή ελένιο) | P υγρά, διαταραγμένα μέρη (16) | 1 — 1,3 (14, 29) | | 0 (4, 29) | | καμία ειδική αγωγή (4) | POST (4) | A, ΣΤ | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής ⁽¹⁾ και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ⁽²⁾ | Βάθος φύτευσης (mm) ⁽³⁾ | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ⁽⁴⁾ | Ειδικές αγωγές ⁽⁵⁾ | Δοκιμή τοξικότητας ⁽⁶⁾ | Προμηθευτές σπόρων ⁽⁷⁾ | Άλλες παραπομπές ⁽⁸⁾ |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Leontodon hispidus</i> (Λεοντόδους) | P αγροί, παρυφές δρόμων, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,85 — 1,2 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (17, 18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 23) | POST (5, 22, 23) | | |
| <i>Rudbeckia hirta</i> (Ρουντπέκια) | B, P διαταραγμένες περιοχές (16) | 0,3 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4, 33) | < 10 (100 %) (33) | καμία ειδική αγωγή (4, 14, 33) | POST (4, 33) | Γ, Δ, Ε, ΣΤ | |
| <i>Solidago canadensis</i> (Σολιντάγκο του Καναδά ή канаδική χρυσόβεργα) | P βοσκότοποι, ανοικτές περιοχές (16) | 0,06 — 0,08 (4, 14) | L = D (11) | 0 (4) | 14-21 (11) | ανάμειξη με ίση ποσότητα άμμου και εμποτισμός σε 500 ppm GA για 24 ώρες (11) καμία ειδική αγωγή (4) | POST (4) | Ε, ΣΤ | |
| <i>Xanthium pensylvanicum</i> (Ξάνθιο) | A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16) | 25 — 61 (14, 29) | | 0 (1) 5 (29) | | πιθανή αναστολή της εκβλάστησης λόγω σκότους (1) εμποτισμός σε θερμό νερό για 12 ώρες (29) | PRE & POST (31) | A | |
| <i>Xanthium spinosum</i> (Ξάνθιο το αγκαθωτό) | A ανοικτά ενδιαιτήματα (16) | 200 (14) | L = D (14) L > D (6) | 10 (6) | | τραυματισμός (14) καμία ειδική αγωγή (6) | PRE & POST (6) | A | |
| <i>Xanthium strumarium</i> (Ξάνθιο το χειράδιο) | A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16) | 67,4 (14) | L = D (14) | 10 — 20 (6, 21) | | καμία ειδική αγωγή (6, 14, 21) | PRE & POST (6, 21, 28, 31) | A | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής ⁽¹⁾ και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ⁽²⁾ | Βάθος φύτευσης (mm) ⁽³⁾ | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ⁽⁴⁾ | Ειδικές αγωγές ⁽⁵⁾ | Δοκιμή τοξικότητας ⁽⁶⁾ | Προμηθευτές σπόρων ⁽⁷⁾ | Άλλες παραπομπές ⁽⁸⁾ |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Καρδαμίνη η λιβαδική ή Καρδαμίνη των αγρών) | P αγροί, παρυφές δρόμων, χλοοτάπητες (16, 19) | 0,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22) | POST (5, 22) | ΣΤ | |
| CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Λυχνίς ή το άνθος του κούκου) | P (16) | 0,21 (14) | L = D (14) | | < 14 (100 %) (14, 25) | η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (18) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 15, 22-26) | POST (5, 15, 22-26) | ΣΤ | |
| CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (Χηνοπόδιο το λευκό ή λουβουδιά) | A παρυφές αγρών, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,7 — 1,5 (14, 19, 34) | L = D (14) | 0 (1, 19) | 2 (50 %) (19) | η αγωγή διαφέρει ανάλογα με το χρώμα των σπόρων (19) λήθαργος σε εν ξηρώ αποθήκευση (19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 18, 19) ψυχρή στρωμάτωση (18) καμία ειδική αγωγή (14, 34) | PRE & POST (28, 31, 34) | A | 32 |
| CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Υπερικόν το διάτρητον, κοινώς βάλσαμο, βάλσαμο-χορτο ή σπαθίδα) | P αγροί, αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19) | 0,1 — 0,23 (14, 19) | L = D (14) | 0 (1, 19) | 3 (19) 11 (90 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 18, 19) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 15, 25, 27) | POST (5, 15, 25, 27) | A, E, ΣΤ | |
| CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Αγριοφασουλιά) | A παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα, σπαγροί (16) | 28,2 (14) | L > D (6, 10) | 10 — 20 (6, 10, 21) | 4 (100 %) (10) | η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (6, 21) | PRE & POST (6, 12, 21, 28) | A | |
| CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Κύπειρος ο στρογγυλός) | P αρόσιμες εκτάσεις, βοσκότοποι, παρυφές δρόμων (16, 30) | 0,2 (14) | L = D (14) | 0 (1) 10 — 20 (6, 10) | 12 (91 %) (10) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (6, 10, 14) | PRE & POST (6, 28, 31) | B | 7 |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Λωτός ο κερατιοφόρος ή αγριοτριφύλλι) | P λειμώνες, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19) | 1 — 1,67 (14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %) (19) | τραυματισμός (14, 19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) καμία ειδική αγωγή (23, 25) | POST (5, 23, 25) | A, Δ, E, ΣΤ | |
| <i>Senna obtusifolia</i> (Κασσία) | A υγρά δάση (16) | 23 — 28 (9) | L = D (14) L > D (9) | 10 — 20 (6, 9) | | εμποτισμός σπόρων σε νερό για 24 ώρες (9) τραυματισμός (14) η βιωσιμότητα των σπόρων διαφέρει ανάλογα με το χρώμα (1) καμία ειδική αγωγή (6) | POST (6, 9) | A | |
| <i>Sesbania exaltata</i> (Κάναβη) | A προσχωσιγενή εδάφη (16) | 11 — 13 (9, 14) | L > D (9) | 10 — 20 (9, 21) | | εμποτισμός σπόρων σε νερό για 24 ώρες (9) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (21) | PRE & POST (9, 21, 28, 31) | A | |
| <i>Trifolium pratense</i> Τριφύλλι το λειμώσιο | P αγροί, παρυφές δρόμων, αρόσιμες εκτάσεις (16, 19) | 1,4 — 1,7 (14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %) (19) | τραυματισμός (14, 18) η ωρίμανση μπορεί να κρίνεται απαραίτητη (19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1, 19) καμία ειδική αγωγή (5) | POST (5) | A, E, ΣΤ | |
| LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (Λεόνουρος ή μανοβότανο) | P ανοικτές περιοχές (16) | 0,75 — 1,0 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4) | | καμία ειδική αγωγή (4, 14) | POST (4) | ΣΤ | |
| <i>Mentha spicata</i> (Μίνθη η σταχυώδης ή Δυόσμος) | P υγρές περιοχές (16) | 2,21 (4) | | 0 (4) | | καμία ειδική αγωγή (4) | POST (4) | ΣΤ | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Nepeta cataria</i> (Γλήχωμα το γαλεόφιλον ή νεπέτα ή γατόχορτο) | P διαταραγμένες περιοχές (16) | 0,54 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4) | | καμία ειδική αγωγή (2, 4, 14) | POST (2,4) | ΣΤ | |
| <i>Prunella vulgaris</i> (Προυνέλλα η κοινή ή βουτυρόχορτο) | P αρόσιμες εκτάσεις, λειμώνες, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,58 — 1,2 (4, 14, 19) | L = D (14) | 0 (4, 19) | 5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) καλύτερη εκβλάστηση με μεγαλύτερους σπόρους (1) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 22) | POST (4, 22) | A, ΣΤ | |
| <i>Stachys officinalis</i> (Στάχυς ο φαρμακευτικός) | P χορτολιβαδικές εκτάσεις, παρυφές αγρών (19) | 14 — 18 (14, 19) | L = D (14) | | 7 (50 %) (19) | καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22) | POST (5, 22) | ΣΤ | |
| MALVACEAE <i>Abutilón theophrasti</i> (Αγριοβαμβακιά ή καμπανάκια) | A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16) | 8,8 (14) | L = D (14) | 10 — 20 (6, 10, 21) | 4 (84 %) (10) | τραυματισμός (14) καμία ειδική αγωγή (5, 10, 21) | PRE & POST (6, 22, 28, 31) | A, ΣΤ | |
| <i>Sida spinosa</i> (Σίδη η ακανθώδης) | A αγροί, παρυφές δρόμων (16) | 3,8 (14) | L = D (14) | 10 — 20 (6, 21) | | τραυματισμός (14) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (6, 21) | PRE & POST (6, 21, 28, 31) | A, ΣΤ | |
| PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Παπάβερ η ροιάς ή παπαρούνα) | A αγροί, αρόσιμες εκτάσεις, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,1 — 0,3 (4, 14, 19, 29) | L = D (14) | 0 (4, 29) | 4 (50 %) (19) | ψυχρή στρωμάτωση και τραυματισμός (1, 19, 32) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 29) | POST (4) | A, Δ, E, ΣΤ, Z | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαίτημα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Αγρώστις η λεπτή) | χλοοτάπητες, βοσκότοποι (16) | 0,07 (14) | L > D (10) | 20 (10) | 10 (62 %) (10) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 17-19) καμία ειδική αγωγή (10) | POST (10) | A, E | |
| <i>Alopecurus myosuroides</i> (Αλεπούρα) | A αγροί, ανοικτά ενδιαίτηματα (16) | 0,9 — 1,6 (29, 34) | L = D (14) | 2 (29) | < 24 (30 %) (34) | τραυματισμός (14) αγωγή με 101 mg/l KNO ₃ (14) θερμή στρωμάτωση (1) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (34) | PRE & POST (28, 34) | A | 32 |
| <i>Avena fatua</i> (Αγριοβρώμη) | A καλλιεργούμενες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαίτηματα (16) | 7 — 37,5 (14, 30) | L = D (14) L > D (6) | 10 — 20 (6, 10) | 3 (70 %) (18) | τραυματισμός (7, 32) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) ψυχρή στρωμάτωση (1, 18) καμία ειδική αγωγή (6, 10, 14) | PRE & POST (6, 10, 28, 31) | A | |
| <i>Bromus tectorum</i> (Βρώμος ο στεγοφυής) | A αγροί, παρυφές δρόμων, αρόσιμες εκτάσεις (16) | 0,45 — 2,28 (14, 29) | L = D (14) | 3 (29) | | περίοδος ωρίμανσης (1, 7, 32) αναστολή εκβλάστησης λόγω φωτός (1) καμία ειδική αγωγή (14) | PRE & POST (28, 31) | A | |
| <i>Cynosurus cristatus</i> (Κυνόσουρα η λοφωτή) | P αγροί, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαίτηματα (16, 19) | 0,5 — 0,7 (14, 19, 29) | L = D (14) | 0 (29) | 3 (50 %) (19) | η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (19) καμία ειδική αγωγή (14, 29) | POST (5) | A | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαίτημα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Digitaria sanguinalis</i> (Αιματόχορτο) | A αγροί, χλοοτάπητες, ανοικτά ενδιαίτηματα (16) | 0,52 — 0,6 (14, 30) | L = D (14) | 10-20 (21) | 7 (75 %) 14 (94 %) (7) | τραυματισμός, ψυχρή στρωμάτωση και ωρίμανση (1, 7, 14, 32) αγωγή με 101 mg/l KNO ₃ (14) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) καμία ειδική αγωγή (21) | PRE & POST (18, 25, 31) | A | |
| <i>Echinochloa crusgalli</i> (Μουχρίτσα) | A (16) | 1,5 (14) | L = D (14) L > D (3) | 10 — 20 (7, 21) | | τραυματισμός (7, 32) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) καμία ειδική αγωγή (3, 14, 21) | PRE & POST (3, 21, 28, 31) | A | |
| <i>Elymus canadensis</i> (Έλυμος ή άγρια σικάλη του Καναδά) | P παραποτάμιες περιοχές, διαταραγμένες περιοχές (16) | 4-5 (14, 30) | L = D (11) | 1 (11) | 14 — 28 (11) | καμία ειδική αγωγή (2, 11) | POST (2) | Γ, Δ, Ε | |
| <i>Festuca pratensis</i> (Φεστούκα η λειμώνιος) | P αγροί, υγρές περιοχές (16, 19) | 1,53 — 2,2 (16, 19) | L = D (14) L > D (10) | 20 (10) | 9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19) | καμία ειδική αγωγή (10, 19) | POST (10) | A | 7 |
| <i>Hordeum pusillum</i> (Κριθάρι νάνος) | A βοσκότοποι, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαίτηματα (16) | 3,28 (14) | | | | θερμή στρωμάτωση (1) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) | PRE (31) | | 7 |
| <i>Phleum pratense</i> (Φλέως ο λειμώνιος) | P βοσκότοποι, αρόσιμες εκτάσεις, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,45 (14, 19) | L > D (10, 14) | 0-10 (10, 19) | 2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (17) καμία ειδική αγωγή (10, 14, 17, 19) | POST (10) | A, E | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής ⁽¹⁾ και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ⁽²⁾ | Βάθος φύτευσης (mm) ⁽³⁾ | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ⁽⁴⁾ | Ειδικές αγωγές ⁽⁵⁾ | Δοκιμή τοξικότητας ⁽⁶⁾ | Προμηθευτές σπόρων ⁽⁷⁾ | Άλλες παραπομπές ⁽⁸⁾ |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| POLYGONACEAE <i>Polygonum connoivulus</i> (Αναρριχώμενο πολύγωνο) | A ανοικτά ενδιαιτήματα, παρυφές δρόμων (16) | 5 — 8 (4, 14, 29) | L = D (20) | 0-2 (4, 29) | | ψυχρή στρωμάτωση για 4 — 8 εβδομάδες (1, 2, 4, 20, 29) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) | PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31 | A | 32 |
| <i>Polygonum lapathifolium</i> (Λαπάτσα) | A υγρά εδάφη (16) | 1,8 — 2,5 (14) | L > D (6) | | 5 (94 %) (18) | η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (1) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18) ψυχρή στρωμάτωση (1) καμία ειδική αγωγή (5) | PRE & POST (6) | A, E | |
| <i>Polygonum pennsylvanicum</i> (Πολύγωνο της Πενσυλβανίας) | A αγροί, ανοικτά ενδιαιτήματα (16) | 3,6 — 7 (14, 29) | | 2 (29) | | ψυχρή στρωμάτωση για 4 εβδομάδες σε 0 — 5 °C (1, 29) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1) | PRE (31) | A, E | |
| <i>Polygonum periscaria</i> (Αγριοπιπεριά) | A διαταραγμένες περιοχές, αρόσιμες εκτάσεις (16, 19) | 2,1 — 2,3 (14, 19) | L > D (13) | 0 (19) | < 14 (13) 2 (50 %) (19) | τραυματισμός, ψυχρή στρωμάτωση, αγωγή με GA (14) ψυχρή στρωμάτωση, ωρίμανση (17-19) αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (19) καμία ειδική αγωγή (13) | POST (13) | A | 32 |
| <i>Rumex crispus</i> (Λάπαθο) | P αρόσιμες εκτάσεις, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19) | 1,3 — 1,5 (4, 14, 19) | L = D (14, 33) | 0 (4, 19, 33) | 3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) η ωρίμανση μπορεί να κρινεταί απαραίτητη (18) καμία ειδική αγωγή (4, 14, 33) | POST (4, 33) | A, E | 32 |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής (1) και ενδιαιτήματα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη (2) | Βάθος φύτευσης (mm) (3) | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) (4) | Ειδικές αγωγές (5) | Δοκιμή τοξικότητας (6) | Προμηθευτές σπόρων (7) | Άλλες παραπομπές (8) |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Αναγαλλίς η αρουραία) | A αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαιτήματα, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,4 — 1,5 (4, 14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %) (19) | ψυχρή στρωμάτωση, αγωγή με GA (1, 14, 18, 19, 32) απαιτείται φως για την εκβλάστηση (1) καμία ειδική αγωγή (2, 4) | POST (2,4) | A, ΣΤ | |
| RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Βατράχιο το κοινό) | P αρόσιμες εκτάσεις, παρυφές δρόμων, ανοικτά ενδιαιτήματα (16, 19) | 1,5 — 8 (14, 19, 29) | L = D (14) | 1 (29) | 41-56 (19, 29) | καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 24 -26) | POST (5, 22, 24-26) | | 32 |
| ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Γέο το αστικό) | P θαμνοστοιχίες, υγρές περιοχές (16, 19) | 0,8 — 1,5 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) θερμή στρωμάτωση (1) καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 25, 26) | POST (5, 22, 25, 26) | A | |
| RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Γάλιο ή κολλητσιδα) | A αρόσιμες εκτάσεις, υγρές περιοχές, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 7-9 (14, 19) | L = D (14) | | 5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18) | ψυχρή στρωμάτωση (1, 18, 19) η εκβλάστηση δεν επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (18, 19) αναστολή εκβλάστησης λόγω φωτός (1) καμία ειδική αγωγή (6, 14) | PRE & POST (6, 28) | A | 32 |
| <i>Galium mollugo</i> (Γάλιο το μόλλουγο) | P θαμνοστοιχίες, ανοικτές περιοχές (8) | 7 (29) | L = D (14) | 2 (29) | | καμία ειδική αγωγή (5, 14, 22, 24, 26, 29) | POST (5, 22, 24, 26) | A | |
| SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Διγίταλις η Πορφυρά) | B, P θαμνοστοιχίες, ανοικτές περιοχές (16, 19) | 0,1 — 0,6 (4, 14, 19) | L = D (14) | 0 (4, 19) | 6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (1, 17-19) καμία ειδική αγωγή (4, 22-26) | POST (4, 22 — 26) | Δ, Z, ΣΤ | |

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Βοτανική ονομασία του είδους (κοινή ονομασία στα ελληνικά) | Διάρκεια ζωής ⁽¹⁾ και ενδιαίτημα | Βάρος σπόρου (mg) | Φωτοπερίοδος για την εκβλάστηση ή την ανάπτυξη ⁽²⁾ | Βάθος φύτευσης (mm) ⁽³⁾ | Χρόνος εκβλάστησης (ημέρες) ⁽⁴⁾ | Ειδικές αγωγές ⁽⁵⁾ | Δοκιμή τοξικότητας ⁽⁶⁾ | Προμηθευτές σπόρων ⁽⁷⁾ | Άλλες παραπομπές ⁽⁸⁾ |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Veronica persica</i> (Βερόνικα η περσική) | A αρόσιμες εκτάσεις, ανοικτά ενδιαίτηματα, διαταραγμένες περιοχές (16, 19) | 0,5 — 0,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 3(19) 5 (96 %) (18) | αναστολή εκβλάστησης λόγω σκότους (18, 19) ψυχρή στρωμάτωση (18) καμία ειδική αγωγή (14) | PRE & POST (28) | A | 32 |

⁽¹⁾ A = Ετήσια, B = Διετή, P = Πολυετή.

⁽²⁾ Οι παραπομπές 11,14 και 33 αφορούν την αναλογία φωτός (L) και σκότους (D) που απαιτείται για την επαγωγή της εκβλάστησης των σπόρων. Οι παραπομπές 3, 6, 9, 10, 13 και 20 αφορούν τις συνθήκες ανάπτυξης στα θερμοκήπια.

⁽³⁾ Το 0 mm δηλώνει ότι οι σπόροι φυτεύονται στην επιφάνεια του εδάφους ή ότι απαιτείται φως για την εκβλάστηση των σπόρων.

⁽⁴⁾ Οι παρεχόμενοι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ημερών εκβλάστησης ενός ποσοστού σπόρων σύμφωνα με τη σχετική παραπομπή, π.χ. εκβλάστηση διάρκειας 3 ημερών (50 %) (παραπομπή 19).

⁽⁵⁾ Ο χρόνος ωρίμανσης και/ή στρωμάτωσης δεν είναι πάντα διαδέσιμος. Με εξαίρεση τις απαιτήσεις της επεξεργασίας εν ψυχρώ, οι συνθήκες θερμοκρασίας δεν προσδιορίζονται, αφού στις δοκιμές που διενεργούνται σε θερμοκήπια υπάρχει περιορισμένος έλεγχος της θερμοκρασίας. Οι περισσότεροι σπόροι βλασταίνουν σε συνθήκες συνήθους διακύμανσης της θερμοκρασίας που μετράται στα θερμοκήπια.

⁽⁶⁾ Δηλώνει ότι το συγκεκριμένο είδος χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμή φυτοτοξικότητας με ζιζανιοκτόνα η οποία διενεργήθηκε πριν από την ανάπτυξη (PRE) και/ή μετά την ανάπτυξη (POST).

⁽⁷⁾ Παρέχει παραδείγματα προμηθευτών εμπορικών σπόρων.

⁽⁸⁾ Παρέχει δύο εναλλακτικές παραπομπές που εξετάστηκαν.

Αναφερόμενοι προμηθευτές σπόρων

| Αναγνωριστικό προμηθευτή | Στοιχεία προμηθευτή |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Α | Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com |
| Β | Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 ΗΠΑ (727) 344 — 4050 www.tropilab.com |
| Γ | Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 ΚΑΝΑΔΑΣ (519) 586 — 3985 |
| Δ | Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 ΗΠΑ (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com |
| Ε | Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 ΗΠΑ (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com |
| ΣΤ | Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk |
| Ζ | Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 ΚΑΝΑΔΑΣ (800) 274 — 7333 www.thompson-morgan.com |

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. σ. 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. σ. 151-156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Προσωπική ανακοίνωση. (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., Pflieger, 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., Λονδίνο
- (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*. σ. 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. Προσωπική ανακοίνωση. (<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. Προσωπική ανακοίνωση.
 - (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.
-

Προσάρτημα 4

Παραδείγματα κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης για ορισμένα είδη καλλιεργειών

Οι ακόλουθες συνθήκες διαπιστώθηκε ότι είναι κατάλληλες για 10 είδη καλλιεργειών και μπορούν να χρησιμοποιούνται ως κατεύθυνση για τις δοκιμές σε θαλάμους ανάπτυξης μαζί με ορισμένα άλλα είδη:

Συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα: 350 ± 50 ppm·

Σχετική υγρασία: 70 ± 5 % κατά τις περιόδους φωτισμού και 90 ± 5 % κατά τις περιόδους σκότους·

Θερμοκρασία: 25 ± 3 °C κατά την ημέρα, 20 ± 3 °C κατά τη νύκτα·

Φωτοπερίοδος: 16 ώρες φως / 8 ώρες σκότους, με την παραδοχή μέσου μήκους κύματος 400 έως 700 nm·

Φως: φωτεινότητα 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, μετρούμενη στην κορυφή του φυλλώματος.

Τα είδη καλλιεργειών είναι τα εξής:

- τομάτα (*Solanum lycopersicon*)·
 - αγγούρι (*Cucumis sativus*)·
 - μαρούλι (*Lactuca sativa*)·
 - σόγια (*Glycine max*)·
 - λάχανο (*Brassica oleracea var. capitata*)·
 - καρότο (*Daucus carota*)·
 - βρώμη (*Avena sativa*)·
 - λόλιο το πολυετές (*Lolium perenne*)·
 - αραβόσιτος (*Zea mays*)·
 - κρεμμύδι (*Allium cepa*)·
-

Γ.32. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ENCHYTRAEIDAE

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 220 του ΟΟΣΑ (2004). Έχει σχεδιαστεί με σκοπό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στις αναπαραγωγικές επιδόσεις του λευκού σκώληκα, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, στο έδαφος. Η δοκιμή βασίζεται, κατά κύριο λόγο, σε μέθοδο που έχει αναπτυχθεί από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt) της Γερμανίας (1) και έχει υποβληθεί σε δοκιμή δακτυλίου (ring test) (2). Εξετάστηκαν και άλλες μέθοδοι για την εκτίμηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών στα Enchytraeidae και στους γαιοσκώληκες (3)(4)(5)(6)(7)(8).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

2. Οι ανελίδες που διαβιούν στο έδαφος και ανήκουν στο γένος *Enchytraeus* είναι οικολογικά σημαντικά είδη για τις δοκιμές οικοτοξικότητας. Αν και τα Enchytraeidae απαντούν συχνά σε εδάφη που περιέχουν γαιοσκώληκες, είναι εξίσου αληθές ότι συχνά αφθονούν σε πολλά εδάφη από τα οποία απουσιάζουν οι γαιοσκώληκες. Τα Enchytraeidae μπορούν να χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακές δοκιμές, καθώς και σε μελέτες σε συνθήκες προσομοίωσης αγρού και σε συνθήκες αγρού. Από πρακτική άποψη, πολλά είδη *Enchytraeus* είναι εύκολα στον χειρισμό και την εκτροφή, και ο χρόνος γενεάς είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο για τους γαιοσκώληκες. Για τον λόγο αυτό, η διάρκεια μιας δοκιμής αναπαραγωγής με Enchytraeidae είναι μόνο 4-6 εβδομάδες, ενώ για τους γαιοσκώληκες (*Eisenia fetida*) είναι 8 εβδομάδες.
3. Βασικές πληροφορίες σχετικά με την οικολογία και την οικοτοξικολογία των Enchytraeidae στο χερσαίο περιβάλλον περιλαμβάνονται στις παραπομπές (9)(10)(11)(12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Οι ενήλικοι σκώληκες Enchytraeidae εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμειχθεί σε τεχνητό έδαφος. Η δοκιμή μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια: α) σε περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμες επαρκείς πληροφορίες, μια δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, κατά την οποία η θνησιμότητα είναι το βασικό τελικό σημείο που εκτιμάται έπειτα από έκθεση δύο εβδομάδων, και β) μια οριστική δοκιμή αναπαραγωγής, κατά την οποία εκτιμώνται ο συνολικός αριθμός νεαρών σκωλήκων ανά γεννητόρα και η επιβίωση των γεννητόρων. Η οριστική δοκιμή διαρκεί έξι εβδομάδες. Μετά τις πρώτες τρεις εβδομάδες, οι ενήλικοι σκώληκες απομακρύνονται και καταγράφονται οι μορφολογικές μεταβολές. Μετά την πάροδο ακόμα τριών εβδομάδων, υπολογίζεται ο αριθμός απογόνων που έχουν εκκολαφθεί από τα κουκούλια τα οποία παρήγαγαν οι ενήλικοι σκώληκες. Οι αναπαραγωγικές επιδόσεις του(των) μάρτυρα (-ων), ώστε να προσδιοριστούν (i) η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και/ή (ii) η EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}) με τη βοήθεια ενός μοντέλου παλινδρόμησης για να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που θα προκαλούσε μείωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων κατά x %. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να περικλείουν την EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}), ώστε η EC_x να προκύπτει από παρεμβολή παρά από προεκβολή.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

5. Η υδατοδιαλυτότητα, ο $\log K_{ow}$, ο συντελεστής κατανομής εδάφους/νερού (π.χ. κεφάλαιο Γ.18 ή Γ.19 του παρόντος παραρτήματος) και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά. Θα ήταν επιθυμητό να υπάρχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως η ταχύτητα φωτόλυσης και η ταχύτητα υδρόλυσης.
6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για υδατοδιαλυτές ή μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα διαφέρει ανάλογα. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε πτητικές χημικές ουσίες, δηλ. σε χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού είναι μεγαλύτερα από τη μονάδα, ή σε χημικές ουσίες για τις οποίες η τάση ατμών υπερβαίνει τα 0,0133 Pa στους 25 °C.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη, εάν διαπιστώνεται κατόπιν ελέγχων ότι ικανοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια επιδόσεων:
 - η θνησιμότητα στον ενήλικο πληθυσμό δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών και μετά τις πρώτες τρεις εβδομάδες της δοκιμής αναπαραγωγής·
 - με την παραδοχή ότι χρησιμοποιήθηκαν 10 ενήλικοι σκώληκες ανά δοχείο κατά την έναρξη της δοκιμής, θα πρέπει να έχουν παραχθεί, κατά μέσο όρο, τουλάχιστον 25 νεαροί σκώληκες ανά δοχείο στο τέλος της δοκιμής·
 - ο συντελεστής μεταβολής που προσεγγίζει τον μέσο αριθμό νεαρών σκωλήκων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50 % στο τέλος της δοκιμής αναπαραγωγής.

Εάν η δοκιμή δεν ικανοποιεί τα ανωτέρω κριτήρια εγκυρότητας, θα πρέπει να τερματίζεται, εκτός εάν μπορεί να δικαιολογηθεί η συνέχισή της. Η αιτιολογία θα πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

8. Για να επαληθευτεί ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά με την πάροδο του χρόνου, η χημική ουσία αναφοράς θα πρέπει είτε να υποβάλλεται σε δοκιμή σε τακτά χρονικά διαστήματα είτε να περιλαμβάνεται σε κάθε δοκιμή. Κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς είναι η καρβενδαζίμη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την επιβίωση και την αναπαραγωγή των *Enchytraeidae* (13)(14)· θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιούνται άλλες χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχουν γνωστά τοξικολογικά δεδομένα. Σε δοκιμή δακτυλίου χρησιμοποιήθηκε σκεύασμα καρβενδαζίμης, γνωστό με την εμπορική ονομασία *Derosal*TM, το οποίο διατίθεται από την εταιρεία *Agrevo* (Φρανκφούρτη, Γερμανία) και περιέχει 360 g/l (32,18 %) δραστικής ουσίας (2). Η τιμή της EC_{50} για την αναπαραγωγή που προσδιορίστηκε στη δοκιμή δακτυλίου κυμάνθηκε μεταξύ $1,2 \pm 0,8$ mg δραστικού συστατικού ανά κιλό ξηρής μάζας (2). Εάν στη σειρά δοκιμών συμπεριλαμβάνεται μια θετική πρότυπη τοξική ουσία, χρησιμοποιείται μόνο μία συγκέντρωση και ο αριθμός επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ίδιος με τον αριθμό των μαρτύρων. Για την καρβενδαζίμη, συνιστάται η δοκιμή 1,2 mg δραστικού συστατικού ανά κιλό ξηρού βάρους (υποβλήθηκε στη δοκιμή με τη μορφή υγρού σκευάσματος).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

9. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Οι γυάλινοι κώδωνες (π.χ. με όγκο 0,20 - 0,25 λίτρα και διάμετρο ≈ 6 cm) είναι κατάλληλοι. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν διαφανή καλύμματα (π.χ. από γυαλί ή πολυαιθυλένιο), τα οποία να είναι σχεδιασμένα ώστε να μειώνουν την εξάτμιση του νερού, επιτρέποντας την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Τα καλύμματα θα πρέπει να είναι διαφανή, ώστε να επιτρέπουν τη μετάδοση του φωτός.
10. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:
- θάλαμος ξήρανσης·
 - στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·
 - πεχάμετρο και φωτόμετρο·
 - κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της υγρασίας (δεν είναι σημαντικός, εάν τα δοχεία έκθεσης έχουν καλύμματα)·
 - επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο με κλιματισμό·
 - λαβίδες, άγκιστρα ή βρόχοι·
 - λεκάνη εμφάνισης φωτογραφιών.

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

11. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος (5)(7) με την ακόλουθη σύνθεση (με βάση το ξηρό βάρος, που έχει ξηρανθεί μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C):
- 10 % τύρφη σφάγγων, αερόξηρη και λεπτοαλεσμένη (είναι αποδεκτό το μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm)· συνιστάται να ελέγχεται ότι το έδαφος που έχει παρασκευαστεί με πρόσφατη παρτίδα τύρφης είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια των σκωλήκων προτού χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή·
 - 20 % καολινιτική άργιλος (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %).

- περίπου 0,3 έως 1,0 % ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3 , κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας), για να επιτευχθεί $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$ η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστίθεται μπορεί να εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από την ποιότητα/φύση της τύρφης·
- περίπου 70 % αερόξηρη χαλαζιακή άμμος (ανάλογα με την απαιτούμενη ποσότητα CaCO_3), πρωτίστως λεπτή άμμος (το μέγεθος του 50 % και άνω των σωματιδίων θα πρέπει να είναι μεταξύ 50 και 200 μm).

Συνιστάται να αποδεικνύεται η καταλληλότητα του τεχνητού εδάφους για την καλλιέργεια των σκωλήκων και για την εκπλήρωση των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμής πριν από τη χρήση του εδάφους σε οριστική δοκιμή. Συνιστάται ιδίως ο έλεγχος αυτός να διασφαλίζει ότι οι επιδόσεις της δοκιμής δεν αλλοιώνονται σε περίπτωση που η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα μειώνεται, π.χ. με μείωση της περιεκτικότητας σε τύρφη στο 4-5 % και με αντίστοιχη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για τους σκωλήκες. Έχει αποδειχτεί ότι ο *Enchytraeus albidus* μπορεί να ικανοποιεί τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλεται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα απ' ό,τι προαναφέρεται (π.χ. 2,7 %) (15)· η –περιορισμένη– πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφη.

Σημείωση: Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος σε επιπλέον δοκιμές (π.χ. ανώτερης βαθμίδας), η καταλληλότητα του εδάφους και η ικανοποίηση των κριτηρίων εγκυρότητας της δοκιμής θα πρέπει επίσης να αποδεικνύονται.

12. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται πλήρως (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Αυτό θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της δοκιμής. Το αναμειγμένο έδαφος θα πρέπει να φυλάσσεται για δύο ημέρες, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διάλυμα 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) ή 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) σε αναλογία 1:5 [βλ. (16) και προσάρτημα 3]. Εάν η οξύτητα του εδάφους υπερβαίνει το απαιτούμενο εύρος τιμών (βλ. σημείο 11), μπορεί να προσαρμόζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας CaCO_3 . Εάν το έδαφος είναι υπερβολικά αλκαλικό, μπορεί να προσαρμόζεται με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του μείγματος που αναφέρεται στο σημείο 11, αλλά χωρίς CaCO_3 .
13. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διεργασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2. Μία ή δύο ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος προϋγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε υγρασία, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το προϋγραθέν έδαφος διαρείται σε δόσεις οι οποίες αντιστοιχούν στον αριθμό των συγκεκριμένων δοκιμής (και, κατά περίπτωση, των χημικών ουσιών αναφοράς) και των μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Η περιεκτικότητα σε υγρασία προσαρμόζεται στο 40-60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας με την προσθήκη του διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή με την προσθήκη απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού (βλ. σημεία 19-21). Η περιεκτικότητα σε υγρασία προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C) και θα πρέπει να κυμαίνεται εντός του βέλτιστου εύρους για την επιβίωση των σκωλήκων. Η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία μπορεί να εκτιμηθεί κατά προσέγγιση με την ήπια συμπίεση του εδάφους με το χέρι: εάν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι σωστή, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων.

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

14. Το συνιστώμενο για τη δοκιμή είδος είναι το *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (λευκός σκώληκας), μέλος της οικογένειας των Enchytraeidae (τάξη Ολιγόχαιτων, συνομοταξία Αννελιδών). Το είδος *E. albidus* είναι ένα από τα μεγαλύτερα είδη Enchytraeidae· έχουν καταγραφεί δείγματα μήκους έως 35 mm (17)(18). Το *E. albidus* εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και εντοπίζεται σε θαλάσσια, λιμναία και χερσαία ενδιαιτήματα, κυρίως σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη (φύκη, κομπόστ) και σπανίως σε λειμώνες (9). Η ευρεία οικολογική ανοχή του και ορισμένες μορφολογικές παραλλαγές μπορεί να αποτελούν ένδειξη ότι υπάρχουν διαφορετικές φυλές.
15. Το *E. albidus* διατίθεται στο εμπόριο ως ιχθυοτροφή. Θα πρέπει να ελέγχεται αν η καλλιέργεια είναι μολυσμένη από άλλα, συνήθως μικρότερα, είδη (1)(19). Σε περίπτωση μόλυνσης, όλοι οι σκώληκες θα πρέπει να εκπλύνονται με νερό σε τρυβλίο Petri. Στη συνέχεια, θα πρέπει να επιλέγονται μεγάλα δείγματα ενηλίκων *E. albidus* (με τη βοήθεια στερεοσκοπικού μικροσκοπίου) για την έναρξη νέας καλλιέργειας και όλοι οι άλλοι σκώληκες να απορρίπτονται. Το *E. albidus* μπορεί να αναπαράγεται εύκολα σε μεγάλο εύρος οργανικών υλών (βλ. προσάρτημα 4). Ο κύκλος ζωής του *E. albidus* είναι σύντομος, καθώς φθάνει σε ωρίμανση εντός διαστήματος από 33 ημέρες (στους 18 °C) έως 74 ημέρες (στους 12 °C) (1). Για τη δοκιμή θα χρησιμοποιούνται μόνο καλλιέργειες που έχουν παραμείνει στο εργαστήριο για τουλάχιστον 5 εβδομάδες (μία γενιά), χωρίς να έχουν παρουσιαστεί προβλήματα.

16. Κατάλληλα είναι και άλλα είδη του γένους *Enchytraeus*, όπως το *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 ή το *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (βλ. προσάρτημα 5). Εάν χρησιμοποιούνται άλλα είδη *Enchytraeus*, πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς και να αιτιολογείται το σκεπτικό της επιλογής τους.
17. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι ενήλικοι σκώληκες. Θα πρέπει να έχουν αυγά (με κηλίδες) στον δακτυλιοειδή ωοφόρο σάκο και να έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος (μήκος περίπου 1 cm). Ο συγχρονισμός της καλλιέργειας αναπαραγωγής δεν είναι απαραίτητος.
18. Εάν τα Enchytraeidae δεν αναπαράγονται στον ίδιο τύπο εδάφους και υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την τελική δοκιμή (συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών σίτισης), πρέπει να εγκλιματίζονται για τουλάχιστον 24 ώρες και έως τρεις ημέρες. Αρχικά, θα πρέπει να εγκλιματίζεται μεγαλύτερος αριθμός ενήλικων σκωλήκων από εκείνον που απαιτείται για την εκτέλεση της δοκιμής, ώστε να υπάρχει το περιθώριο απόρριψης των δειγμάτων που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν καταστεί ακατάλληλα με άλλον τρόπο. Στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού, επιλέγονται για τη δοκιμή μόνο οι σκώληκες που περιέχουν αυγά και δεν εμφανίζουν ανωμαλίες στη συμπεριφορά τους (π.χ. επιχειρούν να αποδράσουν από το έδαφος). Οι σκώληκες απομακρύνονται προσεκτικά με τη χρήση λαβίδων εργαστηρίου, αγκίστρων ή βρόχων και τοποθετούνται σε τρυβλίο Petri που περιέχει μικρή ποσότητα γλυκού νερού. Για τον συγκεκριμένο σκοπό προτιμάται ανασυσταθέν γλυκό νερό, όπως προτείνεται στο κεφάλαιο Γ.20 του παρόντος παραρτήματος (Δοκιμασία αναπαραγωγής *Daphnia magna*), αφού το απιονισμένο νερό, το απομεταλλοποιημένο νερό ή το νερό βρύσης θα μπορούσε να είναι επιβλαβές για τους σκώληκες. Οι σκώληκες επιθεωρούνται στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο και απομακρύνονται όσοι δεν περιέχουν αυγά. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να απομακρύνονται και να απορρίπτονται τυχόν ακάρεα ή κολλέμβολα που ενδέχεται να έχουν μολύνει τις καλλιέργειες. Οι υγιείς σκώληκες που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή επιστρέφουν στη μητρική καλλιέργεια.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

Υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό σε ποσότητα επαρκή για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκέντρωσης δοκιμής. Συνιστάται να χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα νερού ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (βλ. σημείο 13). Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμειγνύεται πλήρως με μία παρτίδα του προϋγραθέντος εδάφους πριν από την εισαγωγή του στο δοχείο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

20. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλύεται στον μικρότερο δυνατό όγκο κατάλληλου φορέα (π.χ. ακετόνης). Μόνο πτητικοί διαλύτες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Ο φορέας ψεκάζεται ή αναμειγνύεται με μικρή ποσότητα, π.χ. 2,5 g, λεπτής χαλαζιακής άμμου. Ο φορέας απομακρύνεται με εξάτμιση κάτω από απαγωγό επί τουλάχιστον μία ώρα. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα εισάγεται στα δοχεία δοκιμής.
21. Εάν πρόκειται για χημικές ουσίες που είναι δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, αναμειγνύεται το ισοδύναμο 2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και παρασκευάζεται επίσης κατάλληλος μάρτυρας.
22. Κατά κανόνα, οι χημικές ουσίες δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμές σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 1 000 mg/kg ξηρής μάζας εδάφους. Ωστόσο, οι δοκιμές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να απαιτούνται ανάλογα με τους στόχους της εκάστοτε δοκιμής.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Ομάδες δοκιμής και ελέγχου

23. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, εισάγεται στο δοχείο δοκιμής ποσότητα του εδάφους δοκιμής η οποία αντιστοιχεί σε 20 g ξηρού βάρους (βλ. σημεία 19-21). Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες, χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε κάθε δοχείο δοκιμής τοποθετείται τροφή σύμφωνα με τις διεργασίες που περιγράφονται στο σημείο 29. Δέκα

σκώληκες κατανέμονται τυχαία σε κάθε δοχείο δοκιμής. Οι σκώληκες μεταφέρονται προσεκτικά σε κάθε δοχείο δοκιμής και τοποθετούνται στην επιφάνεια του εδάφους με τη χρήση, π.χ., λαβίδων εργαστηρίου, αγκίστρων ή βρόχων. Ο αριθμός επαναλήψεων για τις συγκεντρώσεις δοκιμής και για τους μάρτυρες εξαρτάται από τον σχεδιασμό της δοκιμής που εκτελείται (βλ. σημείο 34). Τα δοχεία δοκιμής τοποθετούνται τυχαία στον επωαστήρα δοκιμής, και αυτές οι θέσεις αλλάζουν τυχαία σε εβδομαδιαία βάση.

24. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή, εκτός από τη σειρά με την υπό δοκιμή ουσία, και μία σειρά μαρτύρων που περιέχουν χαλαζιακή άμμο ψεκασμένη ή αναμειγμένη με διαλύτη. Η συγκέντρωση του διαλύτη ή του μέσου διασποράς πρέπει να είναι η ίδια με εκείνη που χρησιμοποιείται στα δοχεία δοκιμής που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία. Σε δοκιμή θα πρέπει επίσης να υποβάλλεται μια σειρά μαρτύρων που περιέχουν επιπλέον χαλαζιακή άμμο (2,5 g ανά δοχείο) για τις ουσίες που απαιτούν χορήγηση σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο σημείο 21.

Συνθήκες δοκιμής

25. Η θερμοκρασία δοκιμής είναι 20 ± 2 °C. Για να αποτρέπεται η διαφυγή σκωλήκων από το έδαφος, η δοκιμή διενεργείται σε ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκότους (κατά προτίμηση, 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκότους) με φωτισμό έντασης 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.
26. Για τον έλεγχο της υγρασίας τους εδάφους, τα δοχεία ζυγίζονται στην αρχή της δοκιμής και, στη συνέχεια, μία φορά την εβδομάδα. Η απώλεια βάρους αποκαθίσταται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απώλεια νερού μπορεί να μειωθεί με τη διατήρηση υψηλής υγρασίας του αέρα (> 80 %) στον επωαστήρα δοκιμής.
27. Η περιεκτικότητα σε υγρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται στην αρχή και στο τέλος τόσο της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών όσο και της οριστικής δοκιμής. Οι μετρήσεις θα πρέπει να διενεργούνται τόσο σε δείγματα εδάφους που έχουν υποβληθεί σε αγωγή (όλες οι συγκεντρώσεις) όσο και σε δείγματα εδάφους ελέγχου, τα οποία έχουν παρασκευαστεί και φυλάσσονται με τον ίδιο τρόπο όπως οι καλλιέργειες δοκιμής, αλλά δεν περιέχουν σκώληκες. Η τροφή θα πρέπει να προστίθεται μόνο σε αυτά τα δείγματα εδάφους στην αρχή της δοκιμής, ώστε να διευκολύνεται η μικροβιακή δραστηριότητα. Η ποσότητα προστιθέμενης τροφής θα πρέπει να είναι ίδια με εκείνη που προστίθεται στις καλλιέργειες δοκιμής. Δεν είναι αναγκαίο να προστίθεται επιπλέον τροφή σε αυτά τα δοχεία κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Σίτιση

28. Μπορεί να χρησιμοποιείται τροφή ικανή να διατηρεί τον πληθυσμό των Enchytraeidae. Έχει διαπιστωθεί ότι οι νιφάδες βρώμης –κατά προτίμηση, θερμασμένες σε αυτόκαυστο πριν από τη χρήση, ώστε να προλαμβάνεται η μικροβιακή επιμόλυνση (ενδείκνυται επίσης η θέρμανση)– αποτελούν κατάλληλο υλικό σίτισης.
29. Αρχικά, η τροφή χορηγείται με την ανάμιξη 50 mg αλεσμένων νιφάδων βρώμης με το έδαφος σε κάθε δοχείο πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων. Στη συνέχεια, η τροφή χορηγείται σε εβδομαδιαία βάση έως την 21η ημέρα. Η σίτιση δεν πραγματοποιείται την 28η ημέρα, αφού οι ενήλικοι σκώληκες έχουν απομακρυνθεί σε αυτό το στάδιο και οι νεαροί σκώληκες χρειάζονται σχετικά μικρή ποσότητα επιπλέον τροφής από το στάδιο αυτό και μετά. Η σίτιση κατά τη διάρκεια της δοκιμής περιλαμβάνει 25 mg αλεσμένων νιφάδων βρώμης ανά δοχείο, που τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια του εδάφους, ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση βλάβης στους σκώληκες. Για να μειωθεί η ανάπτυξη μυκήτων, οι νιφάδες βρώμης θα πρέπει να θάβονται στο έδαφος, δηλ. να καλύπτονται με μικρές ποσότητες εδάφους. Εάν παραμένουν υπολείμματα τροφής, θα πρέπει να μειώνεται το σιτηρέσιο.

Σχεδιασμός της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών

30. Όταν κρίνεται αναγκαίο, διενεργείται η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, π.χ. με πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας των 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg (ξερό βάρος εδάφους). Μία επανάληψη για κάθε αγωγή και μάρτυρα είναι αρκετή.
31. Η δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών διαρκεί δύο εβδομάδες. Στο τέλος της δοκιμής, αξιολογείται η θνησιμότητα των σκωλήκων. Ένας σκώληκας θεωρείται νεκρός, εάν δεν αντιδρά σε μηχανικό ερέθισμα στο πρόσθιο άκρο. Επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τη θνησιμότητα μπορεί να είναι χρήσιμες και για να καθοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές στη συμπεριφορά των ενηλίκων (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάψουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. η ύπαρξη ανοικτών πληγών) θα πρέπει επίσης να καταγράφονται, παράλληλα με την παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η παρουσία αυτή μπορεί να προσδιορίζεται με την εφαρμογή της μεθόδου χρωματισμού που περιγράφεται στο προσάρτημα 6.

32. Η LC_{50} μπορεί να προσδιοριστεί κατά προσέγγιση με τον υπολογισμό του γεωμετρικού μέσου των δεδομένων θνησιμότητας. Κατά τον προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων για την οριστική δοκιμή, λαμβάνεται η παραδοχή ότι οι επιδράσεις στην αναπαραγωγή είναι χαμηλότερες από την LC_{50} κατά έναν παράγοντα έως 10. Ωστόσο, πρόκειται για εμπειρική συσχέτιση, η οποία σε οποιαδήποτε συγκεκριμένη περίπτωση ενδέχεται να είναι διαφορετική. Οι επιπλέον παρατηρήσεις που διατυπώνονται στο πλαίσιο της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών, όπως η παρουσία νεαρών σκωλήκων, μπορεί να συμβάλουν στον λεπτομερέστερο προσδιορισμό του εύρους συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που θα χρησιμοποιηθούν στην οριστική δοκιμή.
33. Για τον ακριβή προσδιορισμό της LC_{50} , συνιστάται να εκτελείται η δοκιμή με τη χρήση τουλάχιστον τεσσάρων επαναλήψεων ανά συκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και επαρκούς αριθμού συγκεντρώσεων, ώστε να προκαλούνται τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές στατιστικές σημαντικές μέσες αποκρίσεις σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Κατά περίπτωση, χρησιμοποιείται ανάλογος αριθμός συγκεντρώσεων και επαναλήψεων για τους μάρτυρες.

Σχεδιασμός της οριστικής δοκιμής αναπαραγωγής

34. Προτείνονται τρεις σχεδιασμοί με βάση τις συστάσεις που προκύπτουν από μια δοκιμή δακτυλίου (2):
- Για τον προσδιορισμό της NOEC, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική πρόοδο. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατά έναν παράγοντα που να μην υπερβαίνει το 1,8.
 - Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}), θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να περικλείουν την EC_x , ώστε η EC_x να προκύπτει από παρεμβολή παρά από προεκβολή. Συνιστώνται τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συκέντρωση δοκιμής και τέσσερις επαναλήψεις ελέγχου. Ο παράγοντας διαστήματος μπορεί να ποικίλλει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο εύρος των αναμενόμενων επιδράσεων, και άνω του 1,8 στις υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις.
 - Η συνδυασμένη προσέγγιση καθιστά εφικτό τον προσδιορισμό τόσο της NOEC όσο και της EC_x . Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική πρόοδο. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατά έναν παράγοντα που να μην υπερβαίνει το 1,8.
35. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δέκα ενήλικοι σκώληκες ανά δοχείο δοκιμής (βλ. σημείο 23). Στα δοχεία δοκιμής προστίθεται τροφή στην αρχή της δοκιμής και, στη συνέχεια, μία φορά την εβδομάδα (βλ. σημείο 29) έως και την 21η ημέρα. Την 21η ημέρα τα δείγματα εδάφους αναμοχλεύονται προσεκτικά με το χέρι, οι ζώντες ενήλικοι σκώληκες εξετάζονται και μετρώνται, και καταγράφονται οι μεταβολές στη συμπεριφορά τους (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάπτουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. ανοικτές πληγές). Στη συνέχεια, όλοι οι ενήλικοι σκώληκες απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής και το έδαφος δοκιμής. Το έδαφος δοκιμής που περιέχει τυχόν κουκούλια τα οποία είχαν παραχθεί εκκολάπτεται για τρεις επιπλέον εβδομάδες υπό τις ίδιες συνθήκες δοκιμής, με τη διαφορά ότι η σίτιση πραγματοποιείται μόνο κατά την 35η ημέρα (δηλ. 25 mg αλεσμένες νιφάδες βρώμης ανά δοχείο).
36. Έπειτα από έξι εβδομάδες, γίνεται η μέτρηση των νεοεκκολαφθέντων σκωλήκων. Συνιστάται η μέθοδος χρωματισμού με κόκκινο της Βεγγάλης (βλ. προσάρτημα 6), αν και έχουν αποδειχθεί κατάλληλες και άλλες τεχνικές υγρής (αλλά όχι θερμής) εκχύλισης και επίπλευσης (βλ. προσάρτημα 6) (4)(10)(11)(20). Η μέθοδος χρωματισμού με κόκκινο της Βεγγάλης συνιστάται επειδή η υγρή εκχύλιση από το έδαφος μπορεί να παρεμποδίζεται από τη θολερότητα που οφείλεται στα αιωρούμενα σωματίδια αργίλου.

Οριακή δοκιμή

37. Εάν δεν παρατηρούνται επιδράσεις στην υψηλότερη συκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών (δηλ. 1 000 mg/kg), η δοκιμή αναπαραγωγής μπορεί να διενεργείται ως οριακή δοκιμή με τη χρήση 1 000 mg/kg, ώστε να αποδεικνύεται ότι η NOEC για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από τη συγκεκριμένη τιμή.

Περίληψη και χρονοδιάγραμμα της δοκιμής

38. Τα βήματα της δοκιμής συνοψίζονται ως εξής:

| Χρόνος | Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών | Οριστική δοκιμή |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ημέρα -7 ή προγενέστερη | — Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη ξηρών συστατικών) | — Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη ξηρών συστατικών) |
| Ημέρα -5 | — Έλεγχος του pH του τεχνητού εδάφους — Μέτρηση της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους | — Έλεγχος του pH του τεχνητού εδάφους — Μέτρηση της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους |
| Ημέρα -5 έως -3 | — Διαλογή σκωλήκων για εγκλιματισμό | — Διαλογή σκωλήκων για εγκλιματισμό |
| Ημέρα — 3 έως 0 | — Εγκλιματισμός σκωλήκων για τουλάχιστον 24 ώρες | — Εγκλιματισμός σκωλήκων για τουλάχιστον 24 ώρες |
| Ημέρα -1 | — Προύγρانشη του τεχνητού εδάφους και κατανομή σε παρτίδες | — Προύγρانشη του τεχνητού εδάφους και κατανομή σε παρτίδες |
| Ημέρα 0 | — Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης — Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας — Ζύγιση του υποστρώματος δοκιμής στα δοχεία δοκιμής — Ανάμειξη στην τροφή — Εισαγωγή των σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία | — Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης — Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας — Ζύγιση του υποστρώματος δοκιμής στα δοχεία δοκιμής — Ανάμειξη στην τροφή — Εισαγωγή των σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία |
| Ημέρα 7 | — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία | — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση |
| Ημέρα 14 | — Προσδιορισμός της θνησιμότητας στον ενήλικο πληθυσμό — Εκτίμηση του αριθμού των νεαρών σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία | — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση |
| Ημέρα 21 | | — Παρατήρηση της συμπεριφοράς των ενηλίκων — Απομάκρυνση των ενηλίκων — Προσδιορισμός της θνησιμότητας στον ενήλικο πληθυσμό — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση |
| Ημέρα 28 | | — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Διακοπή σίτισης |

| Χρόνος | Δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών | Οριστική δοκιμή |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ημέρα 35 | | — Έλεγχος της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία — Σίτιση |
| Ημέρα 42 | | — Μέτρηση των νεαρών σκωλήκων — Μέτρηση του pH του εδάφους και της περιεκτικότητας σε υγρασία |

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

39. Επισκόπηση των αποτελεσμάτων παρέχεται στο προσάρτημα 7. Ωστόσο, στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν δίνεται καμία οριστική στατιστική κατεύθυνση όσον αφορά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμής.
40. Στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, το βασικό τελικό σημείο είναι η θνησιμότητα. Ωστόσο, οι μεταβολές στη συμπεριφορά των ενήλικων σκωλήκων (π.χ. εάν δεν είναι σε θέση να σκάπτουν το έδαφος ή εάν μένουν ακίνητοι στο γυάλινο τοίχωμα του δοχείου δοκιμής) και στη μορφολογία τους (π.χ. η ύπαρξη ανοικτών πληγών) θα πρέπει επίσης να καταγράφονται, παράλληλα με την παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η ανάλυση Probit (21) ή η λογιστική παλινδρόμηση θα πρέπει, κατά κανόνα, να εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της LC_{50} . Ωστόσο, σε περιπτώσεις που η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης είναι ακατάλληλη (π.χ. εάν είναι διαθέσιμες λιγότερες από τρεις συγκεντρώσεις με μερική θνησιμότητα), μπορούν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι. Αυτές οι μέθοδοι θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν κινητούς μέσους όρους (22), την απλοποιημένη μέθοδο Spearman-Kärber (23) ή την απλή παρεμβολή (π.χ. γεωμετρικός μέσος της LC_0 και της LC_{100} , όπως υπολογίζεται με την τετραγωνική ρίζα της LC_0 πολλαπλασιαζόμενη με την LC_{100}).
41. Στην οριστική δοκιμή, το τελικό σημείο είναι η γονιμότητα (δηλ. ο αριθμός των νεαρών σκωλήκων που παράγονται). Ωστόσο, όπως και στη δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, όλα τα άλλα σημεία νοσηρότητας θα πρέπει να καταγράφονται στην τελική έκθεση. Η στατιστική ανάλυση απαιτεί να υπολογίζονται η αριθμητική μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα για την αναπαραγωγή.
42. Εάν έχει διενεργηθεί ανάλυση διασποράς, η τυπική απόκλιση, s , και οι βαθμοί ελευθερίας, df , μπορούν να αντικατασταθούν από τη συνολική εκτίμηση της διασποράς που λαμβάνεται από την ANOVA και από τους βαθμούς ελευθερίας της, αντίστοιχα — με τον όρο ότι η διασπορά δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Σ' αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται οι χωριστές διασπορές των μαρτύρων και των δειγμάτων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή. Κατά κανόνα, οι τιμές αυτές υπολογίζονται με τη βοήθεια εμπορικού λογισμικού στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιεί τα ανά δοχείο αποτελέσματα ως επαναλήψεις. Εάν η συνένωση δεδομένων για τον αρνητικό μάρτυρα και τον μάρτυρα με τον διαλύτη εμφανίζεται καταλληλότερη από τη διενέργεια των δοκιμών σε σύγκριση με έναν από αυτούς τους μάρτυρες, θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή για να διαπιστώνεται ότι δεν διαφέρουν σημαντικά (για κατάλληλες δοκιμές, βλ. σημείο 45 και προσάρτημα 7).
43. Η διεξαγωγή περαιτέρω στατιστικών δοκιμών και συναγωγών εξαρτάται από το κατά πόσον οι επαναληπτικές τιμές κατανέμονται κανονικά και παρουσιάζουν ομοιογένεια ως προς τη διασπορά τους.

Εκτίμηση NOEC

44. Θα πρέπει να προτιμάται η εφαρμογή ισχυρών δοκιμών. Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η κατανομή των δεδομένων είναι κανονική, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στοιχεία, π.χ., από προηγούμενες εμπειρίες με δοκιμές δακτυλίου ή άλλα ιστορικά δεδομένα. Η ομοιογένεια ως προς τη διασπορά (ομοσκεδαστικότητα) είναι κρίσιμότερο στοιχείο. Έχει διαπιστωθεί εμπειρικά ότι η διασπορά συχνά αυξάνεται όταν αυξάνεται ο μέσος όρος. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, ο μετασχηματισμός των δεδομένων θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ομοσκεδαστικότητα. Ωστόσο, αυτός ο μετασχηματισμός θα πρέπει να βασίζεται στην πείρα με ιστορικά δεδομένα παρά με τα υπό εξέταση δεδομένα. Εάν υπάρχουν ομοιογενή δεδομένα, θα πρέπει να διενεργούνται πολλές δοκιμασίες t , όπως η δοκιμασία Williams ($\alpha = 0,05$, μονόπλευρη δοκιμή) (24)(25) ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, η δοκιμασία Dunnett (26)(27). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση άνισης αναπαραγωγής, οι τιμές t του πίνακα πρέπει να διορθώνονται όπως υποδεικνύεται

από τους Dunnett και Williams. Μερικές φορές, λόγω μεγάλης μεταβολής, οι αποκρίσεις δεν αυξάνονται/μειώνονται με κανονικούς ρυθμούς. Σ' αυτή την περίπτωση αισθητής απόκλισης από την μονοτονικότητα, η δοκιμασία Dunnett είναι καταλληλότερη. Εάν παρατηρούνται αποκλίσεις από την ομοσκεδαστικότητα, μπορεί να είναι εύλογο να διερευνηθούν προσεκτικότερα πιθανές επιδράσεις στις διασπορές, ώστε να αποφασιστεί εάν οι δοκιμασίες t μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς να αλλοιωθεί σημαντικά η ισχύς τους (28). Εναλλακτικά, μια δοκιμασία U πολλαπλής σύγκρισης, π.χ. η δοκιμασία U Bonferroni κατά Holm (29), ή όταν αυτά τα δεδομένα παρουσιάζουν ετεροσκεδαστικότητα αλλά συμφωνούν, κατά τα άλλα, με μια υποκείμενη μονότονη σχέση δόσης-απόκρισης, μπορεί να εφαρμοστεί μια άλλη μη παραμετρική δοκιμασία [π.χ. Jonckheere-Terpstra (30) (31) ή Shirley (32) (33)], η οποία θα ήταν, κατά κανόνα, προτιμότερη από τις δοκιμασίες t άνισης διασποράς (βλ. επίσης το σχήμα στο προσάρτημα 7).

45. Εάν έχει διενεργηθεί οριακή δοκιμή και εάν πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών για τις παραμετρικές δοκιμασίες (κανονικότητα, ομοιογένεια), μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t του Student κατά ζεύγη ή, διαφορετικά, η δοκιμασία U των Mann-Whitney (29).

Εκτίμηση της EC_x

46. Για τον υπολογισμό οποιασδήποτε τιμής EC_x , οι μέσοι όροι για κάθε αγωγή χρησιμοποιούνται για την ανάλυση (γραμμικής ή μη γραμμικής) παλινδρόμησης, αφού έχει αποκτηθεί κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης. Όσον αφορά την ανάπτυξη των σκωλήκων ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να υπολογιστούν κατ' εκτίμηση με τη βοήθεια της κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης (35). Μεταξύ των κατάλληλων συναρτήσεων για τα δεδομένα που δέχονται μόνο δύο τιμές (θνησιμότητα/επιβίωση) και αριθμός παραγόμενων απογόνων είναι οι κανονικές σιγμοειδείς συναρτήσεις, οι λογιστικές συναρτήσεις ή οι συναρτήσεις Weibull, που περιέχουν δύο έως τέσσερις παραμέτρους, ορισμένες από τις οποίες μπορούν επίσης να μοντελοποιήσουν αποκρίσεις όρμησης. Εάν η συνάρτηση δόσης-απόκρισης προσαρμόστηκε μέσω ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης, θα πρέπει να βρεθούν ένας σημαντικός r^2 (συντελεστής προσδιορισμού) και/ή μια κλίση με την ανάλυση παλινδρόμησης πριν από την εκτίμηση της EC_x με την εισαγωγή μιας τιμής που αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα στην εξίσωση που λαμβάνεται με την ανάλυση παλινδρόμησης. Τα όρια εμπιστοσύνης 95 % υπολογίζονται σύμφωνα με τη μέθοδο Fieller [όπως αναφέρεται στον Finney (21)] ή άλλες σύγχρονες κατάλληλες μεθόδους.
47. Εναλλακτικά, η απόκριση μοντελοποιείται ως ποσοστό ή αναλογία της παραμέτρου του μοντέλου που ερμηνεύεται ως η μέση απόκριση του μάρτυρα. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η κανονική σιγμοειδής καμπύλη (λογιστική, Weibull) μπορεί συχνά να προσαρμόζεται άνετα στα αποτελέσματα με την εφαρμογή της μεθόδου παλινδρόμησης probit (21). Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η συνάρτηση στάθμισης πρέπει να προσαρμόζεται για τις μετρικές αποκρίσεις κατά Christensen (36). Ωστόσο, εάν έχει διαπιστωθεί όρμηση, η ανάλυση probit θα πρέπει να αντικαθίσταται από λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull τεσσάρων παραμέτρων, προσαρμοσμένη από μια μέθοδο μη γραμμικής παλινδρόμησης (36). Εάν μια κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης δεν μπορεί να προσαρμόζεται στα δεδομένα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι για την εκτίμηση της EC_x και των ορίων εμπιστοσύνης της, όπως η μέθοδος των κινήτων μέσων όρων κατά Thompson (22) και η απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Kärber (23).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- φυσικές ιδιότητες και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών)
- χημική ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με την ονοματολογία IUPAC, τον αριθμό CAS, την παρτίδα, τον συντακτικό τύπο και την καθαρότητα
- ημερομηνία λήξης του δείγματος.

Ζωικό είδος δοκιμής:

- ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής.

Συνθήκες δοκιμής:

- συστατικά και παρασκευή του τεχνητού εδάφους
- μέθοδος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας
- περιγραφή των συνθηκών δοκιμής, όπως θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε υγρασία, pH κ.λπ.
- πλήρης περιγραφή του σχεδιασμού και των διαδικασιών της δοκιμής.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

- θνησιμότητα των ενήλικων σκωλήκων έπειτα από δύο εβδομάδες, και αριθμός των νεαρών σκωλήκων στο τέλος της δοκιμής προσδιορισμού του εύρους τιμών·
- θνησιμότητα των ενήλικων σκωλήκων έπειτα από τρεις εβδομάδες και πλήρης καταγραφή των νεαρών σκωλήκων στο τέλος της οριστικής δοκιμής·
- τυχόν παρατηρούμενα φυσικά ή παθολογικά συμπτώματα και μεταβολές στη συμπεριφορά των οργανισμών δοκιμής·
- η LC₅₀, η NOEC και/ή η EC_x (π.χ. EC₅₀, EC₁₀) για την αναπαραγωγή, εάν ορισμένες από αυτές μπορούν να εφαρμοστούν εντός των διαστημάτων εμπιστοσύνης, καθώς και γράφημα του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό τους· όλες οι πληροφορίες και παρατηρήσεις που είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη δοκιμή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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 σελίδες.
- (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, Άμστερνταμ.
- (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 σελίδες.
- (5) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.
- (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, Γενεύη.
- (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, Γενεύη.
- (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, Στουτγάρδη, Νέα Υόρκη.
- (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, Γενεύη.

- (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 Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), σ. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, Λονδίνο.
- (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. Νέα Υόρκη.
- (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.

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Στην εν λόγω δοκιμή οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC₀ (μη θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την οποία δεν θανατώνεται κανένας από τους εκτιθέμενους οργανισμούς δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα εδάφους δοκιμής.

LC₅₀ (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 50 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₅₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC₁₀₀ (ολικά θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 100 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₁₀₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$). Στην παρούσα δοκιμή η LOEC εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής. Όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής άνω της LOEC θα πρέπει κανονικά να παρουσιάζουν επίδραση στατιστικώς διαφορετική από τον μάρτυρα. Τυχόν αποκλίσεις από τα παραπάνω για τον προσδιορισμό της LOEC πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση της δοκιμής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η μέγιστη αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Ρυθμός αναπαραγωγής: ο μέσος αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννιούνται ανά αριθμό ενήλικων κατά την περίοδο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός της μέγιστης υδατοχωρητικότητας

Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη. Περιγράφεται στο παράρτημα C του ISO DIS 11268-2.

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) από το υπόστρωμα του υπό δοκιμή εδάφους με τη χρήση κατάλληλης συσκευής (ελικοειδής σωλήνας κ.λπ). Το κάτω μέρος του σωλήνα καλύπτεται με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, αφού γεμίσει με νερό, τοποθετείται στη βάση δοκιμαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας προοδευτικά βυθίζεται έως ότου το επίπεδο του νερού καλύψει το πάνω μέρος του εδάφους. Θα πρέπει να μείνει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να απορροφηθεί όλο το νερό από τα τριχοειδή του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφηθεί να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε επιφάνεια πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε κλειστό δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Στη συνέχεια το δείγμα ζυγίζεται, ξηραίνεται σε σταθερή μάζα στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

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, Γενεύη.

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH ενός δείγματος εδάφους βασίζεται στην περιγραφή στο ISO 10390 (Ποιότητα εδάφους — προσδιορισμός του pH).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

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

Προσάρτημα 4

Συνθήκες καλλιέργειας του *enchytraeus* sp.

Οι σκώληκες του είδους *Enchytraeus albidus* (καθώς και άλλα είδη *Enchytraeus*) μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλα πλαστικά κουτιά (π.χ. 30 × 60 × 10 cm) γεμάτα με μείγμα 1:1 τεχνητού εδάφους και φυσικού, μη μολυσμένου χώματος κηπουρικής. Το υλικό κομποστοποίησης θα πρέπει να αποφεύγεται, δεδομένου ότι μπορεί να περιέχει τοξικές χημικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα. Πριν από τη χρήση θα πρέπει να αφαιρείται η πανίδα από το έδαφος (π.χ. με βადεία κατάψυξη). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα που θα περιέχει μόνο τεχνητό έδαφος, αλλά ο ρυθμός αναπαραγωγής μπορεί να είναι χαμηλότερος από ό,τι αν είχαμε μεικτό υπόστρωμα εδάφους. Το χρησιμοποιούμενο για την καλλιέργεια υπόστρωμα θα πρέπει να έχει pH 6,0 ± 0,5.

Η καλλιέργεια γίνεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 15 έως 20 °C ± 2 °C. Θερμοκρασίες υψηλότερες από 23 °C πρέπει να αποφεύγονται. Το έδαφος πρέπει να διατηρείται υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Όταν εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού όταν συμπιέζεται το έδαφος ήπια με το χέρι, τότε το έδαφος έχει τη σωστή περιεκτικότητα σε υγρασία. Οι ανοξικές συνθήκες θα πρέπει να αποφεύγονται με τον εξής τρόπο: τα καλύμματα των δοχείων της καλλιέργειας πρέπει να επιτρέπουν επαρκή ανταλλαγή αερίων μεταξύ δοχείων και ατμόσφαιρας. Για τη διευκόλυνση του αερισμού, το έδαφος πρέπει να θραύεται προσεκτικά κάθε εβδομάδα.

Οι σκώληκες μπορούν να τρέφονται με νιφάδες βρώμης. Οι νιφάδες βρώμης, οι οποίες θα πρέπει να φυλάσσονται σε σφραγισμένα δοχεία, να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο ή να θερμαίνονται πριν από τη χρήση, ώστε να αποφεύγονται μολύνσεις από ακάρεα σιτηρών (π.χ. *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) ή αρπακτικά ακάρεα [π.χ. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Μετά τη θερμική επεξεργασία, η τροφή αλέθεται ώστε να μπορεί εύκολα να διασκορπιστεί στην επιφάνεια του εδάφους. Από καιρό σε καιρό, οι νιφάδες μπορούν να συμπληρώνονται με βιταμίνες, γάλα και μουρουνέλαιο. Μια άλλη πιθανή πηγή τροφής είναι οι ζύμες αρτοποιίας και η τροφή ψαριών "TetraMin".

Η σίτιση γίνεται περίπου δύο φορές την εβδομάδα. Κατάλληλη ποσότητα νιφάδων βρώμης διασκορπίζεται στην επιφάνεια του εδάφους ή αναμειγνύεται προσεκτικά στο υπόστρωμα κατά τη θραύση του εδάφους για να διευκολυνθεί ο αερισμός. Η απόλυτη ποσότητα της τροφής που χορηγείται εξαρτάται από τον αριθμό των σκωλήκων που είναι παρόντες στο υπόστρωμα. Γενικά, η ποσότητα της τροφής πρέπει να αυξηθεί αν καταναλώνεται μέσα στην ημέρα την οποία χορηγείται. Αντιστρόφως, αν η τροφή παραμένει στην επιφάνεια τη στιγμή της δεύτερης σίτισης (μια εβδομάδα αργότερα), θα πρέπει να μειωθεί. Σε περίπτωση που έχουν αναπτυχθεί μύκητες στην τροφή, αυτή πρέπει να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί. Ύστερα από τρεις μήνες, οι σκώληκες πρέπει να μεταφερθούν σε προσφάτως παρασκευασμένο υπόστρωμα.

Οι συνθήκες καλλιέργειας κρίνονται ικανοποιητικές, αν οι σκώληκες: α) δεν προσπαθούν να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα, β) κινούνται γρήγορα μέσα στο έδαφος, γ) παρουσιάζουν στιλπνή εξωτερική επιφάνεια χωρίς προσκολλημένα σωματίδια του εδάφους, δ) έχουν περισσότερο ή λιγότερο υπόλευκο χρώμα, ε) εάν είναι ορατοί σκώληκες διαφόρων ηλικιών και στ) αναπαράγονται συνεχώς.

Προσάρτημα 5

Επιδοσεις δοκιμής με άλλα είδη *enchytraeus*

Επιλογή είδους

Άλλα είδη εκτός του *E. albidus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν, αλλά η διαδικασία της δοκιμής και τα κριτήρια εγκυρότητας πρέπει να προσαρμοστούν ανάλογα. Επειδή πολλά είδη *Enchytraeus* είναι ευχερώς διαθέσιμα και μπορούν να διατηρηθούν ικανοποιητικά στο εργαστήριο, το σημαντικότερο κριτήριο για την επιλογή είδους πλην του *E. albidus* είναι η οικολογική σημασία και, επιπροσθέτως, η συγκρίσιμη ευαισθησία. Ενδεχομένως να υπάρχουν και τυπικοί λόγοι για την αλλαγή είδους. Για παράδειγμα, σε χώρες όπου δεν εμφανίζεται το είδος *E. albidus* και δεν μπορεί να εισαχθεί (λόγω περιορισμών καραντίνας), θα χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί άλλο είδος *Enchytraeus*.

Παραδείγματα κατάλληλων εναλλακτικών ειδών

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Κατά τα τελευταία έτη, το είδος αυτό έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε οικοτοξικολογικές μελέτες, λόγω της απλής αναπαραγωγής και δοκιμής του. Ωστόσο, είναι μικρό και αυτό καθιστά ακόμη δυσκολότερο τον χειρισμό σε σύγκριση με το *E. albidus* (ιδίως σε στάδιο πριν από τη χρήση της μεθόδου χρώσης). Δεν έχει διαπιστωθεί με βεβαιότητα αν απαντά στο έδαφος, δεδομένου ότι έχει περιγραφεί μόνο η παρουσία του σε καλλιέργειες γαιοσκωλήκων. Επομένως, δεν είναι γνωστές οι οικολογικές απαιτήσεις του.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Η ονομασία αυτή καλύπτει προφανώς ομάδα πολύ συγγενικών ειδών που είναι δύσκολο να διακριθούν μορφολογικά. Δεν συνιστάται η χρήση τους για δοκιμές έως ότου οι μονάδες που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή να μπορέσουν να προσδιοριστούν κατά είδος. Ο σκώληκας *E. buchholzi* βρίσκεται συνήθως σε λειμώνες και πολυσύχναστα μέρη όπως ρείθρα δρόμων.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Το είδος αυτό ήταν αρχικά γνωστό ως *E. "minutus"*, αλλά πρόσφατα έγινε η περιγραφή του (1). Βρέθηκε πρώτα από τον U. Graefe (Αμβούργο) σε έναν λειμόνα κοντά στο St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Γερμανία). Ο σκώληκας *E. luxuriosus* έχει περίπου το μισό μέγεθος από τον *E. Albidus*, αλλά είναι μεγαλύτερος από άλλα είδη που εξετάζονται εδώ· αυτό θα μπορούσε να αποτελεί καλή εναλλακτική λύση για το *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Το είδος αυτό αναφέρεται έως σήμερα από γερμανικά και ισπανικά ανόργανα εδάφη, όπου είναι σύνθηδες αλλά δεν απαντά σε πληθώρα. Σε σύγκριση με άλλα μικρόσωμα είδη αυτού του γένους, είναι σχετικά εύκολο να ταυτοποιηθεί. Δεν είναι τίποτα γνωστό για τη συμπεριφορά του στις εργαστηριακές δοκιμές ή την ευαισθησία του σε χημικές ουσίες. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι καλλιεργείται εύκολα (*E. Belotti*, προσωπική ανακοίνωση).

Συνθήκες καλλιέργειας

Όλα τα είδη *Enchytraeus* που αναφέρονται παραπάνω μπορούν να καλλιεργηθούν στα ίδια υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον σκώληκα *E. albidus*. Το μικρότερο μέγεθος τους σημαίνει ότι τα δοχεία καλλιέργειας μπορεί να είναι μικρότερα και ότι, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια τροφή, το μέγεθος της πρέπει να προσαρμοστεί κατάλληλα. Ο κύκλος ζωής των ειδών αυτών είναι μικρότερος από αυτόν του *E. albidus* και πρέπει να τρέφονται συχνότερα.

Συνθήκες δοκιμής

Οι συνθήκες δοκιμής είναι γενικά οι ίδιες με αυτές που εφαρμόζονται στον *E. albidus*, εκτός από:

- το μέγεθος του δοχείου δοκιμής μπορεί (αλλά δεν είναι απαραίτητο) να είναι μικρότερο·
- η διάρκεια της δοκιμής αναπαραγωγής μπορεί (αλλά δεν είναι απαραίτητο) να είναι μικρότερη, δηλ. τέσσερις αντί για έξι εβδομάδες· ωστόσο, η διάρκεια της δοκιμασίας προσδιορισμού του εύρους δεν πρέπει να αλλάξει·
- λόγω του μικρού μεγέθους των νεαρών σκωλήκων, η χρήση της μεθόδου χρώσης συνιστάται ιδιαίτερα για την καταμέτρηση·
- το κριτήριο της εγκυρότητας σχετικά με τον "αριθμό νεαρών ατόμων ανά δοχείο δοκιμής στον μάρτυρα" πρέπει να αλλάξει σε "50".

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

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

Προσάρτημα 6

Λεπτομερής περιγραφή των τεχνικών εκχύλισης

Χρώση με ερυθρό της Βεγγάλης

Η εν λόγω μέθοδος, που στην πρώτη της μορφή αναπτύχθηκε στη λιμναία οικολογία (1), είχε αρχικά προταθεί για την καταμέτρηση των νεαρών enchytraeids στη δοκιμασία αναπαραγωγής των Enchytraeidae από τον W. de Coen (Πανεπιστήμιο της Γάνδης, Βέλγιο). Παράλληλα, μια τροποποιημένη έκδοση (το ερυθρό της Βεγγάλης αναμειχθηκε με φορμαλδεΰδη αντί για αιθανόλη) αναπτύχθηκε από τον RIVM Bilthoven (2)(3).

Στο τέλος της οριστικής δοκιμασίας (δηλ. ύστερα από έξι εβδομάδες), το έδαφος στα δοχεία της δοκιμής μεταφέρεται σε ένα ρηχό κιβώτιο. Χρήσιμα για τον σκοπό αυτό είναι ένα πλαστικό ποτήρι τύπου Bellaplast ή ένα δοχείο εμφάνισης φωτογραφικών φιλμ με αυλακωτό πυθμένα, το τελευταίο επειδή οι "αύλακες" περιορίζουν την κίνηση των σκωλήκων εντός του πεδίου παρατήρησης. Οι νεαροί σκώληκες ακινητοποιούνται με αιθανόλη (περίπου 5 ml ανά επανάληψη). Τα δοχεία στη συνέχεια γεμίζονται με νερό έως ένα στρώμα από 1 έως 2 cm. Προστίθενται λίγες σταγόνες (200 έως 300 µl) ερυθρού της Βεγγάλης (1 % διάλυμα σε αιθανόλη) (εναλλακτικά 0,5 % ηωσίνης) και τα δύο συστατικά αναμειγνύονται προσεκτικά. Ύστερα από 12 ώρες, οι σκώληκες θα πρέπει να έχουν χρωματιστεί με κοκκινωπό χρώμα και πρέπει να είναι εύκολη η καταμέτρησή τους λόγω του ότι θα κείτονται στην επιφάνεια του υποστρώματος. Εναλλακτικά, το μείγμα υποστρώματος-αλκοόλης μπορεί να εκπλυθεί με κόσκινο (βροχίδες διαμέτρου 0,250 mm) πριν από την καταμέτρηση των σκωλήκων. Με τη διαδικασία αυτή, ο καολινίτης, η τύρφη και κάποια ποσότητα άμμου θα εκπλυθούν και θα είναι πιο ορατοί και ευκολότερα μετρήσιμοι οι σκώληκες που θα έχουν χρωματιστεί με κοκκινωπό χρώμα. Η χρήση φωτισμένων φακών (μέγεθος φακού τουλάχιστον 100 × 75 mm με συντελεστή μεγέθυνσης 2 έως 3×) θα διευκολύνει επίσης τη μέτρηση.

Η τεχνική της χρώσης μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για τη μέτρηση σε λίγα λεπτά ανά δοχείο και, γενικά, θα πρέπει να είναι δυνατόν να αξιολογεί ένα άτομο όλα τα δοχεία από μια δοκιμασία εντός δύο ημερών το πολύ.

Υγρή εκχύλιση

Η υγρή εκχύλιση πρέπει να ξεκινήσει αμέσως μετά το τέλος της δοκιμής. Το έδαφος από κάθε δοχείο δοκιμής τοποθετείται σε πλαστικά κόσκινα με διάμετρο βροχίδας περίπου 1mm. Στη συνέχεια τα κόσκινα προσαρμόζονται σε πλαστικές λεκάνες χωρίς να αγγίζουν τον πυθμένα. Οι λεκάνες γεμίζουν προσεκτικά με νερό έως ότου τα δείγματα στα κόσκινα βρεθούν εντελώς κάτω από την επιφάνεια του νερού. Για να εξασφαλιστεί ποσοστό ανάκτησης πάνω από 90 % των σκωλήκων που είναι παρόντες, πρέπει να χρησιμοποιηθεί περίοδος εκχύλισης 3 ημερών στους 20 ± 2 °C. Στο τέλος της περιόδου εκχύλισης τα κόσκινα αφαιρούνται και το νερό (εκτός από μικρή ποσότητα) αποχύνεται αργά κατά τρόπο ώστε να μην ανακατευτεί το ίζημα στον πυθμένα των λεκανών. Οι πλαστικές λεκάνες ανακινούνται ελαφρώς ώστε το ίζημα να αιωρηθεί στο υπερκείμενο νερό. Το νερό μεταφέρεται σε τρυβλίο Petri και, αφού τα σωματίδια του εδάφους κατακαθίσουν, μπορούν να ταυτοποιηθούν, να αφαιρεθούν και να μετρηθούν τα enchytraeids με τη χρήση στερεομικροσκοπίου και λαβίδων μαλακού χάλυβα.

Επίπλευση

Μια μέθοδος που βασίζεται σε επίπλευση περιγράφεται σε σημείωμα του R. Kuperman (4). Αφού οριστεί το περιεχόμενο ενός δοχείου δοκιμής με αιθανόλη, το έδαφος κατακλύζεται με Ludox (διοξείδιο του πυριτίου AM-30, εναιώρημα 30 % κ.β. σε νερό) έως και 10 με 15 mm πάνω από την επιφάνεια του εδάφους. Αφού ανακατευτεί πολύ καλά το έδαφος με τον παράγοντα επίπλευσης για 2 - 3 λεπτά, οι νεαροί σκώληκες που επιπλέουν στην επιφάνεια μπορούν εύκολα να μετρηθούν.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo 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 σελίδες.

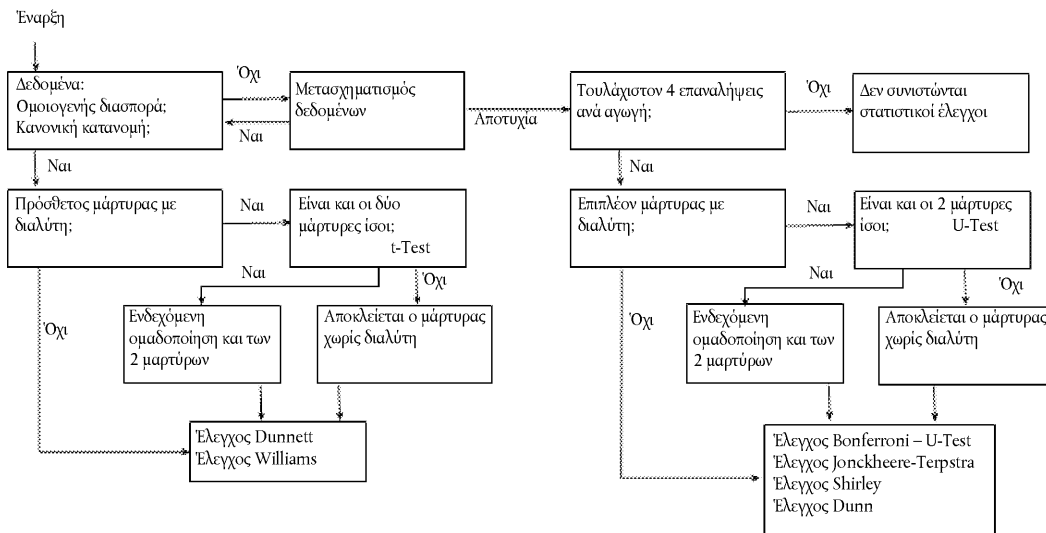
-
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
 - (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. 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.
-

Προσάρτημα 7

Επισκόπηση της στατιστικής εκτίμησης των δεδομένων (προσδιορισμός NOEC)

Παραμετρικοί έλεγχοι

Μη παραμετρικοί έλεγχοι



Γ.33 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΙΟΣΚΩΛΗΚΩΝ (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 222 του ΟΟΣΑ (2004). Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των επιδράσεων που προκαλούν στην αναπαραγωγή του είδους γαιοσκωλήκων *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ή *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2) (και άλλα σχεδόν θανατηφόρα τελικά σημεία) οι χημικές ουσίες στο έδαφος. Η δοκιμασία έχει υποβληθεί σε δοκιμή δακτυλίου (ring test) (3). Μια μέθοδος δοκιμών για τη δοκιμασία οξείας τοξικότητας στους γαιοσκωλήκες υπάρχει ήδη (4). Έχουν δημοσιευτεί πολλές άλλες διεθνείς και εθνικές κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε γαιοσκωλήκες (5)(6)(7)(8).
2. Τα είδη *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* θεωρούνται αντιπροσωπευτικά της πανίδας του εδάφους και των γαιοσκωλήκων ιδιαίτερως. Υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης για την οικολογία των γαιοσκωλήκων και τη χρήση τους στις οικοτο-εκολογικές δοκιμασίες (7)(9)(10)(11)(12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Ενήλικοι γαιοσκωλήκες εκτίθενται σε εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είτε αναμεμιγμένης με το έδαφος είτε, στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων, εφαρμοζόμενης μέσα ή πάνω στο έδαφος με διαδικασίες συνεπείς με τον τρόπο χρήσης της χημικής ουσίας. Η μέθοδος εφαρμογής είναι ανάλογη με τον σκοπό της δοκιμής. Το εύρος των συγκεντρώσεων δοκιμής επιλέγεται κατά τρόπο ώστε να περικλείονται εκείνες που είναι πιθανό να προκαλέσουν θανατηφόρες ή υποθανατηφόρες επιδράσεις σε περίοδο οκτώ εβδομάδων. Η θνησιμότητα και οι αυξητικές συνέπειες σε ενήλικους γαιοσκωλήκες προσδιορίζονται ύστερα από έκθεση 4 εβδομάδων. Οι ενήλικοι γαιοσκωλήκες αφαιρούνται στη συνέχεια από το έδαφος και γίνεται εκτίμηση των επιδράσεων στην αναπαραγωγή ύστερα από 4 ακόμη εβδομάδες με μέτρηση του αριθμού των απογόνων στο έδαφος. Η αναπαραγωγική απόδοση των σκωλήκων που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία συγκρίνεται με αυτήν του/των μάρτυρα/-ων, ώστε να προσδιοριστεί i) η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και/ή ii) η EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}) με τη χρήση ενός μοντέλου παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει x % μείωση της αναπαραγωγικής επίδοσης. Η τιμή της EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}) θα πρέπει να περικλείεται από τις συγκεντρώσεις δοκιμής ώστε εξασφαλίζεται ότι η EC_x προέρχεται από παρεμβολή και όχι από προεκβολή (βλ. προσάρτημα 1 για ορισμούς).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

4. Πρέπει να διατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία, οι οποίες είναι χρήσιμες για τον σχεδιασμό των κατάλληλων διαδικασιών δοκιμής:
 - διαλυτότητα στο νερό·
 - $\log K_{ow}$ ·
 - τάση ατμών·
 - και πληροφορίες για την πορεία και τη συμπεριφορά στο περιβάλλον, όπου είναι δυνατόν (π.χ. ταχύτητα φωτόλυσης και ταχύτητα υδρόλυσης, όπου αυτό έχει σημασία για τον τρόπο εφαρμογής).
5. Αυτή η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται σε όλες τις χημικές ουσίες ανεξάρτητα από τη διαλυτότητά τους στο νερό. Η μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται σε πτητικές χημικές ουσίες, που εδώ ορίζονται ως χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του νόμου του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού είναι μεγαλύτερος από ένα, ή σε χημικές ουσίες με τάση ατμών που υπερβαίνει τα 0,0133 Pa στους 25 °C.
6. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δοκιμών δεν μπορεί να γίνει δεκτή ενδεχόμενη αποικοδόμηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κατά την περίοδο της δοκιμής. Κατά συνέπεια δεν μπορεί να υποτεθεί ότι οι συγκεντρώσεις έκθεσης θα διατηρηθούν στις αρχικές τιμές σε όλη τη δοκιμή. Η χημική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής συνιστάται στην εν λόγω περίπτωση.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Πρέπει να προσδιοριστούν η NOEC και/ή η EC_x μιας χημικής ουσίας αναφοράς ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι συνθήκες της εργαστηριακής δοκιμής είναι κατάλληλες και για να επαληθευτεί ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν αλλάζει στατιστικώς με την πάροδο του χρόνου. Είναι σκόπιμο να υποβάλλεται η ουσία αναφοράς σε δοκιμή τουλάχιστον μία φορά ετησίως ή, στην περίπτωση των δοκιμών που διεξάγονται με μικρότερη συχνότητα, παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι ουσίες carbendazim ή benomyl είναι κατάλληλες ουσίες αναφοράς, για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν επίδραση στην αναπαραγωγή (3). Μεταξύ α) 1 και 5 mg δραστικού συστατικού/kg ξηρής μάζας ή β) 250-500 g/ha ή 25-50 mg/m² θα πρέπει να παρατηρηθούν σημαντικά αποτελέσματα. Σε περίπτωση που συμπεριληφθεί πρότυπη τοξική ουσία στη σειρά δοκιμών, χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση και ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ο ίδιος με αυτόν των μαρτύρων.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

8. Για να θεωρηθεί έγκυρο ένα αποτέλεσμα δοκιμής, τα ακόλουθα κριτήρια θα πρέπει να ικανοποιούνται για τους μάρτυρες:
- σε κάθε επανάληψη (που περιέχει 10 ενήλικα άτομα) να αναπαράγονται ≥ 30 νεαρά άτομα έως το τέλος της δοκιμής·
 - ο συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγής να είναι ≤ 30 %·
 - η θνησιμότητα των ενήλικων ατόμων τις πρώτες 4 εβδομάδες της δοκιμής να είναι ≤ 10 %.

Όταν μια δοκιμή δεν ανταποκρίνεται στα παραπάνω κριτήρια εγκυρότητας η δοκιμή θα πρέπει να τερματίζεται, εκτός αν μπορεί να δικαιολογηθεί η συνέχισή της. Η αιτιολόγηση πρέπει να περιέχεται στην έκθεση.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Εξοπλισμός

9. Είναι δέον να χρησιμοποιηθούν δοχεία από γυαλί ή άλλο αδρανές χημικά υλικό χωρητικότητας ενός έως δύο λίτρων. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν επιφάνεια διατομής περίπου 200 cm², έτσι ώστε να επιτυγχάνεται υγρό βιόδος υποστρώματος περίπου 5-6 cm όταν προστίθενται 500 έως 600 g ξηρής μάζας υποστρώματος. Το σχέδιο του δοχείου θα πρέπει να επιτρέπει την κυκλοφορία αερίων μεταξύ του υποστρώματος και της ατμόσφαιρας και την πρόσβαση του φωτός (π.χ. μέσω διάτρητου διαφανούς καλύμματος) ενώ θα εμποδίζει τους σκώληκες να διαφύγουν. Αν η ποσότητα του υποστρώματος δοκιμής που χρησιμοποιείται είναι αισθητά πάνω από 500 - 600 g ανά δοχείο δοκιμής, ο αριθμός των σκωλήκων θα πρέπει να αυξηθεί αναλογικά.
10. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:
- θάλαμος ξήρασης·
 - στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·
 - πεχάμετρο και φωτόμετρο·
 - κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της θερμοκρασίας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας (δεν είναι απαραίτητο, αν τα δοχεία έκθεσης καλύπτονται με πώματα)·
 - επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο με κλιματισμό·
 - λαβίδες, άγκιστρα ή θηλιές/βρόχοι·
 - υδρόλουτρο.

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

11. Στην παρούσα δοκιμή (5)(7) χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος με την ακόλουθη σύνθεση (με βάση ξηρό βάρος, το έδαφος ξηραίνεται στους 105 ° C μέχρι σταθερού βάρους):
- 10 % τύρφης σφάγγων (με pH όσο το δυνατό πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτού, λεπτοαλεσμένης, αποξηραμένης έως τη μετρηθείσα περιεκτικότητα σε υγρασία)·
 - 20 % καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολίνη κατά προτίμηση πάνω από 30 %)

- 0,3 έως 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3 , κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας) για την επίτευξη αρχικού pH $6,0 \pm 0,5$.
- 70 % αερόξηρης χαλαζιακής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα του CaCO_3 που απαιτείται), θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %.

Σημείωση 1: Η απαραίτητη ποσότητα CaCO_3 θα εξαρτάται από τα συστατικά του εδαφικού υποστρώματος, συμπεριλαμβανομένης της τροφής, και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μετρήσεις των μερικών δειγμάτων του εδάφους αμέσως πριν από τη δοκιμή. Το pH μετρείται σε μεικτό δείγμα σε διάλυμα 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) ή σε διάλυμα 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) (13).

Σημείωση 2: Προαιρετικά, μπορεί να μειωθεί η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε οργανικό άνθρακα, π.χ. με ελάττωση της περιεκτικότητας σε τύρφη σε 4-5 % και ανάλογη αύξηση της περιεκτικότητας σε άμμο. Με αυτή τη μείωση της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, είναι δυνατόν να μειωθούν οι δυνατότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος (οργανικός άνθρακας) και να αυξηθεί η διαθεσιμότητά της για τους σκώληκες. Έχει καταδειχθεί ότι τα είδη *Eisenia fetida* μπορούν να πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας σχετικά με την αναπαραγωγή, όταν υποβάλλονται σε δοκιμές με γεωργικά εδάφη χαμηλότερης περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα, π.χ. 2,7 % (14), και η πείρα δείχνει ότι αυτό μπορεί να επιτευχθεί και σε τεχνητό έδαφος με 5 % τύρφης. Συνεπώς, δεν είναι ανάγκη, προτού χρησιμοποιηθεί τέτοιο έδαφος σε οριστική δοκιμή, να καταδειχθεί η καταλληλότητα του τεχνητού εδάφους για να καταστεί δυνατή η συμμόρφωση της δοκιμής με τα κριτήρια εγκυρότητας, εκτός αν η περιεκτικότητα σε τύρφη ελαττωθεί περισσότερο από όσο ορίζεται παραπάνω.

Σημείωση 3: Όταν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος σε πρόσθετες δοκιμές (π.χ. ανώτερης βαθμίδας), η καταλληλότητα του εδάφους και η συμμόρφωση με τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής πρέπει επίσης να καταδεικνύονται.

12. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμεικτή μεγάλης κλίμακας) σε επαρκώς αεριζόμενη επιφάνεια. Προτού ξεκινήσει η δοκιμή, το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής υγρασίας, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (αντιστοιχεί στο 50 ± 10 % υγρασίας ξηρής μάζας). Αυτό θα δημιουργήσει ένα υπόστρωμα που δεν έχει στάσιμο ή ελεύθερο νερό όταν πιέζεται στο χέρι. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2, το ISO 11274 (15) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ.
13. Αν η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους ή αναμειγνύεται με το έδαφος χωρίς νερό, η τελική ποσότητα του νερού μπορεί να αναμειχθεί στο τεχνητό έδαφος κατά την παρασκευή του εδάφους. Αν η υπό δοκιμή χημική ουσία εφαρμόζεται στο έδαφος μαζί με κάποια ποσότητα νερού, το επιπλέον νερό μπορεί να προστεθεί μαζί με την υπό δοκιμή χημική ουσία (βλ. σημείο 19).
14. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11465 (16) ή το ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ και το pH του εδάφους σύμφωνα με το προσάρτημα 3 ή το πρότυπο ISO 10390 (13) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ. Οι μετρήσεις αυτές θα πρέπει να εκτελούνται σε δείγμα μάρτυρα και σε δείγμα από κάθε συγκέντρωση δοκιμής εδάφους. Το pH του εδάφους δεν πρέπει να ρυθμίζεται όταν υποβάλλονται σε δοκιμή οξέα ή βάσεις. Η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθείται σ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής με περιοδική ζύγιση των δοχείων (βλ. παραγράφους 26 και 30).

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

15. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι το *Eisenia fetida* ή *Eisenia andrei* (1)(2). Για την έναρξη της δοκιμής χρειάζονται ενήλικοι σκώληκες, ηλικίας μεταξύ δύο μηνών και ενός έτους, που διαθέτουν δακτυλιοειδή τμήματα. Οι σκώληκες θα πρέπει να επιλέγονται από μια συγχρονισμένη καλλιέργεια με σχετικά ομοιογενή ηλικιακή δομή (προσάρτημα 4). Τα άτομα σε μια ομάδα δοκιμής δεν θα πρέπει να διαφέρουν ηλικιακά κατά περισσότερο από 4 εβδομάδες.
16. Οι σκώληκες που έχουν επιλεγεί θα πρέπει να εγκλιματιστούν επί μία ημέρα τουλάχιστον με το υπόστρωμα του τεχνητού εδάφους για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Σ' αυτό το χρονικό διάστημα οι σκώληκες θα πρέπει να τρέφονται με την ίδια τροφή που χρησιμοποιείται στη δοκιμή (βλ. παραγράφους 31 έως 33).
17. Οι γαιοσκώληκες ζυγίζονται ξεχωριστά και τοποθετούνται τυχαία ανά ομάδες των 10 σε δοχεία στην αρχή της δοκιμής. Οι σκώληκες πλένονται πριν από το ζύγισμα (με απιονισμένο νερό) και το πλεονάζον νερό αφαιρείται με τη στιγμιαία τοποθέτηση των σκωλήκων σε διηθητικό χαρτί. Το υγρό βάρος κάθε σκώληκα χωριστά θα πρέπει να είναι μεταξύ 250 και 600 mg.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

18. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με το έδαφος (βλ. παραγράφους 19-21) ή εφαρμογή στην επιφάνεια του εδάφους (βλ. παραγράφους 22-24). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό της δοκιμής. Γενικά, συνιστάται η ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με το έδαφος. Ωστόσο, μπορεί να απαιτηθούν διαδικασίες εφαρμογής που είναι συνεπείς με τις συνήθειες γεωργικές πρακτικές (π.χ. ψεκασμός με παρασκεύασμα υγρής σύνδεσης ή χρήση ειδικών φυτοφαρμάκων με τη μορφή κόκκων ή σποροαπολύμανσης). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να βοηθήσουν στην κατεργασία του εδάφους με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επιλέγονται βάσει της δικής τους χαμηλής τοξικότητας ως προς τους γαιοσκώληκες και στον σχεδιασμό της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνεται ο κατάλληλος μάρτυρας με τον διαλύτη (βλ. σημείο 27).

Ανάμειξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος

Υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυτή στο νερό

19. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό αμέσως πριν από την έναρξη της δοκιμής, σε ποσότητα επαρκή για όλες τις επαναλήψεις μιας συγκεντρώσεως. Μπορεί να χρειαστεί συνδιάλυτης για να διευκολύνει την παρασκευή του δοκιμαστικού διαλύματος. Εξυπηρετεί η παρασκευή ποσότητας διαλύματος που χρειάζεται για να επιτευχθεί η τελική υγρασία (40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας). Το μείγμα αναμειγνύεται καλά με το υπόστρωμα εδάφους πριν εισαχθεί σε δοχείο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

20. Η υπό δοκιμή χημική ουσία διαλύεται σε μικρό όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. ακετόνης) και στη συνέχεια ψεκάζεται, ή αναμειγνύεται, με μικρή ποσότητα λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου. Ο διαλύτης στη συνέχεια αφαιρείται με εξάτμιση σε απαγωγό επί λίγα τουλάχιστον λεπτά. Η άμμος στη συνέχεια αναμειγνύεται καλά με το τεχνητό έδαφος που έχει προηγουμένως υγρανθεί. Προστίθεται και αναμειγνύεται απιονισμένο νερό (η ποσότητα που απαιτείται) για να επιτευχθεί η τελική περιεκτικότητα σε υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας. Το έδαφος στη συνέχεια είναι έτοιμο για την τοποθέτηση στα πειραματικά δοχεία. Πρέπει να υπάρξει μέριμνα ώστε ο διαλύτης να μην είναι τοξικός για τους γαιοσκώληκες.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

21. Παρασκευάζεται μείγμα που αποτελείται από 10 g λεπτοαλεσμένης βιομηχανικής χαλαζιακής άμμου με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ώστε να επιτευχθεί η συκέντρωση δοκιμής στο έδαφος. Το μείγμα στη συνέχεια αναμειγνύεται καλά με το τεχνητό έδαφος προτού αυτό υγρανθεί. Προστίθεται η ποσότητα απιονισμένου νερού που απαιτείται για να επιτευχθεί η τελική υγρασία, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας, και αναμειγνύεται. Το έδαφος στη συνέχεια είναι έτοιμο για την τοποθέτηση στα δοχεία δοκιμής.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους

22. Το έδαφος υφίσταται αγωγή αφότου προστεθούν οι σκώληκες. Τα δοκιμαστικά δοχεία πληρούνται πρώτα με το υπόστρωμα υγρού εδάφους και οι ζυγισμένοι σκώληκες τοποθετούνται στην επιφάνεια. Οι υγιείς σκώληκες συνήθως φωλιάζουν αμέσως στο υπόστρωμα και, κατά συνέπεια, όσοι μείνουν στην επιφάνεια ύστερα από 15 λεπτά θεωρείται ότι έχουν υποστεί βλάβη και πρέπει να αντικαθίστανται. Αν οι σκώληκες αντικατασταθούν, οι νέοι και οι παλιοί πρέπει να ζυγίζονται έτσι ώστε το συνολικό βάρος της ομάδας σκωλήκων που εκτίθενται και το συνολικό βάρος του δοχείου με τους σκώληκες να είναι γνωστά από την αρχή.
23. Εφαρμόζεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Δεν θα πρέπει να προστεθεί στο έδαφος το πρώτο μισάωρο μετά την εισαγωγή των σκωλήκων (ή αν οι σκώληκες είναι παρόντες στην επιφάνεια του εδάφους), ώστε να αποφευχθεί τυχόν άμεση έκθεση στην υπό δοκιμή χημική ουσία λόγω επαφής με το δέρμα. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι φυτοφάρμακο, ίσως είναι δέον να εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους με ψεκασμό. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμοστεί στην επιφάνεια του εδάφους όσο το δυνατόν πιο ομοιογενώς με τη χρήση κατάλληλου ψεκαστήρα εργαστηριακής κλίμακας για την προσομοίωση του ψεκασμού σε αγρό. Πριν από την εφαρμογή, το κάλυμμα του δοχείου δοκιμής θα πρέπει να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί με επένδυση που προστατεύει τα τοιχώματα του δοχείου από τον ψεκασμό. Η επένδυση μπορεί να είναι κατασκευασμένη από ένα δοχείο δοκιμής του οποίου αφαιρέθηκε η βάση. Η εφαρμογή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία μεταξύ 20 ± 2 °C και για υδατικά διαλύματα, γαλακτώματα ή διασπορές σε ποσότητα εφαρμογής μεταξύ 600 και 800 μl/m². Η ποσότητα εφαρμογής πρέπει να ελέγχεται με την κατάλληλη τεχνική βαθμονόμησης. Ειδικά σκευάσματα όπως σκευάσματα με τη μορφή κόκκων ή σποροαπολύμανσης θα πρέπει να εφαρμόζονται κατά τρόπο συνεπή με τη γεωργική χρήση.

24. Τα δοχεία δοκιμής πρέπει να μένουν ακάλυπτα για περίοδο μίας ώρας, ώστε να είναι δυνατόν να εξατμιστεί τυχόν πτητικός διαλύτης που έχει σχέση με την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Πρέπει να υπάρξει μέριμνα ώστε να μη διαφύγει κανένας σκώληκας από τα δοκιμαστικά δοχεία στο διάστημα αυτό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες

25. Συνιστάται η χρήση 10 σκωλήκων σε 500 - 600 g ξηρής μάζας τεχνητού εδάφους (δηλ. 50-60 g εδάφους ανά σκώληκα). Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες εδάφους, όπως μπορεί να συμβεί αν πρόκειται για φυτοφάρμακα ειδικής εφαρμογής όπως αυτά της σποροαπολύμανσης, θα πρέπει να διατηρηθεί η χρήση 50-60 g εδάφους ανά σκώληκα, με αύξηση του αριθμού των σκωλήκων. Για κάθε μάρτυρα και δοχείο αγωγής ετοιμάζονται δέκα σκώληκες. Οι σκώληκες πλένονται με νερό και σκουπίζονται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε απορροφητικό χαρτί για σύντομη περίοδο ώστε να στραγγιστεί το πλεονάζον νερό.
26. Για να αποφευχθούν συστηματικά σφάλματα στην κατανομή των σκωλήκων στα δοχεία δοκιμής, η ομοιογένεια του πληθυσμού δοκιμής θα πρέπει να προσδιοριστεί με ατομική ζύγιση 20 σκωλήκων που έχουν ληφθεί τυχαία από τον πληθυσμό από τον οποίο θα ληφθούν οι σκώληκες δοκιμής. Αφού εξασφαλιστεί η ομοιογένεια, επιλέγονται παρτίδες σκωλήκων και τοποθετούνται στα δοχεία δοκιμής με διαδικασία τυχαιοποίησης. Μετά την προσθήκη των σκωλήκων δοκιμής, μετριέται το βάρος κάθε δοχείου δοκιμής ώστε να εξασφαλιστεί ότι υπάρχει ένα αρχικό βάρος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε υγρασία, όπως περιγράφεται στο σημείο 30. Τα δοχεία δοκιμής καλύπτονται στη συνέχεια, όπως περιγράφεται στο σημείο 9 και τοποθετούνται στον θάλαμο δοκιμής.
27. Ετοιμάζονται οι κατάλληλοι μάρτυρες για καθεμία από τις μεθόδους εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που περιγράφονται στις παραγράφους 18 έως 24. Για την ετοιμασία των μαρτύρων εφαρμόζονται οι αντίστοιχες διαδικασίες που περιγράφονται, χωρίς όμως να προστίθεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνεπώς, εφαρμόζονται στους μάρτυρες, ανάλογα με την περίπτωση, οργανικοί διαλύτες, χαλαζιακή άμμος ή άλλοι φορείς στις ίδιες συγκεντρώσεις/ποσότητες όπως στις διάφορες αγωγές. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή άλλος φορέας για την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει επίσης να ετοιμάζεται και να ελέγχεται ένας επιπλέον μάρτυρας χωρίς τον φορέα ή την υπό δοκιμή χημική ουσία, ώστε να διασφαλιστεί ότι ο φορέας δεν έχει επίπτωση στο αποτέλεσμα.

Συνθήκες της δοκιμής

28. Η θερμοκρασία δοκιμής είναι 20 ± 2 °C. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός/σκοτός (κατά προτίμηση 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.
29. Τα δοχεία δοκιμής δεν αερίζονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής αλλά ο σχεδιασμός των καλυμμάτων των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να δίνει τη δυνατότητα κυκλοφορίας αερίων, ενώ θα περιορίζει την εξάτμιση της υγρασίας (βλ. σημείο 9).
30. Η περιεκτικότητα του εδαφικού υποστρώματος σε νερό στα δοχεία δοκιμής διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με επαναζύγιση των δοχείων δοκιμής (χωρίς τα καλύμματα) περιοδικώς. Οι απώλειες αναπληρώνονται, όταν χρειάζεται, με αποιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα σε νερό δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από το ± 10 % από αυτήν στην αρχή της δοκιμής.

Σίτιση

31. Οποιαδήποτε τροφή κατάλληλη για τη διατήρηση του βάρους των σκωλήκων στη διάρκεια της δοκιμής θεωρείται αποδεκτή. Η πείρα δείχνει ότι το άλευρο βρώμης, η κοπριά αγελάδας ή αλόγου είναι κατάλληλη τροφή. Πρέπει να γίνονται έλεγχοι για να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή ή αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες, νηματοδοκτόνα ή παρόμοια κτηνιατρικά προϊόντα που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται η κοπριά αγελάδας που έχει συλλεχθεί από τους ενδιαφερόμενους, διότι η πείρα δείχνει ότι η κοπριά αγελάδας που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και χρησιμοποιείται ως λίπασμα για τους κήπους μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στους σκώληκες. Η κοπριά θα πρέπει να ξηραίνεται στον αέρα, να είναι λεπτοαλεσμένη και παστεριωμένη πριν από τη χρήση.
32. Κάθε νέα παρτίδα τροφής θα πρέπει να χορηγείται, προτού χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή, σε καλλιέργεια σκωλήκων που δεν συμμετέχει στη δοκιμή, ώστε να εξασφαλιστεί ότι έχει τα κατάλληλα χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη και η παραγωγή κουκουλιών δεν θα πρέπει να είναι μειωμένες σε σύγκριση με τους σκώληκες που φυλάσσονται σε υπόστρωμα που δεν περιέχει τη νέα παρτίδα τροφής [συνθήκες σαν αυτές που περιγράφονται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (4)].

33. Η τροφή χορηγείται πρώτα μία ημέρα μετά την προσθήκη των σκωλήκων και την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος. Περίπου 5 g τροφής απλώνονται στην επιφάνεια του εδάφους σε κάθε δοχείο και βρέχονται με αποιονισμένο νερό (περίπου 5 ml έως 6 ml ανά δοχείο). Στη συνέχεια, η τροφή δίνεται μια φορά την εβδομάδα σε περίοδο δοκιμής 4 εβδομάδων. Αν η τροφή δεν καταναλωθεί, το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειωθεί ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μυκήτων ή η μούχλα. Οι ενήλικοι σκώληκες αφαιρούνται από το έδαφος την 28η ημέρα της δοκιμής. Στη συνέχεια χορηγούνται άλλα 5 g τροφής σε κάθε δοχείο δοκιμής. Τις υπόλοιπες 4 εβδομάδες της δοκιμής δεν χορηγείται τροφή.

Επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής

34. Αν είναι εκ των προτέρων γνωστή η τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διευκολύνεται η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής, π.χ. από μελέτες οξείας τοξικότητας (4) και/ή από μελέτες προσδιορισμού εύρους τιμών. Αν είναι ανάγκη, πραγματοποιείται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών, για παράδειγμα με πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg (ξηρή μάζα εδάφους). Για κάθε αγωγή και μάρτυρα αρκεί μία επανάληψη. Η διάρκεια της δοκιμής για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών και η θνησιμότητα αξιολογούνται στο τέλος της δοκιμής.

Σχεδιασμός του πειράματος

35. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί για την παρούσα δοκιμή ένα μόνο σύνολο συνοπτικών στατιστικών στοιχείων, η παρούσα μέθοδος δοκιμών προβλέπει τον προσδιορισμό της NOEC και της EC_x . Είναι πιθανόν να απαιτηθεί NOEC από τις κανονιστικές αρχές για το προσεχές μέλλον. Στο εγγύς μέλλον ενδέχεται να θεσπιστεί η πιο διαδεδομένη χρήση του EC_x , ως απόρροια στατιστικών και οικολογικών προβληματισμών. Συνεπώς, προτείνονται τρεις σχεδιασμοί, βάσει των συστάσεων που προκύπτουν από τη δοκιμή δακτυλίου (ring test) μιας μεθόδου δοκιμών για την αναπαραγωγή *Enchytraeidae* (17).
36. Κατά τον καθορισμό του εύρους συγκεντρώσεων θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα ακόλουθα:
- Για τον προσδιορισμό της NOEC θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε/δώδεκα συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 2,0.
 - Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}) συνιστάται επαρκής αριθμός συγκεντρώσεων για την πρόκληση τουλάχιστον τεσσάρων μέσων τιμών απόκρισης με σημαντική στατιστικά διαφορά μεταξύ τους στις εν λόγω συγκεντρώσεις. Συνιστώνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις με μάρτυρες. Ο συντελεστής διαστήματος μπορεί να διαφέρει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων επίδρασης και πάνω από 1,8 στην υψηλότερη και χαμηλότερη συγκέντρωση.
 - Με μια συνδυαστική προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός και της NOEC και της EC_x . Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 1,8.

Διάρκεια της δοκιμής και μετρήσεις

37. Την 28η ημέρα γίνεται παρατήρηση και καταμέτρηση των ενήλικων σκωλήκων που είναι ζωντανοί. Καταγράφονται, επίσης, οποιαδήποτε ασυνήθιστη συμπεριφορά (π.χ. αδυναμία να χωθούν στο έδαφος· ακινησία) και ανωμαλία στη μορφολογία (π.χ. ανοικτές πληγές). Όλοι οι ενήλικοι σκώληκες αφαιρούνται από τα δοχεία δοκιμής, καταμετρώνται και ζυγίζονται. Η μεταφορά του εδάφους που περιέχει τους σκώληκες σε καθαρό τελάρο πριν από την αξιολόγηση μπορεί να διευκολύνει την αναζήτηση των ενήλικων σκωλήκων. Οι σκώληκες που έχουν βγει από το έδαφος πλένονται πριν από το ζύγισμα (με αποιονισμένο νερό) και το πλεονάζον νερό αφαιρείται με την τοποθέτηση των σκωλήκων για λίγη ώρα σε διηθητικό χαρτί. Οι σκώληκες που δεν έχουν βρεθεί καταγράφονται ως νεκροί, με την παραδοχή ότι οι σκώληκες αυτοί πέθαναν και αποσυντέθηκαν πριν από την αξιολόγηση.
38. Αν το έδαφος έχει αφαιρεθεί από τα δοχεία, στη συνέχεια επιστρέφεται (αφού αφαιρεθούν οι ενήλικοι σκώληκες αλλά με τα κουκούλια που παρήγαγαν). Το έδαφος μετά επωάζεται επί τέσσερις ακόμη εβδομάδες με τις ίδιες συνθήκες δοκιμής, εκτός από το ότι η σίτιση γίνεται μόνο στην αρχή αυτού του σταδίου της δοκιμής (βλ. σημείο 33).

39. Στο τέλος της δεύτερης περιόδου των 4 εβδομάδων, προσδιορίζεται ο αριθμός των νεαρών σκωλήκων που εξέρχονται από τα κουκούλια στο έδαφος δοκιμής και ο αριθμός των κουκουλιών με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 5. Σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να καταγράφονται όλα τα σημεία βλάβης ή ζημίας στους σκωλήκες.

Οριακή δοκιμή

40. Αν δεν παρατηρηθούν επιδράσεις στην ανώτατη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών (1 000 mg/kg), η δοκιμή αναπαραγωγής θα πρέπει να εκτελείται ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση συγκέντρωσης δοκιμής με 1 000 mg/kg. Η οριακή δοκιμή δίνει τη δυνατότητα να καταδειχθεί ότι η NOEC για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση, ενώ ελαχιστοποιείται ο αριθμός των σκωλήκων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις τόσο για το έδαφος αγωγής όσο και για τον μάρτυρα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

41. Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών δεν δίνονται στατιστικές οδηγίες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων δοκιμής, αν και παρέχεται επισκόπηση στο προσάρτημα 6.
42. Ένα τελικό σημείο είναι η θνησιμότητα. Οι αλλαγές στη συμπεριφορά (π.χ. αδυναμία των σκωλήκων να χωθούν στο έδαφος· ακινησία πάνω στο γυάλινο τοίχο του δοχείου δοκιμής) και οι ανωμαλίες στη μορφολογία (π.χ. ανοικτές πληγές) των ενήλικων σκωλήκων θα πρέπει, ωστόσο, να καταγράφονται όπως και η παρουσία τυχόν νεαρών σκωλήκων. Η ανάλυση Probit (18) ή η λογιστική παλινδρόμηση θα πρέπει κανονικά να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό της LC_{50} . Ωστόσο, σε περιπτώσεις που αυτή η μέθοδος ανάλυσης δεν είναι κατάλληλη (π.χ. αν υπάρχουν λιγότερες από τρεις συγκεντρώσεις εν μέρει με θανάτους), μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν κινητούς μέσους όρους (19), την απλοποιημένη μέθοδο Spearman-Kärber ή απλή παρεμβολή (π.χ. γεωμετρικός μέσος όρος της LC_0 και LC_{100} , όπως υπολογίζεται με την τετραγωνική ρίζα της LC_0 πολλαπλασιασμένη με την LC_{100}).
43. Το άλλο τελικό σημείο είναι η γονιμότητα (π.χ. αριθμός των νεαρών σκωλήκων). Ωστόσο, όπως στη δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών, όλα τα άλλα επιβλαβή σημεία θα πρέπει να καταγράφονται στην τελική έκθεση. Για τη στατιστική ανάλυση απαιτείται να υπολογιστεί ο αριθμητικός μέσος όρος \bar{x} και η τυπική απόκλιση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα για την αναπαραγωγή.
44. Αν έχει γίνει ανάλυση διασποράς, η τυπική απόκλιση, s , και οι βαθμοί ελευθερίας (df) μπορούν να αντικατασταθούν από εκτιμήσεις ομαδοποιημένης διακύμανσης που έχουν προέλθει από την ANOVA και τους βαθμούς ελευθερίας αντίστοιχα, υπό την προϋπόθεση ότι η διακύμανση δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται οι διακυμάνσεις μόνο μάρτυρα και αγωγών. Οι εν λόγω τιμές υπολογίζονται συνήθως με το εμπορικό στατιστικό λογισμικό με τη χρήση των ανά δοχείο αποτελεσμάτων ως πανομοιότυπων. Αν η ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αρνητικά και τους μάρτυρες με τον διαλύτη φαίνεται πιο λογική από το να γίνονται δοκιμές για καθένα από αυτά, θα πρέπει να ελέγχονται για να διαπιστωθεί ότι δεν έχουν σημαντική διαφορά (για την κατάλληλη δοκιμή, βλ. σημείο 47 και προσάρτημα 6).
45. Η εκτέλεση περαιτέρω στατιστικών ελέγχων και η επαγωγική άντληση συμπερασμάτων εξαρτάται από το αν οι τιμές των επαναλήψεων έχουν κανονική κατανομή και είναι ομοιογενείς ως προς τη διασπορά τους.

Εκτίμηση NOEC

46. Προτιμώνται οι ανθεκτικές δοκιμές. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πληροφορίες από προηγούμενα πειράματα με δοκιμές δακτυλίου ή άλλα ιστορικά στοιχεία για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κατά πάροδο χρόνου κανονική κατανομή. Η ομοιογένεια διασποράς (ομοσκεδαστικότητα) έχει πιο κρίσιμη σημασία. Από την εμπειρία φαίνεται ότι η διακύμανση αυξάνεται συχνά όταν αυξάνεται και ο μέσος όρος. Στις περιπτώσεις αυτές, ο μετασχηματισμός των δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ομοσκεδαστικότητα. Ωστόσο, τέτοιου είδους μετασχηματισμός θα πρέπει να βασίζεται σε ιστορικά δεδομένα και όχι στα δεδομένα υπό διερεύνηση. Με τα ομοιογενή δεδομένα, θα πρέπει να διενεργηθούν πολλαπλοί έλεγχοι όπως η δοκιμασία Williams ($\alpha = 0,05$, ενός άκρου) (21)(22) ή σε ορισμένες περιπτώσεις ο έλεγχος Dunnett (23)(24). Να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση άνωτων επαναλήψεων, ο πίνακας με τις τιμές t πρέπει να διορθωθεί όπως προτείνουν οι Dunnett και Williams. Μερικές φορές, λόγω της μεγάλης διασποράς οι αποκρίσεις δεν αυξάνονται/μειώνονται τακτικά. Στην περίπτωση αυτή μεγάλης απόκλισης από τη μονοτονικότητα, ο έλεγχος Dunnett είναι καταλληλότερος. Αν υπάρχουν αποκλίσεις από την ομοσκεδαστικότητα, μπορεί να είναι λογικότερο να

διερευνηθούν πιο στενά ενδεχόμενες επιδράσεις στις διακυμάνσεις, ώστε να αποφασιστεί αν οι έλεγχοι t μπορούν να εφαρμοστούν χωρίς μεγάλη απώλεια ισχύος (25). Εναλλακτικά, ένας πολλαπλός έλεγχος U , π.χ. ο έλεγχος Bonferroni- U κατά Holm (26), ή όταν τα στοιχεία αυτά παρουσιάζουν ετεροσκεδαστικότητα αλλά είναι, από άλλη άποψη, συνεπή με τη μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, μπορεί να πραγματοποιηθεί ένας άλλος μη παραμετρικός έλεγχος [π.χ. Jonckheere-Terpstra (27)(28) ή Shirley (29) (30)] και προτιμάται, σε γενικές γραμμές, σε σχέση με τη δοκιμασία t άνισης διασποράς (βλ. επίσης το διάγραμμα στο προσάρτημα 6).

47. Αν έχει πραγματοποιηθεί οριακή δοκιμή και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογένεια), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος Student με συγκρίσεις κατά ζεύγη ή διαφορετικά η διαδικασία Mann-Whitney- U -test (31).

Εκτίμηση της EC_x

48. Για να υπολογιστεί οποιαδήποτε τιμή EC_x , οι μέσες τιμές προ αγωγής χρησιμοποιούνται για ανάλυση της παλινδρόμησης (γραμμικής ή μη γραμμικής), αφού έχει επιτευχθεί η κατάλληλη λειτουργία δόσης-απόκρισης. Για την ανάπτυξη των σκολήκων ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να εκτιμηθούν με χρήση της κατάλληλης ανάλυσης παλινδρόμησης (32). Μεταξύ των κατάλληλων συναρτήσεων για τα δυαδικά δεδομένα (θνησιμότητα/επιβίωση και αριθμός των απογόνων) είναι η κανονική σιγμοειδής καμπύλη, η λογιστική συνάρτηση ή η συνάρτηση Weibull, που περιέχουν δύο ή τέσσερις παραμέτρους, μερικές από τις οποίες μπορούν επίσης να διαμορφώσουν αποκρίσεις όρμησης. Αν η συνάρτηση δόσης-απόκρισης έχει προσαρμοστεί με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, θα πρέπει να βρεθεί ένας σημαντικός r^2 (συντελεστής προσδιορισμού) και/ή κλίση με την ανάλυση παλινδρόμησης προτού εκτιμηθεί η EC_x , με εισαγωγή τιμής που αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου μάρτυρα στην εξίσωση που βρέθηκε με την ανάλυση παλινδρόμησης. Τα όρια εμπιστοσύνης 95 % υπολογίζονται σύμφωνα με Fieller [αναφέρεται από τον Finney (18)] ή με άλλες σύγχρονες κατάλληλες μεθόδους.
49. Εναλλακτικά, η απόκριση διαμορφώνεται ως ποσοστό ή αναλογία της παραμέτρου του μοντέλου που ερμηνεύεται ως η μέση απόκριση του μάρτυρα. Στις περιπτώσεις αυτές, η κανονική σιγμοειδής καμπύλη (λογιστική συνάρτηση, συνάρτηση Weibull) μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν στα αποτελέσματα με τη διαδικασία παλινδρόμησης $probit$ (18). Στις περιπτώσεις αυτές η συνάρτηση στάθμισης πρέπει να προσαρμόζεται για μετρικές αποκρίσεις σύμφωνα με Christensen (33). Ωστόσο, αν έχει παρατηρηθεί όρμηση, η ανάλυση $probit$ θα πρέπει να αντικατασταθεί με λογιστική συνάρτηση τεσσάρων παραμέτρων ή συνάρτηση Weibull, αφού γίνει προσαρμογή με διαδικασία μη γραμμικής παλινδρόμησης (34). Αν δεν μπορεί να προσαρμοστεί η κατάλληλη συνάρτηση δόσης-απόκρισης στα δεδομένα, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι για την εκτίμηση της EC_x και των ορίων εμπιστοσύνης, όπως οι κινητοί μέσοι όροι κατά Thompson (19) και η διαδικασία Trimmed Spearman-Kärber (20).

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

50. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- οριστική περιγραφή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αριθμός φορτίου, παρτίδας και αριθμός CAS, καθαρότητα·
- ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. $\log K_{ow}$, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και πληροφορίες για την πορεία και τη συμπεριφορά].

Οργανισμοί δοκιμής:

- ζώα που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής·
- ηλικία, εύρος μεγέθους (μάζα) των οργανισμών δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής

- λεπτομέρειες για την παρασκευή του εδάφους δοκιμής·
- μέγιστη υδατοχωρητικότητα του εδάφους·
- περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος·
- λεπτομέρειες των βοηθητικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·
- λεπτομέρειες βαθμονόμησης του ψεκαστικού εξοπλισμού, εφόσον χρησιμοποιείται·
- περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και διαδικασία·
- μέγεθος των δοχείων δοκιμής και όγκος του εδάφους δοκιμής·
- συνθήκες δοκιμής: ένταση του φωτός, διάρκεια των κύκλων φωτός-σκότους, θερμοκρασία·

- περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, του είδους και της ποσότητας της τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης·
- pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

- θνησιμότητα ενηλίκων (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος των πρώτων 4 εβδομάδων της δοκιμής·
- συνολική μάζα των ενηλίκων στην αρχή της δοκιμής σε κάθε δοχείο δοκιμής·
- μεταβολές του βάρους των ζώντων ενηλίκων σκωλήκων (% του αρχικού βάρους) σε κάθε δοχείο δοκιμής μετά τις πρώτες τέσσερις εβδομάδες της δοκιμής·
- αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννήθηκαν σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·
- περιγραφή των εμφανών ή παθολογικών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς·
- τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς·
- τις LC₅₀, NOEC και/ή EC_x (π.χ. EC₅₀, EC₁₀) για την αναπαραγωγή, αν μερικές από αυτές ισχύουν με διαστήματα εμπιστοσύνης, και γράφημα του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους μαζί με όλες τις πληροφορίες και τις παρατηρήσεις που είναι χρήσιμες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων·
- διάγραμμα της σχέσης δόσης-απόκρισης·
- τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από κάθε δοχείο δοκιμής·

Οι αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft.* Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας για τους γαιοσκώληκες.
- (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, Γενεύη.
- (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, Γενεύη.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 σελίδες.
- (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, Γενεύη.
 - (14) Hund-Rinke, K, Römbke, 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, Γενεύη.
 - (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, Γενεύη.
 - (17) Römbke, 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 σελίδες.
 - (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), σ. 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. Νέα Υόρκη.
 - (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.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για επίδραση x %): η συγκέντρωση που προκαλεί επίδραση x % σε οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Στην εν λόγω δοκιμή οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC₀ (μη θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας με την οποία δεν θανατώνεται κανένας από τους εκτιθέμενους οργανισμούς δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα εδάφους δοκιμής.

LC₅₀ (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 50 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₅₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LC₁₀₀ (ολικά θανατηφόρος συγκέντρωση): η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας που προκαλεί τον θάνατο του 100 % των εκτιθέμενων οργανισμών δοκιμής εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Στην παρούσα δοκιμή η LC₁₀₀ εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$). Στην παρούσα δοκιμή η LOEC εκφράζεται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής. Όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής άνω της LOEC θα πρέπει κανονικά να παρουσιάζουν επίδραση στατιστικώς διαφορετική από τον μάρτυρα. Τυχόν αποκλίσεις από τα παραπάνω για τον προσδιορισμό της LOEC πρέπει να αιτιολογούνται στην έκθεση της δοκιμής.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η μέγιστη αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Ρυθμός αναπαραγωγής: ο μέσος αριθμός των νεαρών σκωλήκων που γεννιούνται ανά αριθμό ενήλικων κατά την περίοδο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη. Περιγράφεται στο παράρτημα C του ISO DIS 11268-2.

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) από το υπόστρωμα του υπό δοκιμή εδάφους με τη χρήση κατάλληλη συσκευής (ελικοειδής σωλήνας κ.λπ). Το κάτω μέρος του σωλήνα καλύπτεται με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, αφού γεμίσει με νερό, τοποθετείται στη βάση δοκιμαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας προοδευτικά βυθίζεται έως ότου το επίπεδο του νερού καλύψει το πάνω μέρος του εδάφους. Θα πρέπει να μείνει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι δεν μπορεί να απορροφηθεί όλο το νερό από τα τριχοειδή του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφηθεί να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε επιφάνεια πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε κλειστό δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Στη συνέχεια το δείγμα ζυγίζεται, ξηραίνεται σε σταθερή μάζα στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- (1) 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, Γενεύη.

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH ενός δείγματος εδάφους βασίζεται στην περιγραφή στο ISO 10390 (Ποιότητα εδάφους — προσδιορισμός του pH).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

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

Προσάρτημα 4

Καλλιέργεια των *eisenia fetida* / *eisenia andrei*

Η καλλιέργεια διεξάγεται κατά προτίμηση σε κλιματιζόμενο θάλαμο σε θερμοκρασία 20 ± 2 °C. Στην εν λόγω θερμοκρασία και με την παροχή επαρκούς τροφής, οι σκώληκες ωριμάζουν ύστερα από 2 έως 3 μήνες περίπου.

Τα δύο είδη μπορούν να αναπαράγονται σε ευρύ φάσμα ζωικών αποβλήτων. Το συνιστώμενο μέσο αναπαραγωγής είναι ένα μείγμα κοπριάς αλόγου ή βοοειδών και τύρφης σε αναλογία 50:50. Πρέπει να γίνονται έλεγχοι για να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή ή αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες, νηματωδοκτόνα ή παρόμοια κτηνιατρικά προϊόντα που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται η κοπριά αγελάδας που έχει συλλεγεί από τους ενδιαφερόμενους και είναι "βιολογικής" προέλευσης, διότι η πείρα δείχνει ότι η κοπριά αγελάδας που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και χρησιμοποιείται ως λίπασμα για τους κήπους μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στους σκώληκες. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να έχει τιμή pH περίπου 6 έως 7 (ρυθμίζεται με ανθρακικό ασβέστιο), χαμηλή ιοντική αγωγιμότητα (κάτω των 6 mS/cm ή συγκέντρωση άλατος κάτω του 0,5 %) και να μην είναι υπερβολικά μολυσμένο από αμμωνία ή ούρα ζώων. Το υπόστρωμα πρέπει να είναι υγρό αλλά όχι μουσκεμένο. Κατάλληλα για χρήση είναι τα κουτιά αναπαραγωγής των 10 έως 50 λίτρων.

Για να ληφθούν σκώληκες κανονικής ηλικίας και μεγέθους (μάζας), είναι προτιμότερο να αρχίσει η καλλιέργεια με κουκούλια. Μόλις η καλλιέργεια τοποθετηθεί, διατηρείται με την τοποθέτηση ενήλικων σκωλήκων σε κουτί αναπαραγωγής με φρέσκο υπόστρωμα ώστε να δημιουργηθούν κουκούλια επί 14 - 28 ημέρες. Οι ενήλικοι σκώληκες στη συνέχεια αφαιρούνται και οι νεαροί που έχουν βγει από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται ως βάση για τη νέα καλλιέργεια. Οι σκώληκες σιτίζονται διαρκώς με ζωικά απόβλητα και μεταφέρονται σε φρέσκο υπόστρωμα από καιρό σε καιρό. Η πείρα δείχνει ότι η αερόξηρη, λεπτοαλεσμένη κοπριά αγελάδος ή αλόγου ή το άλευρο βρώμης είναι κατάλληλη τροφή. Πρέπει να εξασφαλιστεί ότι οι αγελάδες ή τα άλογα από τα οποία προέρχεται η κοπριά δεν έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή με χημικές ουσίες, όπως αυξητικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στους σκώληκες σε μακροχρόνια καλλιέργεια. Οι σκώληκες που εξέρχονται από τα κουκούλια χρησιμοποιούνται για δοκιμές όταν είναι μεταξύ 2 και 12 μηνών και θεωρούνται ενήλικοι.

Οι σκώληκες θεωρούνται υγιείς εάν κινούνται μέσα στο υπόστρωμα, δεν προσπαθούν να το εγκαταλείψουν και αναπαράγονται συνεχώς. Το υπόστρωμα έχει εξασθενήσει αν οι σκώληκες κινούνται πολύ αργά και έχουν κίτρινο οπίσθιο άκρο. Στην περίπτωση αυτή, συνιστώνται η χορήγηση φρέσκου υποστρώματος και/ή η μείωση της πυκνότητας πληθυσμού.

Προσάρτημα 5

Τεχνικές μέτρησης νεαρών σκωλήκων που εξέρχονται από τα κουκούλια

Η εξαγωγή των σκωλήκων με το χέρι από το έδαφος είναι χρονοβόρα. Συνεπώς, συνιστώνται δύο εναλλακτικές μέθοδοι:

- α) Τα δοχεία τοποθετούνται σε υδρόλουτρο αρχικά σε θερμοκρασία 40 °C, η οποία όμως αυξάνεται σε 60 °C. Μετά περίοδο περίπου 20 λεπτών οι νεαροί σκώληκες θα πρέπει να εμφανιστούν στην επιφάνεια του εδάφους από την οποία εύκολα αφαιρούνται και καταμετρώνται.
- β) Το έδαφος δοκιμής μπορεί να εκπλυθεί με κόσκινο με χρήση της μεθόδου van Gestel et al. (1) υπό την προϋπόθεση ότι η τύρφη και η κοπριά ή το άλευρο βρώμης που προστίθενται στο έδαφος είναι πολύ λεπτοαλεσμένα. Δύο κόσκινα (διαμέτρου 30 cm) με βροχίδες διαμέτρου 0,50 mm τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο. Το περιεχόμενο ενός δοχείου εκπλένεται με τη βοήθεια των κόσκινων με νερό της βρύσης που τρέχει με πίεση, οπότε οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια τους μένουν κυρίως στο πάνω κόσκινο. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η επιφάνεια του πάνω κόσκινου πρέπει να παραμένει υγρή κατά τη διαδικασία αυτή, έτσι ώστε οι νεαροί σκώληκες να επιπλέουν σε μια μεμβράνη νερού, ώστε να μην μπορούν να περάσουν μέσα από τις σπές του κόσκινου. Καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν χρησιμοποιείται κεφαλή ντους.

Μόλις πλυθεί το υπόστρωμα εδάφους διαμέσου του κόσκινου, οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια εκπλύνονται από το επάνω κόσκινο σε μια λεκάνη. Το περιεχόμενο της λεκάνης ηρεμεί ώστε τα άδεια κουκούλια να επιπλεύσουν στην επιφάνεια του νερού και τα κουκούλια με περιεχόμενο όπως και οι νεαροί σκώληκες να βυθιστούν. Το στάσιμο νερό μπορεί στη συνέχεια να χυθεί και οι νεαροί σκώληκες και τα κουκούλια να μεταφερθούν σε τρυβλίο Petri που περιέχει λίγο νερό. Οι σκώληκες αφαιρούνται για μέτρηση με τη χρήση βελόνας ή λαβίδων.

Η πείρα δείχνει ότι η μέθοδος α) είναι πιο κατάλληλη για την εξαγωγή νεαρών σκωλήκων που θα μπορούσαν να εκπλυθούν μέσω οπής διαμέτρου 0,5 mm.

Θα πρέπει πάντα να προσδιορίζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση των σκωλήκων (και των κουκουλιών, αν χρειαστεί) από το υπόστρωμα εδάφους. Αν οι νεαροί σκώληκες συλλέγονται με τεχνική αφαίρεσης με το χέρι, είναι καλύτερα να διεξάγεται η διαδικασία δύο φορές για όλα τα δείγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

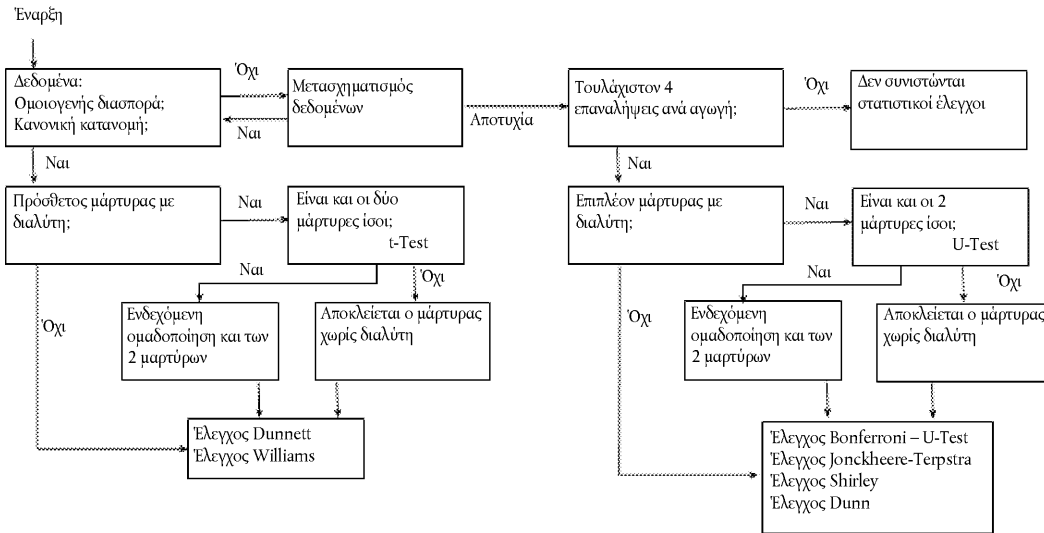
- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

Προσάρτημα 6

Επισκόπησή τη στατιστικής εκτίμησής των δεδομένων (προσδιορισμός NOEC)

Παραμετρικοί έλεγχοι

Μη παραμετρικοί έλεγχοι



Γ.34. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ — ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ ΙΛΥΟΣ (ΛΥΜΑΤΟΛΑΣΠΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 224 του ΟΟΣΑ (2007). Οι χημικές ουσίες που απορρίπτονται στο υδατικό περιβάλλον περνούν μέσω της αερόβιας και της αναερόβιας ζώνης, όπου μπορεί να αποικοδομούνται και/ή να αναστέλλουν τη βακτηριακή δραστηριότητα σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να παραμένουν ανενόχλητες στις αναερόβιες ζώνες για δεκαετίες ή και περισσότερο. Στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων το πρώτο στάδιο, η πρωτοβάθμια επεξεργασία, είναι αερόβια στο υπερκείμενο υγρό και αναερόβια στην εναπομεινάσα ιλύ. Στη δευτεροβάθμια επεξεργασία ακολουθεί η αερόβια ζώνη σε δεξαμενή αερισμού της ενεργοποιημένης ιλύος και η αναερόβια ζώνη στη δευτεροβάθμια δεξαμενή καθίζησης. Η ιλύς και από τα δύο στάδια υπόκειται συνήθως σε αναερόβια επεξεργασία, οπότε παράγεται μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα που κανονικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Στο ευρύτερο περιβάλλον, οι χημικές ουσίες που καταλήγουν σε ιζήματα σε κόλπους, εκβολές ποταμών και στη θάλασσα είναι πιθανόν να παραμείνουν επ' αόριστον στις εν λόγω αναερόβιες ζώνες, αν δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες. Για ορισμένες χημικές ουσίες, οι ποσότητες αυτές θα είναι μεγαλύτερες λόγω των φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, υψηλή προσρόφηση αιωρούμενων στερεών, αλλά και επειδή δεν βιοαποικοδομούνται αερόβια.
2. Ενώ είναι επιθυμητό οι χημικές ουσίες που απορρίπτονται στο περιβάλλον να βιοαποικοδομούνται υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, έχει μεγάλη σημασία αυτές οι χημικές ουσίες να μην αναστέλλουν τη δραστηριότητα μικροοργανισμών σε καμία από τις δύο ζώνες. Στο Ηνωμένο Βασίλειο υπήρξαν λίγες περιπτώσεις πλήρους αναστολής της παραγωγής μεθανίου, εξατίας, για παράδειγμα, της παρουσίας πενταχλωροφαινόλης σε βιομηχανικά απόβλητα, που είχε ως αποτέλεσμα την εξαιρετικά δαπανηρή μεταφορά ανεσταλμένης ιλύος από τους χωνευτές σε "ασφαλείς" τοποθεσίες και την εισαγωγή υγιούς ιλύος για χώνευση από γειτονικές εγκαταστάσεις. Υπήρξαν όμως πολλές περιπτώσεις λιγότερο σοβαρής διαταραχής της χώνευσης από πολλές άλλες χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων αλογονωμένων αλειφατικών υδρογονανθράκων (στεγνό καθάρισμα) και απορρυπαντικών, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας της χώνευσης.
3. Μόνο μία μέθοδος δοκιμών, η Γ.11 (1), ασχολείται με την αναστολή της δραστηριότητας των βακτηρίων (αναπνοή ενεργοποιημένης ιλύος), που αξιολογεί το αποτέλεσμα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στο ποσοστό πρόσληψης οξυγόνου στην παρουσία του υποστρώματος. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για έγκαιρη προειδοποίηση των δυνητικών επιβλαβών αποτελεσμάτων των χημικών ουσιών στην αερόβια επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, καθώς και για να επισημαίνει μη ανασταλτικές συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών προς χρήση σε διάφορες δοκιμές για βιοαποικοδομησιμότητα. Η μέθοδος δοκιμών Γ.43 (2) προσφέρει περιορισμένες δυνατότητες για τον προσδιορισμό της τοξικότητας μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην παραγωγή αερίου από αναερόβια ιλύ, η οποία έχει αραιωθεί στο ένα δέκατο της κανονικής συγκέντρωσης στερεών σε αυτή, ώστε να υπάρξει η απαιτούμενη ακρίβεια στην αξιολόγηση του ποσοστού βιοαποικοδόμησης. Επειδή η αραιωμένη ιλύς μπορεί να είναι πιο ευαίσθητη σε ανασταλτικές χημικές ουσίες, η ομάδα του ISO αποφάσισε να εκπονήσει μέθοδο με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος. Εξετάστηκαν τουλάχιστον τρία κείμενα (της Δανίας, της Γερμανίας και του ΗΒ) και τελικά εκπονήθηκαν δύο πρότυπα ISO, ένα με τη χρήση αναραιωτής ιλύος το ISO 13641-1 (3)- και ένα με τη χρήση ιλύος αραιωμένης σε αναλογία 1:100 -το ISO 13641-2 (4)- για να αντιπροσωπευτούν λάσπες και ιζήματα που έχουν ολιγάριθμους πληθυσμούς βακτηρίων. Και οι δύο μέθοδοι υποβλήθηκαν σε δοκιμή δακτυλίου (5)- το μέρος 1 επιβεβαιώθηκε ως αποδεκτό πρότυπο αλλά υπήρξε ασυμφωνία για το μέρος 2. Το ΗΒ θεώρησε ότι, λόγω μεγάλου ποσοστού συμμετεχόντων που δεν ανέφεραν παραγωγή αερίου ή πολύ μικρή παραγωγή αερίου, μερικώς επειδή το ποσοστό χώρου αερίου ήταν πολύ υψηλό (στο 75 %) για βέλτιστη ευαισθησία, η μέθοδος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.
4. Προηγούμενες εργασίες στο ΗΒ (6) (7) περιγράφουν μια μανομετρική μέθοδο με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος χώνευσης, επιπλέον ακατέργαστης λυματολάσπης ως υποστρώματος, σε φιάλες των 500 ml· η συσκευή ήταν περίπλοκη και η δυσοσμία της ακατέργαστης ιλύος πολύ δυνατή. Αργότερα, εφαρμόστηκε με επιτυχία από τους Wilson et al. (10) η πιο σύνθετη και εύχρηστη συσκευή των Shelton και Tiedje (8), όπως εξελίχθηκε από τους Battersby και Wilson (9). Οι Kawahara et al (11) παρασκεύασαν με επιτυχία πιο τυποποιημένη ιλύ στο εργαστήριο για χρήση σε δοκιμές για αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα και αναστολή με ορισμένες χημικές ουσίες. Επίσης, η ακατέργαστη ιλύς ως υπόστρωμα αντικαταστάθηκε, για τη διενέργεια δοκιμής, είτε με αραιωμένη εκατό φορές αναερόβια ιλύ είτε με λάσπες, ιζήματα κ.λπ. χαμηλής βακτηριακής δραστηριότητας.
5. Η εν λόγω μέθοδος μπορεί να παρέχει πληροφορίες που είναι χρήσιμες στην πρόγνωση της πιθανής επίδρασης μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην παραγωγή αερίου σε αναερόβια χωνευτήρια. Ωστόσο, μόνο από δοκιμές μεγαλύτερης διάρκειας που προσομοιάζουν εν λειτουργία χωνευτήρια μπορεί να φανεί αν είναι δυνατόν να γίνει προσαρμογή των μικροοργανισμών στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή αν χημικές ουσίες που είναι πιθανόν να απορροφώνται και να προσροφώνται σε ιλύ μπορούν να καταλήξουν σε τοξική συγκέντρωση σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό,τι επιτρέπεται στην εν λόγω δοκιμή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Κλάσματα μείγματος αναερόβιας ιλύος χώνευσης (20 g/l έως 40 g/l συνολικά στερεά) και αποικοδομήσιμο διάλυμα υποστρώματος επωάζονται μόνα τους και ταυτόχρονα με εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σφραγισμένα δοχεία επί 3 ημέρες κατ' ανώτατο όριο. Η παραγόμενη ποσότητα αερίων (μεθάνιο συν διοξείδιο του άνθρακα) μετρείται με την αύξηση της πίεσης (Pa) στις φιάλες. Το ποσοστό αναστολής της παραγωγής αερίου που προκαλείται από τις διάφορες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας υπολογίζεται από τα ποσά που παράγονται στις αντίστοιχες φιάλες δοκιμής και μάρτυρα. Η EC_{50} και άλλες αποτελεσματικές συγκεντρώσεις υπολογίζονται από διαγράμματα που δείχνουν την ποσοστιαία αναστολή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών ή, το συνηθέστερο, με τον λογάριθμό της.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται στην καθαρότερη διαθέσιμη μορφή τους, αφού οι προσμείξεις σε ορισμένες χημικές ουσίες, π.χ. στις χλωροφαινόλες, μπορεί να είναι πολύ πιο τοξικές από την ίδια την υπό δοκιμή χημική ουσία. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι ανάγκες για έλεγχο των χημικών ουσιών υπό τη μορφή στην οποία παράγονται/διατίθενται εμπορικά. Η χρήση μορφοποιημένων προϊόντων δεν συνιστάται συνήθως, αλλά για τις δυσδιάλυτες υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορεί να ενδείκνυται η χρήση μορφοποιημένου υλικού. Οι ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας πρέπει να είναι γνωστές: υδατοδιαλυτότητα και διαλυτότητα σε ορισμένους οργανικούς διαλύτες, τάση ατμών, συντελεστής προσρόφησης, υδρόλυση και βιοαποικοδομησιμότητα υπό αναερόβιες συνθήκες.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Η δοκιμή εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό, συμπεριλαμβανομένων των πτητικών ουσιών. Ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη μέριμνα με υλικά χαμηλής υδατοδιαλυτότητας [βλ. παραπομπή (12)] και υψηλής πτητικότητας. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμβόλια από άλλους αναερόβιους χώρους, π.χ. λάσπες, κεκορεσμένα εδάφη, ιζήματα. Αναερόβια βακτηριακά συστήματα που προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε τοξικές χημικές ουσίες μπορούν να προσαρμόζονται και να διατηρούν τη δραστηριότητά τους με την παρουσία ξενοβιοτικών χημικών ουσιών. Εμβόλια από προσαρμοσμένα βακτηριακά συστήματα ενδέχεται να δείχνουν μεγαλύτερη αντοχή στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες σε σύγκριση με εμβόλια που λαμβάνονται από μη προσαρμοσμένα συστήματα.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για την επαλήθευση της διαδικασίας, δοκιμάζεται υλικό αναφοράς με την τοποθέτηση κατάλληλων δοχείων παράλληλα ως μέρος της κανονικής εκτέλεσης των δοκιμών· η 3,5-διχλωροφαινόλη έχει αποδειχθεί συνεπής αναστολέας της αναερόβιας παραγωγής αερίου, καθώς και της κατανάλωσης οξυγόνου από ενεργοποιημένη ιλύ και άλλες βιοχημικές αντιδράσεις. Δύο άλλες χημικές ουσίες αποδείχθηκαν ότι είναι περισσότερο ανασταλτικές για την παραγωγή μεθανίου από την 3,5-διχλωροφαινόλη, συγκεκριμένα το διθειοκυανικό μεθυλένιο και η πενταχλωροφαινόλη, αλλά δεν έχουν επικυρωθεί τα αποτελέσματα γι' αυτές τις ουσίες. Η πενταχλωροφαινόλη δεν συνιστάται, αφού δεν είναι ευχερώς διαθέσιμη σε καθαρή μορφή.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10. Σε διεθνή δοκιμή δακτυλίου (5) υπήρξε μόνο μέτρια αναπαραγωγιμότητα σε τιμές EC_{50} μεταξύ των 10 συμμετεχόντων εργαστηρίων για την 3,5-διχλωροφαινόλη και το 2-βρωμοαιθανοσουλφονικό οξύ. (Η περιοχή τιμών για την πρώτη ουσία ήταν 32 mg/l έως 502 mg/l και για τη δεύτερη 220-2 190 mg/l).

| Αριθμός εργα- στηρίων | Ως mg/l | | | Ως ιλύς mg/g | | |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------------|
| | μέση | s.d. (τυπική απόκλιση) | συντελεστής διακύμανσης (%) | μέση | s.d. (τυπική απόκλιση) | συντελεστής διακύμανσης (%) |
| | 3, 5-διχλωροφαινόλη | | | | | |
| 10 | 153 | 158 | 103 | 5 | 4,6 | 92 |
| | 2-βρωμοαιθανοσουλφονικό οξύ | | | | | |
| 10 | 1 058 | 896 | 85 | 34 | 26 | 76 |

Δεδομένα EC₅₀ από τη δοκιμή δακτυλίου — μη αραιωμένη ιλύς

11. Οι υψηλοί συντελεστές διακύμανσης μεταξύ εργαστηρίων αντανακλούν σε μεγάλο βαθμό διαφορές στην ευαισθησία των μικροοργανισμών λόγω είτε προηγηθείσας έκθεσης είτε μη προηγηθείσας έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία ή σε άλλες χημικά συναφείς ουσίες. Η ακρίβεια με την οποία προσδιορίστηκε η τιμή EC₅₀ βάσει της συγκέντρωσης ιλύος δεν ήταν πολύ καλύτερη από την ογκομετρική τιμή (mg/l). Τα τρία εργαστήρια που ανέφεραν την ακρίβεια των τιμών τους για την EC₅₀ για την 3,5-διχλωροφαινόλη έδειξαν πολύ χαμηλότερους συντελεστές διακύμανσης (22,9 και 18 % αντίστοιχα για EC₅₀ mg/g) σε σχέση με τους μέσους όρους και των δέκα εργαστηρίων. Οι επιμέρους μέσοι όροι για τα τρία εργαστήρια ήταν 3,1, 3,2 και 2,8 mg/g, αντίστοιχα. Οι χαμηλότεροι, αποδεκτοί συντελεστές διακύμανσης εντός των εργαστηρίων σε σύγκριση με τους πολύ υψηλότερους συντελεστές μεταξύ εργαστηριακών τιμών, συγκεκριμένα 9-22 % πρβλ. 92 %, δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις ιδιότητες των επιμέρους ιλύων.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

12. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:

- α) Επωαστήρας — αντισπινθηριστικός και με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 35 °C ± 2 °C.
- β) γυάλινα δοχεία δοκιμής, ανθεκτικά στην πίεση, κατάλληλου ονομαστικού μεγέθους ⁽¹⁾, με αεροστεγές διάφραγμα που να αντέχει σε πίεση 2 bar ή 2×10^5 Pa (για την επένδυση να χρησιμοποιείται π.χ. PTFE = πολυτετραφθοροαιθυλένιο). Συνιστώνται γυάλινες φιάλες ορού ονομαστικού όγκου 125 ml, με πραγματική χωρητικότητα περίπου 160 ml, σφραγισμένες με πώμα ορού ⁽²⁾ και επιλώματα αλουμινίου· μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς και φιάλες συνολικής χωρητικότητας μεταξύ 0,1 και 1 λίτρου.
- γ) μετρητής πίεσης ακριβείας ⁽³⁾ και προσάρτημα βελόνας.
- Ολική παραγωγή αερίου (μεθάνιο συν διοξείδιο του άνθρακα) μετρούμενη με μετρητή πίεσης προσαρμοσμένο ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση και η εκτόνωση του παραγόμενου αερίου. Παράδειγμα κατάλληλης μέτρησης είναι ένας χειροκατευθυνόμενος μετρητής πίεσης ακριβείας συνδεδεμένος με βελόνα σύριγγας· μια τριοδική αεροστεγής βαλβίδα διευκολύνει την απελευθέρωση της υπερπίεσης (προσάρτημα 1). Είναι ανάγκη να διατηρηθεί ο εσωτερικός όγκος της σωλήνωσης του μορφοτροπέα πίεσης και της βαλβίδας όσο το δυνατόν μικρότερος, ώστε τα σφάλματα που προκαλούνται λόγω μη υπολογισμού του όγκου του εξοπλισμού να είναι ασήμαντα.
- δ) μονωμένοι περιέκτες, για τη μεταφορά της ιλύος χώνευσης.
- ε) τριοδικές βαλβίδες πίεσης.
- στ) κόσκινο, με τετράγωνες βροχίδες διαμέτρου 1 mm.
- ζ) δοχείο, για την ιλύ χώνευσης, φιάλη γυάλινη ή από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας, χωρητικότητας 5 λίτρων, εφοδιασμένο με αναδευτήρα και τεχνικά μέσα διοχέτευσης ρεύματος αερίου αζώτου (βλ. σημείο 13) διαμέσου του υπερκείμενου χώρου.
- η) διηθητικές μεμβράνες (0,2 μm) για την αποστείρωση του υποστρώματος.

⁽¹⁾ Το συνιστώμενο μέγεθος είναι 0,1 του λίτρου έως 1 λίτρο.

⁽²⁾ Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος σιλικόνης. Συνιστάται επιπλέον να ελεγχθεί κατά πόσον τα πώματα είναι αεροστεγή, ιδίως αυτά από βουτυλοκαουτσούκ, επειδή ορισμένα διαφράγματα που διατίθενται στο εμπόριο από βουτυλοκαουτσούκ δεν είναι επαρκώς αεροστεγή έναντι του μεθανίου και μερικά διαφράγματα δεν παραμένουν στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

— Συνιστώνται αεροστεγή διαφράγματα και πρέπει να χρησιμοποιούνται για πτητικές χημικές ουσίες (ορισμένα πώματα που διατίθενται στο εμπόριο είναι σχετικά λεπτά, με πάχος λιγότερο από 0,5 cm, και δεν παραμένουν αεροστεγή αν τρυπηθούν με βελόνα σύριγγας).

— συνιστώνται διαφράγματα από βουτυλοκαουτσούκ (περίπου 1 cm), αν οι ουσίες δοκιμής δεν είναι πτητικές (αυτά κανονικά παραμένουν αεροστεγή μετά τη διάτρηση).

— Πριν από τη δοκιμή, συνιστάται να εξετάζονται προσεκτικά τα διαφράγματα, ώστε να διαπιστώνεται αν μπορούν να παραμείνουν αεροστεγή μετά τη διάτρηση.

⁽³⁾ Ο μετρητής πίεσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να βαθμονομείται σε τακτά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αν χρησιμοποιείται μετρητής πίεσης της προδιαγεγραμμένης ποιότητας, π.χ. ενθυλακωμένος σε χαλύβδινη μεμβράνη, δεν είναι αναγκαία η βαθμονόμηση στο εργαστήριο. Θα πρέπει να διακρίβώνεται από εγκεκριμένο φορέα στα συνιστώμενα χρονικά διαστήματα. Η ορθότητα της διακρίβωσης μπορεί να ελεγχθεί στο εργαστήριο με μέτρηση ενός σημείου σε 1×10^5 Pa σε σύγκριση με έναν μετρητή πίεσης με μηχανική ένδειξη. Όταν το σημείο αυτό μετρείται σωστά, η γραμμικότητα παραμένει επίσης αμετάβλητη. Αν χρησιμοποιούνται άλλες συσκευές μέτρησης (χωρίς πιστοποιημένη διακρίβωση από τον κατασκευαστή), συνιστάται μετατροπή στο σύνολο των διατάξεων ανά τακτά διαστήματα (προσάρτημα 2).

θ) μικροσύριγγες, για την αεροστεγή σύνδεση του μορφοτροπέα πίεσης [βλ. σημείο 12 στοιχείο γ)] με τον υπερκείμενο χώρο στις φιάλες [βλ. σημείο 12 στοιχείο β)]· επίσης, για την προσθήκη αδιάλυτων υγρών υπό δοκιμή ουσιών στις φιάλες·

ι) κιβώτιο χειρισμών με γάντια (glove box) προαιρετικά, αλλά συνιστάται, με ελαφρά θετική πίεση αζώτου.

Αντιδραστήρια

- Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή. Σε όλη τη δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιείται αζωτούχο αέριο, υψηλής καθαρότητας, με περιεκτικότητα σε οξυγόνο μικρότερη από 5 μl/l.

Νερό

- Αν είναι αναγκαία η αραίωση σε κάποιο στάδιο, να χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό που έχει προηγουμένως εξεαριστεί. Δεν είναι αναγκαίοι αναλυτικοί έλεγχοι για το νερό αυτό, αλλά η συσκευή απιονισμού πρέπει να συντηρείται τακτικά. Να χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό και για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης. Πριν από την προσθήκη του αναερόβιου εμβολίου σε οποιοδήποτε διάλυμα ή αραίωμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, επαληθεύεται ότι αυτά δεν περιέχουν οξυγόνο. Αυτό γίνεται είτε φυσώντας άζωτο στο νερό αραίωσης (ή μέσω των αραιωμάτων) επί 1 ώρα πριν από την προσθήκη εμβολίου, ή εναλλακτικά με τη θέρμανση του νερού αραίωσης στο σημείο βρασμού και με την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου σε περιβάλλον χωρίς οξυγόνο.

Χωνευμένη ιλύς

- Συλλέγεται ενεργός χωνευμένη ιλύς από χωνευτήριο σε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων ή, διαφορετικά, από εργαστηριακό χωνευτήριο που επεξεργάζεται ιλύ κυρίως από οικιακά λύματα. Πρακτικές πληροφορίες για την ιλύ από εργαστηριακό χωνευτήριο είναι διαθέσιμες σε άλλο σημείο (11). Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί προσαρμοσμένο εμβόλιο, να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης ιλύος χώνευσης από εγκατάσταση επεξεργασίας βιομηχανικών λυμάτων. Πρέπει να χρησιμοποιούνται φιάλες με μεγάλο στόμιο από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ή παρόμοιο υλικό, που μπορεί να διασταλεί, για τη συλλογή ιλύος. Στις φιάλες δείγματος προστίθεται ιλύς ώστε να γεμίσουν έως 1 cm από το πάνω μέρος των φιαλών, σφραγίζονται καλά, κατά προτίμηση με βαλβίδα ασφαλείας [σημείο 12 στοιχείο ε)] και τοποθετούνται σε μονωμένους περιέκτες [σημείο 12 στοιχείο δ)], ώστε να ελαχιστοποιηθεί το θερμικό πλήγμα, έως ότου μεταφερθούν σε επωαστήρα που διατηρεί τη θερμοκρασία στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Κατά το άνοιγμα των φιαλών, πρέπει να εκτονωθεί η υπερβολική πίεση είτε με προσεκτικό άνοιγμα του σφραγίσματος είτε μέσω της τριοδικής βαλβίδας εκτόνωσης της πίεσης [σημείο 12 στοιχείο ε)]. Είναι προτιμητέο να χρησιμοποιηθεί η ιλύς εντός λίγων ωρών από τη συλλογή της, διαφορετικά αποθηκεύεται στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ κάτω από υπερκείμενο χώρο αζώτου επί 3 το πολύ ημέρες, όταν κανονικά η απώλεια δραστηριότητας είναι μικρή.

Προσοχή — Η ιλύς χώνευσης παράγει εύφλεκτα αέρια τα οποία ενέχουν κίνδυνο πρόκλησης πυρκαγιάς και έκρηξης: περιέχει επίσης δυνητικά παθογόνους οργανισμούς, γι' αυτόν τον λόγο πρέπει να λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό της ιλύος. Για λόγους ασφαλείας, δεν χρησιμοποιούνται γυάλινα δοχεία για τη συλλογή της ιλύος.

Εμβόλιο

- Ακριβώς πριν από τη χρήση, η ιλύς αναδεύεται απαλά και μεταγγίζεται με τη βοήθεια κόσκινου με βροχίδες διαμέτρου 1 mm² [σημείο 12 στοιχείο στ)] σε κατάλληλη φιάλη [σημείο 12 στοιχείο ζ)] διαμέσου του υπερκείμενου χώρου από όπου διοχετεύεται ατμός αζώτου. Μένει κατά μέρος ένα δείγμα για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των συνολικών ξηρών στερεών (βλ. π.χ. το ISO 11 923 (13) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ). Γενικά, η ιλύς χρησιμοποιείται χωρίς αραίωση. Η συγκέντρωση στερεών είναι συνήθως μεταξύ 2 % και 4 % (w/v). Προσδιορίζεται η τιμή pH και, εφόσον χρειάζεται, ρυθμίζεται στο $7 \pm 0,5$.

Υπόστρωμα δοκιμής

- Διαλύονται 10 g θρεπτικού ζωμού (π.χ. Oxoid), 10 g εκχυλίσματος ζυμομυκήτων και 10 g D-γλυκόζης σε απιονισμένο νερό και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα αποστειρώνεται με διηθητική μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,2 μm [σημείο 12 στοιχείο η)] και χρησιμοποιείται αμέσως ή αποθηκεύεται στους 4 °C για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μίας ημέρας.

Υπό δοκιμή χημική ουσία

- Ετοιμάζεται ξεχωριστό διάλυμα παρακαταθήκης για κάθε υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία που θα περιέχει, για παράδειγμα, 10 g/l της χημικής ουσίας στο αποξυγονωμένο νερό αραίωσης (σημείο 14). Με τους κατάλληλους όγκους αυτών των διαλυμάτων παρακαταθήκης ετοιμάζονται τα μείγματα της αντίδρασης που περιέχουν συγκεντρώσεις αναλυτικής ποιότητας. Εναλλακτικά, ετοιμάζεται γεωμετρική σειρά αραιώσεων από κάθε διάλυμα αραίωσης, ώστε ο όγκος που προστίθεται στις φιάλες δοκιμής να είναι ο ίδιος για κάθε απαιτούμενη τελική συγκέντρωση. Το pH των διαλυμάτων παρακαταθήκης θα πρέπει να ρυθμίζεται σε $7 \pm 0,2$, αν χρειαστεί.

19. Για τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες που δεν είναι επαρκώς υδατοδιαλυτές, γίνεται παραπομπή στο πρότυπο ISO 10 634 (12) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ. Αν πρέπει να χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης, να αποφεύγονται διαλύτες όπως χλωροφόρμιο και τετραχλωράνθρακας, που είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή μεθανίου. Ετοιμάζεται διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης υδατοδιαλυτής ουσίας σε κατάλληλο πτητικό διαλύτη, για παράδειγμα ακετόνη, διαιθυλεθέρα. Οι απαιτούμενοι όγκοι από το διάλυμα με τον διαλύτη προστίθενται στις άδειες φιάλες δοκιμής (σημείο 12 στοιχείο β)] και ο διαλύτης εξατμίζεται πριν από την προσθήκη της ιλύος. Για άλλες αγωγές χρησιμοποιείται το ISO 10 634 (12) ή ισοδύναμο πρότυπο της ΕΕ, αλλά ως γνωστόν τυχόν επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτωμάτων μπορεί να αναστέλλουν την αναερόβια παραγωγή αερίων. Αν θεωρηθεί ότι η παρουσία οργανικών διαλυτών και γαλακτωματοποιητών προκαλεί σφάλματα τεχνικής, η υπό δοκιμή χημική ουσία θα μπορούσε να προστεθεί απευθείας στο μείγμα δοκιμής ως σκόνη ή υγρό. Οι πτητικές ουσίες και οι υδατοδιαλυτές υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες μπορούν να εγχυθούν σε φιάλες εμβολιασμένου ορού, με χρήση μικροσύριγγας [σημείο 12 στοιχείο θ)].
20. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες προστίθενται στις φιάλες για να προκύψει γεωμετρική σειρά συγκεντρώσεων, για παράδειγμα, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l και 15,6 mg/l. Αν το εύρος τιμών τοξικότητας δεν είναι γνωστό από παρόμοιες χημικές ουσίες, πρώτα διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή για τον προσδιορισμό του εύρους τιμών με συγκεντρώσεις 1 000 mg/l, 100 mg/l και 10 mg/l, ώστε να επιβεβαιωθεί το κατάλληλο εύρος.

Χημική ουσία αναφοράς

21. Ετοιμάζεται υδατικό διάλυμα με 3,5-διχλωροφαινόλη (10 g/l) με τη σταδιακή προσθήκη της ελάχιστης ποσότητας 5 ml/l διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου στο στερεό και αναδεύεται έως ότου πραγματοποιηθεί η διάλυση. Στη συνέχεια προστίθεται αποξυγονωμένο νερό αραιώσης (σημείο 14) έως τον απαιτούμενο όγκο· η εφαρμογή ηχητικών κυμάτων μπορεί να βοηθήσει στη διάλυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες χημικές ουσίες αναφοράς όταν το μέσο εύρος τιμών της EC₅₀ έχει αποκτηθεί από τουλάχιστον τρεις δοκιμές με διαφορετικά ενοφθαλμίσματα (διαφορετική προέλευση ή διαφορετικός χρόνος συλλογής).

ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ/ΣΦΑΛΜΑΤΑ

22. Ορισμένα συστατικά της ιλύος εικάζεται ότι μπορεί να αντιδρούν με δυνητικούς αναστολείς, οπότε καθίστανται μη διαθέσιμα σε μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα χαμηλότερη ή καθόλου αναστολή. Επίσης, αν η ιλύς περιέχει ήδη χημική ουσία που είναι ανασταλτική, θα εξαχθούν εσφαλμένα αποτελέσματα κατά την υποβολή της ουσίας σε δοκιμή. Εκτός απ' αυτές τις δυνατότητες, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Αυτά παρατίθενται στο προσάρτημα 3, μαζί με τις μεθόδους για την εξάλειψη ή τουλάχιστον τη μείωση των σφαλμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

23. Ο αριθμός των αναγκαίων επαναλήψεων εξαρτάται από τον βαθμό της απαιτούμενης ακρίβειας για τους δείκτες αναστολής. Αν τα πώματα των φιαλών είναι αρκούτσως αεροστεγή σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, ετοιμάζεται μία παρτίδα δοκιμαστικών φιαλών (τουλάχιστον τρεις) για κάθε απαιτούμενη συγκέντρωση. Παράλληλα, ετοιμάζεται μία παρτίδα από φιάλες με την ουσία αναφοράς και μία παρτίδα με μάρτυρες. Ωστόσο, αν τα πώματα των φιαλών είναι αειόπιστα για μία μόνο ή λίγες διατρήσεις, ετοιμάζεται μια παρτίδα (π.χ. τρεις επαναλήψεις) των φιαλών δοκιμής για κάθε διάστημα (t) για τις οποίες απαιτούνται αποτελέσματα για όλες τις συγκεντρώσεις μια υπό δοκιμή χημικής ουσίας προς δοκιμή. Επίσης, ετοιμάζονται παρτίδες "t" των φιαλών για τη χημική ουσία αναφοράς και για τους μάρτυρες.
24. Συνιστάται η χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box) [σημείο 12 στοιχείο ι)]. Τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την έναρξη της δοκιμής, διοχετεύεται αέριο άζωτο με τη χρήση κιβωτίου με γάντια που περιέχει όλο τον αναγκαίο εξοπλισμό. Εξασφαλίζεται ότι η θερμοκρασία της ιλύος είναι μεταξύ 35 °C ± 2 °C κατά τον χειρισμό και τη σφράγιση των φιαλών.

Προκαταρκτική δοκιμή

25. Αν η δραστηριότητα της ιλύος δεν είναι γνωστή, συνιστάται να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή. Ετοιμάζονται μάρτυρες για την παραγωγή, για παράδειγμα, συγκεντρώσεων στερεών των 10 g/l, 20 g/l και 40 g/l συν το υπόστρωμα αλλά χωρίς υπό δοκιμή χημική ουσία. Επίσης, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί όγκοι του μείγματος αντίδρασης, ώστε να υπάρξουν τρεις ή τέσσερις αναλογίες όγκου υπερκείμενου χώρου προς όγκο υγρού. Από τα αποτελέσματα των όγκων αερίου που παράγονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, οι πλέον κατάλληλες συνθήκες που επιτρέπουν δύο μετρήσεις ημερησίως χαρακτηρίζονται από σημαντικούς όγκους αερίου και ελευθέρωση πίεσης ανά ημέρα με τη βέλτιστη ευαισθησία ⁽¹⁾ χωρίς τον κίνδυνο εκρήξεων.

⁽¹⁾ Αυτό ισχύει για την πειραματική διάταξη και τις πειραματικές συνθήκες όπου μπορούν να εκτιμηθούν με αποδεκτά περιθώρια σφάλματος οι όγκοι του παραγόμενου αερίου — από τυφλά και από δοχεία με ένδειξη αναστολής 70 - 80 %.

Προσθήκη των υπό δοκιμή ουσιών

26. Υδατοδιαλυτές υπό δοκιμή χημικές ουσίες [σημείο 12 στοιχείο β)] προστίθενται ως υδατικά διαλύματα (σημείο 18). Χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τριπλά σετ φιαλών για κάθε εύρος συγκεντρώσεων (σημείο 20). Στην περίπτωση αδιάλυτων και δυσδιάλυτων υπό δοκιμή χημικών ουσιών, διαλύματά τους χορηγούνται σε οργανικούς διαλύτες με τη χρήση μικροσύριγγας σε άδειες φιάλες ώστε να προκύψουν πανομοιότυπα σετ για καθένα από τις πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ο διαλύτης εξατμίζεται με ψεκασμό με αέριο άζωτο στην επιφάνεια των διαλυμάτων στις φιάλες δοκιμής. Εναλλακτικά, προστίθενται αδιάλυτες ουσίες σε στερεά μορφή ως σταθμισμένες ποσότητες του στερεού απευθείας στις φιάλες δοκιμής.
27. Αν δεν προστεθούν αδιάλυτες και δυσδιάλυτες υδατοδιαλυτές υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες με τη χρήση διαλύτη, να προστεθούν απευθείας με μικροσύριγγα στις φιάλες δοκιμής μετά την προσθήκη εμβολίου και υποστρώματος δοκιμής (βλ. σημείο 30). Με τον ίδιο τρόπο μπορούν να προστεθούν πτητικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες.

Προσθήκη εμβολίου και υποστρώματος

28. Πραγματοποιείται ανάδευση του κατάλληλου όγκου ιλύος χώνευσης που έχει περάσει από κόσκινο (βλ. σημείο 16) σε φιάλη 5 λίτρων [σημείο 12 στοιχείο ζ)], ενώ διοχετεύεται ρεύμα αερίου αζώτου διαμέσου του υπερκείμενου χώρου. Εκπλένονται οι δοκιμαστικές φιάλες, που περιέχουν υδατικά διαλύματα ή τα εξατμισθέντα διαλύματα των υπό δοκιμή χημικών ουσιών με τον διαλύτη, με τη διοχέτευση ρεύματος αερίου αζώτου, επί περίπου δύο λεπτά για την αφαίρεση του αέρος. Γνωστά κλάσματα, π.χ. 100 ml, της καλά αναμειγμένης ιλύος κατανέμονται σε δοκιμαστικές φιάλες με τη χρήση ευρύστομου σιφώνιου ή ογκομετρικού κυλίνδρου. Το σιφώνιο πρέπει να γεμίσει με μία κίνηση για την εξαγωγή του όγκου της απαιτούμενης ιλύος επειδή καθιζάνουν εύκολα τα στερεά της ιλύος. Αν λαμβάνεται περισσότερο, το σιφώνιο αδειάζει και γίνεται εκ νέου εκκίνηση.
29. Στη συνέχεια προστίθεται επαρκές διάλυμα υποστρώματος (σημείο 17), ώστε να υπάρξει συγκέντρωση 2 g/l για κάθε θρεπτικό ζώμο, εκχύλισμα ζυμομυκήτων και γλυκόζης-D στο μείγμα, όσο συνεχίζεται ο καταιονισμός με άζωτο. Ακολουθεί κατωτέρω παράδειγμα για παρτίδες δοκιμής.

| Τελική κατά μάζα συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στις φιάλες δοκιμής (mg/l) | Όγκος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml) | | Αντιδραστήρια και θρεπτικά μέσα (ml) | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------|
| | Διάλυμα παρακαταθήκης α) 10 g/l σημείο 18 | Διάλυμα παρακαταθήκης β) 1 g/l σημείο 18 | Νερό αραίωσης σημείο 14 | Εμβόλιο σημείο 16 | Υπόστρωμα σημείο 17 |
| 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 |

Συνολικός όγκος = 160 ml. Όγκος υγρού = 103 ml

Όγκος αερίου = 57 ml, ή 35,6 % συνολικού όγκου.

30. Παρομοίως εκπλένονται οι άδειες δοκιμαστικές φιάλες με αέριο άζωτο, ώστε να καθαρίσουν από τυχόν πτητικές και αδιάλυτες υγρές υπό δοκιμή χημικές ουσίες (βλ. σημείο 27).

Μάρτυρες και χημική ουσία αναφοράς

31. Ετοιμάζονται τουλάχιστον τρία σετ φιαλών που περιέχουν μόνο ιλύ και υπόστρωμα ως μάρτυρες. Ετοιμάζονται και άλλες φιάλες επαναλήψεων που περιέχουν ιλύ και υπόστρωμα μαζί με επαρκή ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης της ουσίας αναφοράς, 3,5-διχλωροφαινόλη (σημείο 21), ώστε να δημιουργηθεί τελική συγκέντρωση 150 mg/l. Η εν λόγω συγκέντρωση θα πρέπει να αναστείλει την παραγωγή αερίου κατά 50 % περίπου. Εναλλακτικά, ετοιμάζεται εύρος συγκεντρώσεων της ουσίας αναφοράς. Ετοιμάζονται επίσης, για τη μέτρηση του pH, τέσσερις επιπλέον φιάλες που περιέχουν ιλύ, αποξυγονωμένο νερό και υπόστρωμα. Η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται στις δύο φιάλες στην ανώτατη συγκέντρωση που δοκιμάζεται και προστίθεται αποξυγονωμένο νερό στις υπόλοιπες δύο φιάλες.

32. Εξασφαλίζεται ότι όλες οι φιάλες –ουσίες δοκιμής και αναφοράς και οι μάρτυρες– περιέχουν τον ίδιο όγκο υγρού (V_R) όπου χρειαστεί, προσθέτετε απιονισμένο νερό (σημείο 14) από το οποίο έχει αφαιρεθεί το οξυγόνο για να συμπληρωθεί ο όγκος. Ο υπερκείμενος χώρος θα πρέπει να είναι μεταξύ 10 % και 40 % του όγκου της φιάλης, η δε πραγματική τιμή επιλέγεται από τα δεδομένα που προκύπτουν από την προκαταρκτική δοκιμή. Αφού προστεθούν όλα τα συστατικά στις φιάλες, αφαιρείται η βελόνα που διοχετεύει το αέριο και σφραγίζεται κάθε φιάλη με πώμα από καουτσούκ και κεφαλή αλουμινίου [σημείο 12 στοιχείο β)], ενώ το πώμα σφραγίζεται με μια σταγόνα απιονισμένου νερού ώστε να διευκολυνθεί η εισδοχή του. Ανακινείται το περιεχόμενο κάθε φιάλης ώστε να αναμειχθεί.

Επώαση φιαλών

33. Οι φιάλες μεταφέρονται σε θερμοστατούμενο επωαστήριο, κατά προτίμηση εξοπλισμένο με τάρακτρο και διατηρούνται στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι φιάλες επωάζονται στο σκοτάδι. Ύστερα από μια ώρα περίπου, εξισορροπείται η πίεση στις φιάλες με την ατμοσφαιρική πίεση με την εισαγωγή βελόνας σύριγγας, που έχει συνδεθεί με τον μετρητή πίεσης [σημείο 12 στοιχείο γ)], διαμέσου του πώματος κάθε φιάλης, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος η βαλβίδα κλείνεται. Η βελόνα θα πρέπει να εισαχθεί με κλίση περίπου 45° , ώστε να μην υπάρχει διαρροή αερίου από τις φιάλες. Αν οι φιάλες επωαστούν χωρίς δυνατότητα ανακίνησης, η ανακίνηση γίνεται χειροκίνητα δύο φορές καθημερινώς κατά τη διάρκεια της συνολικής περιόδου επώασης για εξισορρόπηση του συστήματος. Οι φιάλες επωάζονται και ανατρέπονται ώστε να μην υπάρχει απώλεια αερίου διαμέσου του πώματος. Η ανατροπή, ωστόσο, δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες αδιάλυτες υπό δοκιμή ουσίες μπορεί να κολλήσουν στο κάτω μέρος της φιάλης.

Μέτρηση πίεσης

34. Όταν οι φιάλες φτάσουν σε θερμοκρασία $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, το pH του περιεχομένου των δύο από τις τέσσερις φιάλες που έχουν ετοιμαστεί για τον σκοπό αυτό μετριέται και καταγράφεται, και το περιεχόμενο απορρίπτεται· συνεχίζεται η επώαση των υπόλοιπων φιαλών στο σκοτάδι. Η πίεση στις φιάλες μετριέται και καταγράφεται δύο φορές ημερησίως για τις επόμενες 48 έως 72 ώρες με την εισαγωγή της βελόνας του μετρητή πίεσης διαμέσου του σφραγίσματος κάθε φιάλης, η μία μετά την άλλη με τη σειρά, και η βελόνα στεγνώνεται ανάμεσα στις μετρήσεις. Όλα τα τμήματα της φιάλης διατηρούνται σε θερμοκρασία επώασης κατά τη διάρκεια της μέτρησης, που θα πρέπει να διεξάγεται όσο το δυνατόν ταχύτερα. Η μέτρηση πρέπει να σταθεροποιηθεί και να καταγραφεί. Μετά η βαλβίδα αερισμού ανοίγεται και κλείνεται όταν η ένδειξη της πίεσης είναι μηδέν. Η δοκιμή συνεχίζεται συνήθως επί 48 ώρες από τη στιγμή της πρώτης εξισορρόπησης της πίεσης, που ονομάζεται “χρόνος 0”. Ο αριθμός των αναγνώσεων και των αερισμών θα πρέπει να είναι περιορισμένος για τις πτητικές ουσίες σε μία (στο τέλος της επώασης) ή σε δύο ώστε να ελαχιστοποιείται η απώλεια της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (10).
35. Αν η ανάγνωση της πίεσης είναι αρνητική, η βαλβίδα πρέπει να παραμείνει κλειστή. Ενίοτε συγκεντρώνεται υγρασία στη σύριγγα και στη βελόνα της, η οποία αναγιγνώσκεται ως μικρή αρνητική πίεση. Στην περίπτωση αυτή, η βελόνα αφαιρείται, η σύριγγα ανακινείται, σκουπίζεται με πανί και τοποθετείται νέα βελόνα.

Μέτρηση του pH

36. Μέτρηση και καταγραφή του pH του περιεχομένου κάθε φιάλης μετά την τελική μέτρηση της πίεσης.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκφραση των αποτελεσμάτων

37. Υπολογίζεται το άθροισμα και ο μέσος όρος των πιέσεων που καταγράφονται σε κάθε διάστημα για κάθε σετ φιαλών επανάληψης και υπολογίζεται η μέση αθροιστική ολική πίεση αερίου σε κάθε χρονικό διάστημα για κάθε σετ επαναλήψεων. Σχεδιάζονται τα διαγράμματα των μέσων αθροιστικών τιμών παραγωγής αερίου (P_a) συναρτήσει μαρτύρων, φιαλών δοκιμής και φιαλών αναφοράς. Επιλέγεται ένα χρονικό σημείο στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης, συνήθως 48 ώρες, και υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής (I) για κάθε συγκέντρωση με την εξίσωση [1]:

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

όπου

I = ποσοστό αναστολής σε %·

P_i = αέριο που παράγεται με υλικό δοκιμής στον επιλεγέντα χρόνο, σε Pascal (Pa)·

P_c = αέριο που παράγεται στον μάρτυρα στον ίδιο χρόνο, σε Pascal (Pa).

Συνιστάται να χαράσσονται και οι δύο καμπύλες, δηλ. η καμπύλη I συναρτήσει της συγκέντρωσης και επίσης του λογαρίθμου της συγκέντρωσης, έτσι ώστε να μπορεί να επιλεγεί η καμπύλη που είναι εγγύτερα στη γραμμικότητα. Η τιμή EC_{50} (mg/l) αξιολογείται οπτικά ή με ανάλυση παλινδρόμησης από την καμπύλη που είναι εγγύτερα στη γραμμικότητα. Για σκοπούς σύγκρισης μπορεί να είναι πιο χρήσιμο να εκφραστεί η συγκέντρωση της χημικής ουσίας ως mg χημικής ουσίας/g συνολικών ξηρών στερεών. Για να αποκτηθεί η συγκέντρωση αυτή, διαρρέεται η ογκομετρική συγκέντρωση (mg/l) διά της ογκομετρικής συγκέντρωσης στερεών ξηράς ιλύος (g/l) (σημείο 16).

38. Υπολογίζεται είτε το ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται μόνο με τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας αναφοράς που χρησιμοποιείται ή την EC_{50} , αν έχει διερευνηθεί επαρκής αριθμός συγκεντρώσεων.
39. Μετατρέπεται η μέση πίεση του αερίου που παράγεται στον μάρτυρα P_c (Pa) σε όγκο με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης του μετρητή πίεσης (προσάρτημα 2) και από αυτό υπολογίζεται η απόδοση του αερίου, εκφραζόμενη ως ο παραγόμενος σε 48 ώρες όγκος από 100 ml αναραιωτής ιλύος σε συγκέντρωση στερεών 2 % (20 g/l) έως 4 % (40 g/l).

Κριτήρια εγκυρότητας

40. Τα αποτελέσματα από τη διεργαστηριακή δοκιμή ISO (5) έδειξαν ότι η ουσία αναφοράς (3,5-διχλωροφαινόλη) προξένησε αναστολή 50 % της παραγωγής αερίου σε εύρος συγκεντρώσεων από 32 mg/l έως 510 mg/l μέσου 153 mg/l (σημείο 10). Το εύρος αυτό είναι τόσο μεγάλο που δεν μπορούν να τεθούν αυστηρά όρια για την αναστολή ως κριτήρια εγκυρότητας· αυτό θα πρέπει να είναι δυνατό όταν χάρη στην τεχνολογία παραχθούν εμβόλια που παρουσιάζουν μικρότερες διακυμάνσεις. Οι όγκοι του αερίου που παράγεται στις φιάλες δοκιμής σε 48 ώρες κυμαίνονται από 21 ml/g ξηράς ουσίας ιλύος σε 149 ml/g (μέση τιμή 72 ml/g). Δεν υπήρξε προφανής σχέση μεταξύ του όγκου του παραγόμενου αερίου και της αντίστοιχης τιμής EC_{50} . Το τελικό pH κυμαίνεται μεταξύ 6,1 και 7,5.
41. Η δοκιμή θεωρείται έγκυρη όταν η αναστολή είναι μεγαλύτερη από 20 % στον μάρτυρα αναφοράς και περιέχει 150 mg/l 3,5-διχλωροφαινόλης, πάνω από 50 ml αερίου ανά γραμμάριο ξηράς ύλης παράγεται στον τυφλό μάρτυρα και η τιμή του pH είναι μεταξύ 6,2 και 7,5 στο τέλος της δοκιμής.

Έκθεση δοκιμής

42. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

- κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες·
- καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής

- όγκος του υπερκείμενου χώρου και του υγρού περιεχομένου στα δοχεία δοκιμής·
- περιγραφή των δοχείων της δοκιμής και μέτρηση του αερίου (π.χ. είδος μετρητή πίεσης)·
- εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και της χημικής ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής, συγκεντρώσεις δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν και χρήση διαλυτών·
- στοιχεία του εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε: επωνυμία της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, περιγραφή της πηγής των λυμάτων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία (π.χ. θερμοκρασία λειτουργίας, χρόνος κατακράτησης ιλύος, οικιακά λύματα που κυριαρχούσαν ή βιομηχανικά απόβλητα κ.λπ.), συγκέντρωση στερεών, δραστηριότητα παραγωγής αερίου από το χωνευτήριο της αναερόβιας χώνευσης, προηγούμενη έκθεση ή ενδεχόμενη προσαρμογή ή σε τοξικά χημικά ή τόπο συλλογής της ιλύος, των ιζημάτων κ.λπ.·
- θερμοκρασία επώασης και εύρος τιμών·
- αριθμός επαναλήψεων.

Αποτελέσματα

- τιμές pH στο τέλος της δοκιμής·
- όλα τα μετρηθέντα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν στη δοκιμή, δοχεία τυφλού και υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναφοράς, ανάλογα με την περίπτωση σε πίνακα (π.χ. πίεση σε Pa ή millibars)·
- ποσοστιαία αναστολή σε φιάλες δοκιμής και αναφοράς και καμπύλες συγκέντρωσης-αναστολής·
- υπολογισμός τιμών EC₅₀, εκφραζόμενες ως mg/l και mg/g·
- παραγωγή αερίου ανά γραμμάριο ιλύος σε 48 ώρες·
- αιτιολογία τυχόν απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών·
- συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων τυχόν αποκλίσεων από τις διαδικασίες στην εν λόγω μέθοδο δοκιμής και συζήτηση τυχόν αποκλίσεων στα αποτελέσματα των δοκιμών λόγω παρεμβολών και σφαλμάτων που θα μπορούσαν να αναμένονται·
- εξετάζεται, επίσης, κατά πόσον ο σκοπός της δοκιμής ήταν η μέτρηση της τοξικότητας σε οργανισμούς που είχαν υποβληθεί ή δεν είχαν υποβληθεί σε προέκθεση.

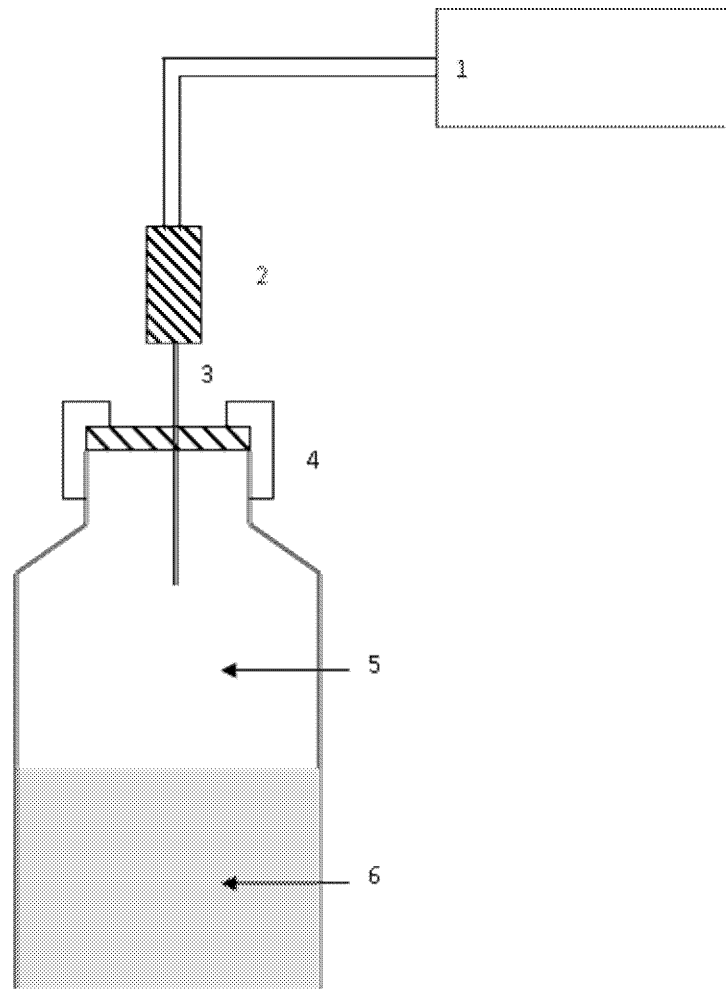
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Ενεργοποιημένη ιλύς, δοκιμή αναστολής της αναπνοής.
- (2) Κεφάλαιο Γ.43 του παρόντος παραρτήματος: Αναερόβια βιοαποικοδομησιμότητα οργανικών ουσιών σε χωνευμένη ιλύ: μέσω μέτρησης της παραγωγής αερίων.
- (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.
-

Προσάρτημα 1

Παράδειγμα συσκευής για τη μέτρησή τη παράγωγης βιοαερίου με πίεσή αέριου



Υπόμνημα:

- 1 — μετρητής πίεσης
- 2 — τριοδική αεροστεγής βαλβίδα
- 3 — βελόνα σύριγγας
- 4 — αεροστεγής σφράγιση (πώμα και διάφραγμα)
- 5 — υπερκείμενος χώρος
- 6 — εμβόλιο χωνευμένης ιλύος

Δοχεία δοκιμής σε περιβάλλον $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Προσάρτημα 2

Μετατροπή του μετρητή πίεσης

Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μπορεί να σχετίζονται με τους όγκους αερίου μέσω μιας πρότυπης καμπύλης και από αυτό μπορεί να υπολογιστεί ο όγκος αερίου που παράγεται ανά γραμμάριο ξηράς ιλύος ανά 48 ώρες. Αυτός ο δείκτης δραστηριότητας χρησιμοποιείται ως ένα από τα κριτήρια με τα οποία αξιολογείται η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Η καμπύλη βαθμονόμησης παράγεται με την έγχυση γνωστών όγκων αερίου στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε φιάλες ορού που περιέχουν όγκο νερού ίσο με τον όγκο του μείγματος αντίδρασης, V_R .

- Σε πέντε φιάλες ορού κατανέμονται V_R ml κλάσματα νερού, που διατηρούνται σε θερμοκρασία $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι φιάλες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ επί 1 ώρα για εξισορρόπηση.
- Ενεργοποιείται ο μετρητής πίεσης, αφήνεται να σταθεροποιηθεί και προσαρμόζεται στο μηδέν.
- Η βελόνα της σύριγγας εισάγεται διαμέσου του σφραγίσματος μιας από τις φιάλες, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος κλείνεται η βαλβίδα.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τις λοιπές φιάλες.
- Χορηγείται 1 ml αέρα σε $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε κάθε φιάλη. Η βελόνα εισάγεται (στον μετρητή) διαμέσου του σφραγίσματος μιας από τις φιάλες έως ότου η ένδειξη σταθεροποιηθεί. Η πίεση καταγράφεται, η βαλβίδα ανοίγεται έως ότου ο μετρητής πίεσης δείξει μηδέν και τέλος κλείνεται η βαλβίδα.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τις λοιπές φιάλες.
- Όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml και 50 ml αέρος.
- Σχεδιάζεται καμπύλη μετατροπής της πίεσης (Pa) συναρτήσει του εγχυόμενου όγκου αερίου (ml). Η απόκριση του οργάνου είναι γραμμική στην περιοχή που περιλαμβάνεται από 0 Pa έως 70 000 Pa, και για παραγωγή αερίου από 0 ml έως 50 ml.

Προσάρτημα 3

Παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα

α) Ποιότητα των πωμάτων των φιαλών

Στο εμπόριο διατίθενται διάφοροι τύποι διαφραγμάτων για τις φιάλες ορού· πολλά από αυτά, συμπεριλαμβανομένων αυτών από βουτυλοκαουτσούκ, παύουν να είναι στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα υπό τις συνθήκες της δοκιμής αυτής. Μερικές φορές η πίεση ελαττώνεται πολύ αργά, μόλις το διάφραγμα τρυπηθεί με τη βελόνα σύριγγας. Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος, ώστε να αποφευχθούν οι διαρροές [σημείο 12 στοιχείο β)].

β) Υγρασία στη βελόνα της σύριγγας

Ενίοτε συγκεντρώνεται υγρασία στη σύριγγα και στη βελόνα της, η οποία αναγιγνώσκεται ως μικρή αρνητική πίεση. Στην περίπτωση αυτή, η βελόνα αφαιρείται, η σύριγγα ανακινείται, σκουπίζεται με πανί και τοποθετείται νέα βελόνα [σημείο 12 στοιχείο γ) και σημείο 35].

γ) Επιμόλυνση από οξυγόνο

Οι αναερόβιες μέθοδοι υπόκεινται σε σφάλμα λόγω επιμόλυνσης από οξυγόνο που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη παραγωγή αερίου. Στην εν λόγω μέθοδο, αυτή η πιθανότητα θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με τη χρήση αυστηρώς αναερόβιων τεχνικών, όπως η χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box).

δ) Μικτά υποστρώματα στην ιλύ

Η αναερόβια παραγωγή αερίου και η ευαισθησία της ιλύος επηρεάζονται από υποστρώματα που μεταφέρονται με το εμβόλιο στις φιάλες δοκιμής. Η χωνευμένη ιλύς από οικιακούς χωνευτήρια αναερόβιας χώνευσης περιέχει συχνά αναγνωρίσιμα υλικά όπως τρίχες και φυτικά υπολείμματα κυτταρίνης, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων. Με το κοσκίνισμα της ιλύος μπορούν να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες ύλες, οπότε το δείγμα γίνεται πιο αντιπροσωπευτικό (σημείο 16).

ε) Πτητικές χημικές ουσίες

Οι υπό δοκιμή πτητικές χημικές ουσίες θα απελευθερωθούν στον υπερκείμενο χώρο των φιαλών δοκιμής. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ορισμένων υλών από το σύστημα κατά την εξαέρωση μετά τις μετρήσεις της πίεσης με αποτέλεσμα να εξάγονται εσφαλμένες υψηλές τιμές EC_{50} . Με την κατάλληλη επιλογή αναλογίας όγκου υπερκείμενου χώρου προς όγκο υγρού και με την εξαέρωση μετά τις μετρήσεις της πίεσης, το σφάλμα μπορεί να μειωθεί (10).

στ) Μη γραμμικότητα της παραγωγής αερίου

Αν το σχεδιάγραμμα της μέσης αθροιστικής παραγωγής αερίου συναρτήσει του χρόνου επώασης δεν είναι κατά προσέγγιση γραμμικό την περίοδο των 48 ωρών, η ακρίβεια της δοκιμής ελαττώνεται. Για να ξεπεραστεί αυτό, ενδείκνυται ίσως να χρησιμοποιηθεί χωνευμένη ιλύς από διαφορετική πηγή και/ή να αυξηθεί η συγκέντρωση του θρεπτικού ζωμού-υποστρώματος δοκιμής, του εχχυλίσματος ζυμομυκήτων και της γλυκόζης (σημείο 29).

Προσάρτημα 4

Εφαρμογή σε περιβαλλοντικά δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης βιομάζας — αναερόβιες λάσπες, ιζήματα κ.λπ.

Εισαγωγή

- A.1 Γενικά, η συγκεκριμένη μικροβιακή δραστηριότητα (όγκος του παραγόμενου αερίου ανά γραμμάριο ξηρών στερεών) που παρουσιάζουν αναερόβιες λάσπες που απαντούν στη φύση, ιζήματα, χώματα κ.λπ. είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της αναερόβιας ιλύος που προέρχεται από τα λύματα. Λόγω αυτού, όταν πρέπει να μετρηθούν οι ανασταλτικές συνέπειες των χημικών ουσιών στα λιγότερο ενεργά δείγματα πρέπει να τροποποιούνται μερικές από τις πειραματικές συνθήκες. Για τα εν λόγω λιγότερο ενεργά δείγματα, δύο προσεγγίσεις είναι δυνατές:
- α) να διεξάγεται τροποποιημένη προκαταρκτική δοκιμή (σημείο 25) με το μη αραιωμένο δείγμα ιλύος, εδάφους κ.λπ. στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή στη θερμοκρασία που επικρατεί στον τόπο συλλογής του δείγματος, για ακριβέστερη προσομοίωση (όπως στο μέρος 1 του ISO 13 641).
- β) ή να εκτελείται η δοκιμή με αραιωμένη ιλύ χώνευσης (1 σε 100) ώστε να προσομοιώνεται η χαμηλή ενεργότητα που αναμένεται από το δείγμα περιβάλλοντος, αλλά η θερμοκρασία να διατηρείται στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (όπως στο μέρος 2 του ISO 13 641).
- A.2 Η επιλογή α) μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο που περιγράφεται εδώ (ισοδύναμη με το μέρος 1 του ISO 13 641), αλλά πρέπει να διεξάγεται προκαταρκτική δοκιμή (σημείο 25), ώστε να διασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες, εκτός αν αυτές είναι ήδη γνωστές από προηγούμενες δοκιμές. Το δείγμα ιλύος ή ιζήματος πρέπει να αναμειγνύεται προσεκτικά, π.χ. σε αναμεικτική και, αν χρειαστεί, να αραιώνεται με μικρή αναλογία εξαερισμένου νερού αραίωσης (σημείο 14), ώστε να μπορεί εύκολα να μετακινείται με ευρύστομο σιφώνιο ή ογκομετρικό κύλινδρο. Αν θεωρηθεί ότι μπορεί να λείπουν θρεπτικά στοιχεία, το δείγμα ιλύος μπορεί να φυγοκεντρηθεί (υπό αναερόβιες συνθήκες) και να γίνει εκ νέου εναιώρημα στο ανόργανο μέσο που περιέχει ζυμομύκητες (A.11).
- A.3 Επιλογή β). Αυτή μιμείται σε ικανοποιητικό βαθμό τη χαμηλή ενεργότητα περιβαλλοντικών δειγμάτων, αλλά δεν διαθέτει την υψηλή συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών που περιέχονται σ' αυτά τα δείγματα. Ο ρόλος αυτών των στερεών στην αναστολή δεν είναι γνωστός, αλλά είναι δυνατόν η αντίδραση μεταξύ των υπό δοκιμή χημικών ουσιών και των συστατικών της ιλύος, καθώς και η προσρόφηση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών από τα στερεά, να οδηγήσει σε μείωση της τοξικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.
- A.4 Η θερμοκρασία είναι άλλος ένας σημαντικός παράγοντας: για αυστηρή προσομοίωση, οι δοκιμές θα πρέπει να πραγματοποιούνται στη θερμοκρασία του δείγματος, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι διάφορες ομάδες συγκεντρώσεων μεθανογόνων βακτηρίων δραστηριοποιούνται σε διαφορετικές περιοχές τιμών θερμοκρασίας, τα θερμόφιλα ($\sim 30\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$), τα μεσόφιλα ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) και τα ψυχρόφιλα ($< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικές ανασταλτικές συμπεριφορές.
- A.5 Διάρκεια. Στη γενική δοκιμή, μέρος 1, με τη χρήση μη αραιωμένης ιλύος, η παραγωγή αερίου εντός 2-4 ημερών ήταν πάντοτε ικανοποιητική, ενώ στο μέρος 2 με αραιωμένη ένα προς εκατό ιλύ η παραγωγή αερίου ήταν ανεπαρκής, ή ανύπαρκτη, την ίδια περίοδο στη δοκιμή δακτυλίου. Οι Madsen et al (1996) υποδεικνύουν, περιγράφοντας αυτήν την τελευταία δοκιμή, ότι χρειάζονται τουλάχιστον 7 ημέρες.

Δοκιμές με χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας (Επιλογή β)

Θα πρέπει να γίνουν οι ακόλουθες αλλαγές και τροποποιήσεις και να προστεθούν ή να αντικατασταθούν ορισμένες παράγραφοι και εδάφια στο κυρίως κείμενο.

- A.6 Στην παράγραφο 6 προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις: Αρχή της δοκιμής:

“Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αραιωμένη αναερόβια ιλύ 1 προς 100, μερικώς για να γίνει προσομοίωση με τη χαμηλή ενεργότητα που έχουν λάσπες και ιζήματα. Η θερμοκρασία επώασης μπορεί να είναι είτε $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ είτε η θερμοκρασία του τόπου συλλογής του δείγματος. Επειδή η βακτηριακή δραστηριότητα είναι πολύ μικρότερη από ό,τι στην μη αραιωμένη ιλύ, η περίοδος επώασης θα πρέπει να επεκτείνεται σε 7 τουλάχιστον ημέρες.”

- A.7 Στην παράγραφο 12 στοιχείο α) προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις:

“ο επωαστήρας θα πρέπει να είναι σε θέση να λειτουργεί σε θερμοκρασίες έως $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.”

- A.8 Μετά την παράγραφο 13 προστίθεται ένα επιπλέον αντιδραστήριο:
 “Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 85 % κατά βάρος σε νερό”.
- A.9 Στο τέλος της παραγράφου 16 προστίθενται οι ακόλουθες λέξεις:
 “Χρησιμοποιείται τελική συγκέντρωση $0,20 \pm 0,05$ g/l ολικών ξηρών στερεών στη δοκιμή.”
- A.10 Παράγραφος 17. Υπόστρωμα δοκιμής
 Το υπόστρωμα αυτό δεν χρησιμοποιείται αλλά αντικαθίσταται από εκχύλισμα ζυμομυκήτων (βλέπε παραγράφους 17· A.11, A.12, A.13).
- A.11 Απαιτείται ένα ανόργανο θρεπτικό μέσο, συμπεριλαμβανομένων των ιχνοστοιχείων, για την αραιώση της αναερόβιας ιλύος, και για πρακτικούς λόγους, στο θρεπτικό μέσο προστίθεται το οργανικό υπόστρωμα, οι ζυμομυκήτες.

Μετά την παράγραφο 17 προστίθενται τα εξής:

“α) Ανόργανο θρεπτικό μέσο δοκιμής, με εκχύλισμα ζυμομυκήτων.

Παρασκευάζεται από θρεπτικό μέσο δοκιμής δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (σημείο 17 στοιχείο β)· A.12) με διάλυμα ιχνοστοιχείου (σημείο 17 στοιχείο γ)· A.13). Χρησιμοποιείται εννεαένυδρο θειούχο νάτριο που παρασκευάζεται επιτόπου [σημείο 17 στοιχείο β)· A.12] ή εκπλένεται και στεγνώνεται πριν από τη χρήση, ώστε να εξασφαλιστεί ότι υπάρχει επαρκής αναγωγική ικανότητα. Αν η δοκιμή αυτή εκτελεστεί χωρίς τη χρήση κιβωτίου χειρισμών με γάντια (glove box) [βλ. σημείος 12 στοιχείο ι)], η συγκέντρωση θειούχου νατρίου στο διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να αυξηθεί σε 2 g/l (από 1 g/l). Το θειούχο νάτριο μπορεί επίσης να προστεθεί από κατάλληλο διάλυμα παρακαταθήκης διαμέσου του πώματος των κλειστών φιαλών δοκιμής, καθώς η διαδικασία αυτή θα μειώσει τον κίνδυνο της οξείδωσης, για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση της τάξης των 0,2 g/l. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί κιτρικό τιτάνιο (III) [σημείο 17 β)]. Προστίθεται διαμέσου του πώματος των κλειστών φιαλών δοκιμής για να επιτευχθεί συγκέντρωση 0,8 mmol/l έως 1,0 mmol/l. Το κιτρικό τιτάνιο (III) είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό και χαμηλής τοξικότητας αναγωγικό, που παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύονται 2,94 g διένυδρου κιτρικού νατρίου σε 50 ml νερού αραιώσης ελεύθερου οξυγόνου (σημείο 14) (με αποτέλεσμα διάλυμα 200 mmol/l) και προστίθενται 5 ml διαλύματος χλωριούχου τιτανίου (III) (15 g/100 ml νερό αραιώσης). Εξουδετερώνεται σε pH $7 \pm 0,5$ με ανθρακικό νάτριο και εκκενώνεται σε κατάλληλη φιάλη ορού υπό ατμό αερίου αζώτου. Η συγκέντρωση του κιτρικού τιτανίου (III) στο εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης είναι 164 mmol/l. Το θρεπτικό μέσο της δοκιμής χρησιμοποιείται αμέσως ή αποθηκεύεται στους 4 °C επί 1 ημέρα το πολύ.

- A.12 β) Δέκα φορές πυκνότερο θρεπτικό μέσο δοκιμής, παρασκευάζεται ως εξής:

| | |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| άνυδρο δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) | 2,7 g |
| όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) | 4,4 g |
| (ή 11,2 g δωδεκαένυδρου) | 5,3 g |
| χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) | |
| διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 0,75 g |
| εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 1,0 g |
| τετραένυδρος χλωριούχος σίδηρος (II) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) | 0,2 g |
| resazurin (οξειδοαναγωγικός δείκτης) | 0,01 g |
| εννεαένυδρο θειούχο νάτριο ($Na_2S \cdot 9H_2O$) | 1,0 g |
| [ή κιτρικό τιτάνιο (III)] τελική συγκέντρωση | 0,8 mmol/l έως 1,0 mmol/l |
| διάλυμα ιχνοστοιχείων [βλ. σημείο 17 στοιχείο γ)· A.13] | 10,0 ml |
| εκχύλισμα ζυμομυκήτων | 100 g |
| Διαλύεται σε νερό αραιώσης (σημείο 14) και παρασκευάζεται έως: | 1 000 ml |

- A.13 γ) Διάλυμα ιχνοστοιχείων, παρασκευαζόμενο με τα εξής:

| | |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| τετραένυδρο χλωριούχο μαγγάνιο (II) ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) | 0,5 g |
| βορικό οξύ (H_3BO_3) | 0,05 g |

| | |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$) | 0,05 g |
| χλωριούχος χαλκός (II) ($CuCl_2$) | 0,03 g |
| διένυδρο μολυβδαινικό νάτριο ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) | 0,01 g |
| εξαένυδρο χλωριούχο κοβάλτιο ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) | 1,0 g |
| εξαένυδρο χλωριούχο νικέλιο ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) | 0,1 g |
| σεληνιώδες νάτριο (Na_2SeO_3) | 0,05 g |
| Διαλύεται σε νερό αραίωσης (σημείο 14) και παρασκευάζεται έως: | 1 000 ml" |

A.14 Παράγραφος 25. Προκαταρκτική δοκιμή

Είναι σημαντικό να γίνεται προκαταρκτική δοκιμή όπως περιγράφεται στο σημείο 24, αλλά η συγκέντρωση των στερεών της ιλύος θα πρέπει να είναι το ένα εκατοστό από τα προτεινόμενα, δηλ. 0,1g/l, 0,2g/l και 0,4g/l. Η διάρκεια της επώασης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 7 ημέρες.

Σημείωση: Στη δοκιμή δακτυλίου (5) ο όγκος του υπερκείμενου χώρου, που καταλάμβανε το 75 % του συνολικού όγκου ήταν πολύ μεγάλος· θα πρέπει να είναι μεταξύ του 10 % και του 40 %. Το σωστό κριτήριο είναι ότι ο όγκος του παραγόμενου αερίου στο 80 % αναστολής θα πρέπει να μετριέται με αποδεκτή ακρίβεια (π.χ. ± 5 % έως ± 10 %).

A.15 Παράγραφοι 26 έως 30: Προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, του εμβολίου και του υποστρώματος

Οι προσθήκες γίνονται με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφεται στις παραγράφους αυτές αλλά το διάλυμα υποστρώματος (σημείο 17) αντικαθίσταται από το θρεπτικό μέσο δοκιμής συν το υπόστρωμα εκχυλίματος ζυμομυκήτων (A.11).

Επίσης, η τελική συγκέντρωση στερεών ξηράς ιλύος ανάγεται από 2 g/l – 4 g/l σε $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Δύο παραδείγματα της προσθήκης συστατικών στο μείγμα δοκιμής δίνονται στον πίνακα A.1, που αντικαθιστά τον πίνακα της παραγράφου 29.

A.16 Παράγραφος 33. Επώαση φιαλών

Λόγω του αναμενόμενου χαμηλού ποσοστού παραγωγής αερίου, η επώαση διεξάγεται επί τουλάχιστον 7 ημέρες.

A.17 Παράγραφος 34. Μετρήσεις πίεσης

Η ίδια διαδικασία για τη μέτρηση της πίεσης στον υπερκείμενο χώρο των φιαλών χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται στο σημείο 34, αν οι ποσότητες απαιτηθούν στην αέρια φάση. Αν πρέπει επίσης να μετρηθούν οι συνολικές ποσότητες CO_2 συν CH_4 , το pH της υγρής φάσης ανάγεται σε pH 2 περίπου με την έγχυση H_3PO_4 σε κάθε σχετική φιάλη και μετριέται η πίεση ύστερα από 30 λεπτά με ανατάραξη στη θερμοκρασία της δοκιμής. Ωστόσο, περισσότερες πληροφορίες για την ποιότητα του εμβολίου μπορούν να αποκτηθούν με τη μέτρηση της πίεσης σε κάθε φιάλη πριν και μετά την οξίνιση. Για παράδειγμα, όταν η ταχύτητα παραγωγής CO_2 είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του μεθανίου, η ευαισθησία των ενζυματικών βακτηρίων μπορεί να μεταβληθεί και/ή τα μεθανογόνα βακτήρια να είναι τα πρώτα που θα επηρεαστούν από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

A.18 Παράγραφος 36. Μέτρηση του pH

Αν θα χρησιμοποιηθεί H_3PO_4 , θα πρέπει να προβλεφθούν ειδικά για τη μέτρηση του pH μερικές επιπλέον φιάλες, στις οποίες δεν θα προστεθεί H_3PO_4 .

Παραπομπή:

Madsen, T, Rasmussen, H.B. 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.

Πίνακας Α.1.

Παραδείγματα διάταξης της δοκιμής για παρτίδες δοκιμής

| Συστατικά μείγματος αντίδρασης | Παράδειγμα 1 | Παράδειγμα 2 | Συνήθης σειρά προσθήκης |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|-------------------------|
| Πυκνότητα του παρασκευαζόμενου εμβολίου (g/l) | 0,42 | 2,1 | — |
| Όγκος προστιθέμενου εμβολίου (ml) | 45 | 9 | 4 |
| Συγκέντρωση του εμβολίου στις φιάλες δοκιμής (g/l) | 0,20 | 0,20 | — |
| Όγκος προστιθέμενου θρεπτικού μέσου δοκιμής (ml) | 9 | 9 | 2 |
| Όγκος προστιθέμενου νερού αραίωσης (ml) | 36 | 72 | 3 |
| Συγκέντρωση του εκχυλίσματος ζυμομυκήτων στις φιάλες δοκιμής (g/l) | 9,7 | 9,7 | — |
| Όγκος του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ml) | 3 | 3 | 1 |
| Συνολικός όγκος υγρού (ml) | 93 | 93 | — |

Προσάρτημα 5

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Γ.35 Δοκιμασία τοξικότητας σε *Lumbriculus* με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 225 του ΟΟΣΑ (2007). Τα ενδοβενθικά ζώα που τρέφονται από το ιζήμα υπόκεινται σε δυνητικά υψηλή έκθεση λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης χημικών ουσιών στο ιζήμα και, συνεπώς, θα πρέπει να τους δοθεί αυξημένη προσοχή, π.χ. (1), (2), (3). Οι υδρόβιοι ολιγόχαιτοι είναι, μεταξύ των ζώων που τρέφονται από το ιζήμα, αυτοί που έχουν σημαντικό ρόλο στα ιζήματα των υδατικών συστημάτων. Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του ιζήματος και λειτουργώντας ως λεία, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των χημικών ουσιών για άλλους οργανισμούς, όπως για τα ψάρια που τρέφονται με βενθικούς οργανισμούς. Σε αντίθεση με τους επιβενθικούς οργανισμούς, οι ενδοβενθικοί υδρόβιοι ολιγόχαιτοι (π.χ. *Lumbriculus variegatus*) φωλιάζουν αμέσως στο ιζήμα και καταπίνουν σωματίδια του ιζήματος κάτω από το επιφανειακό ιζήμα. Αυτό συνεπάγεται έκθεση των οργανισμών δοκιμής στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω όλων των πιθανών οδών πρόσληψης (π.χ. επαφή με και κατάποση των επιμολυσμένων ιζηματικών σωματιδίων αλλά και μέσω του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού).
2. Αυτή η μέθοδος δοκιμών είναι σχεδιασμένη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρατεινόμενης έκθεσης των ενδοβενθικών ολιγόχαιτων *Lumbriculus variegatus* (Müller) σε χημικές ουσίες που προσροφώνται από το ιζήμα. Βασίζεται στα υφιστάμενα πρωτόκολλα δοκιμής για την τοξικότητα του ιζήματος και τη βιοσυσσώρευση, π.χ. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Η μέθοδος περιγράφεται για στατικές συνθήκες δοκιμής. Το σενάριο έκθεσης που εφαρμόζεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο εμβολιασμός του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η χρήση του εμβολιασμένου ιζήματος αποσκοπεί στην προσομοίωση ιζήματος που έχει επιμολυνθεί με την υπό δοκιμή χημική ουσία.
3. Οι χημικές ουσίες που χρειάζεται να ελέγχονται ως προς τους οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα συνήθως παραμένουν σε αυτό το διαμέρισμα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διαφόρων οδών πρόσληψης. Η σχετική σημασία κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στις συνολικές τοξικές επιδράσεις, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε χημικής ουσίας και από την εν τέλει πορεία της στο ζώο. Για ουσίες ισχυρής προσρόφησης (π.χ. με $\log K_{ow} > 5$) ή για ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Για να μην υποτιμάται η τοξικότητα τέτοιων χημικών ουσιών, η τροφή που είναι απαραίτητη για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των οργανισμών δοκιμής προστίθεται στο ιζήμα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (11). Η μέθοδος δοκιμών που περιγράφεται είναι επαρκώς λεπτομερής, ώστε κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής να είναι δυνατή η αναπροσαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού ανάλογα με τις συνθήκες στα διάφορα εργαστήρια και τα ποικίλα χαρακτηριστικά των υπό δοκιμή χημικών ουσιών.
4. Η μέθοδος δοκιμών έχει ως σκοπό να προσδιορίσει τις επιδράσεις μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγή και τη βιομάζα των οργανισμών δοκιμής. Οι μετρούμενες βιολογικές παράμετροι είναι ο ολικός αριθμός των σκωλήκων που επιβίωσαν και η βιομάζα (ξηρό βάρος) στο τέλος της έκθεσης. Τα στοιχεία αυτά αναλύονται είτε με τη χρήση μοντέλου παλινδρόμησης ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση που θα είχε επίδραση $x\%$ (π.χ. EC_{50} , EC_{25} και EC_{10}), είτε με τη χρήση δοκιμασιών στατιστικής υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC) ή της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC).
5. Το κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος “Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος” (6) παρέχει πολλά βασικά και χρήσιμα στοιχεία για την επίδοση της παρούσας μεθόδου δοκιμών για την τοξικότητα του ιζήματος. Οπότε, το εν λόγω έγγραφο χρησιμεύει ως βάση στην οποία έγινε η επεξεργασία των τροποποιήσεων που κρίνονται αναγκαίες για τη διεξαγωγή δοκιμών της τοξικότητας του ιζήματος με *Lumbriculus variegatus*. Άλλα έγγραφα στα οποία γίνεται αναφορά είναι π.χ. ο οδηγός ASTM για τον προσδιορισμό της βιοσυσσώρευσης των ιζηματικών επιμολυντών από βενθικά ασπόνδυλα (3), οι αμερικανικές μέθοδοι EPA για τη μέτρηση της τοξικότητας και της βιοσυσσώρευσης ιζηματικών επιμολυντών με ασπόνδυλα του γλυκού νερού (7) και ο οδηγός ASTM για τη συλλογή, την αποθήκευση, τον χαρακτηρισμό και τον χειρισμό ιζημάτων τοξικολογικών δοκιμασιών και για την επιλογή των δειγματοληπτών που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή βενθικών ασπόνδυλων οργανισμών (12). Επιπλέον, η πείρα που έχει αποκτηθεί κατά τις δοκιμές δακτυλίου της συγκεκριμένης μεθόδου δοκιμών [(13), έκθεση δοκιμής δακτυλίου] και η βιβλιογραφία είναι σημαντικές πηγές πληροφοριών για τη σύνταξη του παρόντος εγγράφου.

ΠΡΟΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ

6. Πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία όπως προφυλάξεις ασφάλειας, σωστές συνθήκες αποθήκευσης και αναλυτικές μέθοδοι θα πρέπει να αποκτώνται πριν από την έναρξη της μελέτης. Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (14).

7. Πριν από τη διεξαγωγή μιας δοκιμής, θα πρέπει να είναι γνωστά τα ακόλουθα στοιχεία σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία:
 - κοινή ονομασία, χημική ονομασία (κατά προτίμηση IUPAC), συντακτικός τύπος, αριθμός μητρώου CAS, καθαρότητα·
 - τάση ατμών·
 - υδατοδιαλυτότητα.
8. Οι ακόλουθες πρόσθετες πληροφορίες θεωρούνται χρήσιμες πριν από την έναρξη της δοκιμής:
 - ο συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη-νερό K_{ow} ·
 - ο συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc})·
 - υδρόλυση·
 - η φωτομετατροπή σε νερό·
 - η βιοαποικοδομησιμότητα·
 - η επιφανειακή τάση.
9. Πληροφορίες για ορισμένα χαρακτηριστικά του ιζήματος που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη της δοκιμής (7). Για περισσότερες πληροφορίες βλ. σημεία 22 έως 25.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Σκώληκες παρόμοιας φυσιολογικής κατάστασης (συγχρονισμένης καλλιέργειας όπως στο προσάρτημα 5) εκτίθενται σε σειρά τοξικών συγκεντρώσεων που εφαρμόζονται στη φάση του ιζήματος ενός συστήματος ιζήματος-νερού. Ως θρεπτικά μέσα χρησιμοποιούνται τεχνητό ιζημα και ανασυσταθέν νερό. Οι φιάλες δοκιμής χωρίς την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας χρησιμεύουν ως μάρτυρες. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα χύδην για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα μεταξύ επαναλήψεων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, και οι οργανισμοί δοκιμής εισάγονται στη συνέχεια σε φιάλες δοκιμής στις οποίες οι συγκεντρώσεις ιζήματος και νερού έχουν εξισορροπηθεί (βλ. σημείο 29.) Τα ζώα δοκιμής εκτίθενται στα συστήματα ιζήματος-νερού για περίοδο 28 ημερών. Ενόψει της χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά στοιχεία του τεχνητού ιζήματος, το ίζημα θα πρέπει να τροποποιείται με πηγή τροφής (βλ. παραγράφους 22 έως 23 και προσάρτημα 4), ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι σκώληκες αναπτύσσονται και αναπαράγονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι τα ζώα δοκιμής εκτίθενται στο νερό και στο ίζημα και διαμέσου της τροφής τους.
11. Το προτιμώμενο τελικό σημείο στη μελέτη αυτού του τύπου είναι η EC_x (π.χ. EC_{50} , EC_{25} , και EC_{10} · η αποτελεσματική συγκέντρωση είναι αυτή που έχει επίδραση x % στους οργανισμούς δοκιμής) για την αναπαραγωγή και τη βιομάζα, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι, λόγω της υψηλής αβεβαιότητας της χαμηλής EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{25}) με εξαιρετικά υψηλά όρια εμπιστοσύνης 95 % [π.χ. (15)] και της στατιστικής ισχύος υπολογιζόμενης κατά τις δοκιμές υπόθεσης, η EC_{50} θεωρείται το πλέον σταθερό τελικό σημείο. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) και η κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) μπορούν να υπολογίζονται για τη βιομάζα και την αναπαραγωγή, αν ο σχεδιασμός της δοκιμής και τα δεδομένα υποστηρίζουν αυτούς τους υπολογισμούς (βλ. παραγράφους 34 έως 38). Ο σκοπός της μελέτης, η εξαγωγή της EC_x ή της NOEC, θα καθορίσει τον σχεδιασμό της δοκιμής.

ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Η επίδοση των οργανισμών-μαρτύρων αναμένεται να αποδείξει επαρκώς την ικανότητα του εργαστηρίου να εκτελεί τη δοκιμή και, αν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά στοιχεία, την επαναληψιμότητα της δοκιμής. Επιπλέον, οι δοκιμές τοξικότητας αναφοράς μπορούν να διεξάγονται σε τακτά διαστήματα με τη χρήση τοξικής ουσίας αναφοράς για την αξιολόγηση της ευαισθησίας των οργανισμών δοκιμής. Δοκιμές τοξικότητας αναφοράς διάρκειας 96 ωρών στο νερό μόνο μπορούν να αποδείξουν ικανοποιητικά την ευαισθησία και την κατάσταση των ζώων δοκιμής (4) (7). Πληροφορίες για την τοξικότητα της πενταχλωροφαινόλης (PCP) σε πλήρεις δοκιμές (έκθεση 28 ημερών σε εμβολιασμένο ίζημα) περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 6 και στην έκθεση για τη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών (13). Η οξεία τοξικότητα μόνο στο νερό του PCP περιγράφεται π.χ. στο (16). Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση της ευαισθησίας ενός οργανισμού δοκιμής στις δοκιμές αναφοράς με το PCP ως τοξική ουσία αναφοράς. Το KCl (χλωριούχο κάλιο) ή ο θειικός χαλκός ($CuSO_4$) συνιστώνται ως τοξικές ουσίες αναφοράς με *L. variegatus* (4)(7). Έως σήμερα, είναι δύσκολη η καθιέρωση ποιοτικών κριτηρίων βάσει των στοιχείων τοξικότητας για το KCl λόγω έλλειψης βιβλιογραφίας για τον *L. variegatus*. Πληροφορίες για την τοξικότητα του χαλκού για το *L. variegatus* βρίσκονται στα (17) έως (21).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Για να είναι έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες απαιτήσεις:
- Δοκιμή δακτυλίου έδειξε (13) ότι για τον *Lumbriculus variegatus*, ο μέσος αριθμός ζώντων σκωλήκων ανά επανάλιψη στους μάρτυρες θα πρέπει να έχει αυξηθεί με συντελεστή τουλάχιστον 1,8 στο τέλος της έκθεσης σε σύγκριση με τον αριθμό των σκωλήκων ανά επανάλιψη στην αρχή της έκθεσης.
 - Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι μεταξύ 6 και 9 σε όλη τη δοκιμασία.
 - Η συγκέντρωση οξυγόνου στο υπερκείμενο νερό δεν θα πρέπει να είναι κάτω του 30 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV) σε θερμοκρασία δοκιμής κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Σύστημα δοκιμής

14. Συστοιάζονται στατικά συστήματα χωρίς ανανέωση του υπερκείμενου νερού. Αν η αναλογία ιζήματος προς νερό (βλ. σημείο 15) είναι κατάλληλη, ο ήπιος αερισμός κανονικά αρκεί για να παραμείνει η ποιότητα του νερού σε αποδεκτά επίπεδα για τους οργανισμούς δοκιμής (π.χ. μεγιστοποίηση των επιπέδων διαλυμένου οξυγόνου, ελαχιστοποίηση προϊόντων απέκκρισης). Ημιστατικά ή συστήματα συνεχούς ροής με διακεκομμένη ή συνεχή ανανέωση του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, αφού η τακτική ανανέωση του υπερκείμενου νερού μπορεί να επηρεάσει τη χημική ισορροπία (π.χ. απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το σύστημα δοκιμής).

Δοχεία και συσκευές δοκιμής

15. Η έκθεση θα πρέπει να διεξάγεται σε γυάλινα ποτήρια ζέσεως π.χ. των 250 ml με διάμετρο 6 cm. Κατάλληλα είναι και άλλα γυάλινα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Σε κάθε δοχείο τοποθετείται στρώμα μορφοποιημένου ιζήματος κατά προσέγγιση 1,5 - 3 cm. Η αναλογία του βάθους του ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι 1:4. Τα δοχεία θα πρέπει να έχουν κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με το φορτίο που θα δεχθούν, δηλ. τον αριθμό των σκωλήκων δοκιμής που προστίθενται ανά μονάδα βάρους του ιζήματος (βλ. επίσης παράγραφο 39).
16. Τα δοχεία δοκιμής και τα υπόλοιπα σκεύη που πρόκειται να έλθουν σε επαφή με την υπό δοκιμή χημική ουσία πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μην χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύσουν ή να προσροφήσουν την υπό δοκιμή χημική ουσία ή να απορροφούν άλλες χημικές ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα θρεπτικά μέσα της δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), ανοξείδωτος χάλυβας και/ή γυαλί. Για τις οργανικές χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι προσροφώνται στο γυαλί, ενδέχεται να απαιτηθεί σιλανιωμένο γυαλί. Στις περιπτώσεις αυτές ο εξοπλισμός, μετά τη χρήση, πρέπει να απορρίπτεται.

Υπό δοκιμή είδη

17. Τα είδη δοκιμής που χρησιμοποιούνται σ' αυτόν τον τύπο μελέτης είναι οι ολιγόχαιτοι γλυκού νερού *Lumbriculus variegatus* (Müller). Το είδος αυτό είναι ανεκτικό σε ευρύ φάσμα ιζημάτων και χρησιμοποιείται ευρέως για δοκιμές τοξικότητας του ιζήματος και βιοσυσσώρευσης [π.χ. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Η προέλευση των ζώων δοκιμής, η επιβεβαίωση της ταυτότητας των ειδών [π.χ. (36)] καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας θα πρέπει αναφέρονται. Η ταυτοποίηση των ειδών δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, αν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

18. Για να υπάρξει επαρκής αριθμός σκωλήκων για τη διεξαγωγή των δοκιμών τοξικότητας του ιζήματος, είναι χρήσιμο να παραμένουν οι σκώλικες σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Οι οδηγίες για τις μεθόδους εργαστηριακής καλλιέργειας για τον *Lumbriculus variegatus* και οι πηγές για καλλιέργεια εκκίνησης δίνονται στο προσάρτημα 5. Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την καλλιέργεια αυτού του είδους βλ. παραπομπές (3), (7), (27).
19. Για να εξασφαλιστεί ότι οι δοκιμές εκτελούνται με ζώα του ίδιου είδους, συνιστάται ένθερμα η καθιέρωση καλλιεργιών ενός μόνο είδους. Εξασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες και ειδικά οι σκώλικες που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές είναι απαλλαγμένοι από εμφανείς νόσους και ανωμαλίες.

Νερό

20. Το ανασυσταθέν νερό σύμφωνα με το κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος (37) συνιστάται για τη χρήση ως υπερκείμενο νερό στις δοκιμές· μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων (βλ. προσάρτημα 2 για την παρασκευή). Αν χρειαστεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυσικό νερό. Το επιλεγμένο νερό πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και των περιόδων δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Το είδος *Lumbriculus variegatus* έχει αποδειχθεί ότι επιβιώνει, αναπτύσσεται και αναπαράγεται σ' αυτόν τον τύπο νερού (30), και υπάρχει μέγιστη τυποποίηση των συνθηκών της δοκιμής και της καλλιέργειας. Αν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό, η σύνθεσή του θα πρέπει να αναφέρεται και το νερό να χαρακτηρίζεται, προτού χρησιμοποιηθεί, τουλάχιστον από pH, περιεκτικότητα οξυγόνου και σκληρότητα (εκφραζόμενο ως mg CaCO₃/l). Η ανάλυση του νερού για μικρορύπους πριν από τη χρήση πρέπει να δίνει χρήσιμες πληροφορίες (βλ. π.χ. προσάρτημα 3).
21. Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι μεταξύ 6,0 και 9,0 (βλ. σημείο 13). Αν αναμένεται αυξημένη παρουσία αμμωνίας, είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH μεταξύ 6,0 και 8,0. Για τις δοκιμές π.χ. ασθενών οργανικών οξέων, συνιστάται να ρυθμίζεται το pH με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο νερό που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή, όπως περιγράφεται π.χ. στο (16). Η ολική σκληρότητα του νερού που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή θα πρέπει να είναι μεταξύ 90 και 300 mg CaCO₃ ανά λίτρο για το φυσικό νερό. Το προσάρτημα 3 συγκεφαλαιώνει πρόσθετα κριτήρια για το αποδεκτό νερό αραίωσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ αριθ. 210 (38).

Ϊζημα

22. Επειδή ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους φυσικά ιζήματα μιας συγκεκριμένης πηγής, και επειδή αυτόχθονες οργανισμοί καθώς και η παρουσία μικρορύπων μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατά προτίμηση ένα μορφοποιημένο ιζημα (λέγεται επίσης ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ιζημα). Η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος ελαχιστοποιεί τη μεταβλητότητα των συνθηκών δοκιμής καθώς και την επέμβαση αυτόχθονης πανίδας. Το ακόλουθο μορφοποιημένο ιζημα βασίζεται στο τεχνητό ιζημα σύμφωνα με τα (6), (39) και (40). Συνιστάται για χρήση σ' αυτού του είδους τη δοκιμή [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:
- α) 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης σφάγνων· είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί τύρφη σε σκόνη, βαθμός αποσύνθεσης: “μεσαιός”, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίου ≤ 0,5 mm) και μόνο αερόξηρη·
 - β) 20 ± 1 % (ξηρό βάρος) καολιντικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %)
 - γ) 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (λεπτοαλεσμένη άμμος, μέγεθος σωματιδίου: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των κόκκων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μm)
 - δ) απιονισμένο νερό, 30–50 % του ξηρού βάρους του ιζήματος, επιπλέον των συστατικών του ξηρού ιζήματος·
 - ε) προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό (CaCO₃) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος·
 - στ) η ολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του τελικού μείγματος θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) του ξηρού βάρους του ιζήματος και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ)
 - ζ) τροφή, π.χ. λεπτοαλεσμένα φύλλα τσουκνίδας (*Urtica* sp., σύμφωνα με τα φαρμακευτικά πρότυπα, για κατανάλωση από τον άνθρωπο) ή μείγμα λεπτοαλεσμένων φύλλων του είδους *Urtica* sp. με άλφα-κυτταρίνη (1:1), σε 0,4 — 0,5 % ιζήματος ξηρού βάρους, επιπλέον των συστατικών του ξηρού ιζήματος· για λεπτομέρειες βλ. προσάρτημα 4.
23. Η πηγή της τύρφης, της καολιντικής αργίλου, των τροφών και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Επιπλέον του στοιχείου ζ) στο κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος (6) παρατίθενται φυτικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως πηγή διατροφής: αφυδατωμένα φύλλα μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*), ή σιτηρά.
24. Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να επιτρέπει τουλάχιστον αποδεκτή αναπαραγωγή στους μάρτυρες. Η ανάλυση του τεχνητού ιζήματος ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση θα παρείχε χρήσιμες πληροφορίες. Στο προσάρτημα 4 παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμιξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη

υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα (βλ. επίσης παράγραφο 25 και προσάρτημα 4). Το τεχνητό ίζημα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση των συστατικών, την κατανομή του μεγέθους των κόκκων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), τη μέγιστη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την υδατοχωρητικότητα και το pH. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δείκτη είναι προαιρετική.

25. Αν απαιτείται, π.χ. για ειδικές δοκιμές, φυσικά ιζήματα από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως ίζημα δοκιμής και/ή καλλιέργειας (3). Ωστόσο, αν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH και την αμμωνία του ενδοπορικού νερού, τη συνολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC) και την περιεκτικότητα σε άζωτο, την κατανομή του μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), και την ποσοστιαία υδατοχωρητικότητα (7) και θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση και άλλους οργανισμούς που ενδέχεται να ανταγωνίζονται ή να επιβουλεύονται τους οργανισμούς δοκιμής. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δείκτη και της κατιοανταλλακτικής ικανότητας είναι προαιρετική. Επίσης, πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή χημική ουσία, συνιστάται ο εγκλιματισμός του φυσικού ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αφαιρεθεί και να απορριφθεί.
26. Το ίζημα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί μάρτυρες να μπορούν να επιβιώνουν και να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, χωρίς να παρουσιάζουν ανώμαλη εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκόλικες-μάρτυρες θα πρέπει να φωλιάζουν στο ίζημα και να τρέφονται μ' αυτό. Η αναπαραγωγή στους μάρτυρες θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον με το κριτήριο εγκυρότητας που περιγράφεται στο σημείο 13. Η παρουσία ή απουσία περιττωμάτων στην επιφάνεια του ιζήματος, που είναι ένδειξη κατάποσης του ιζήματος από τους σκόλικες, θα πρέπει να καταγράφεται και μπορεί να είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τις οδούς έκθεσης. Πρόσθετες πληροφορίες για την πρόσληψη του ιζήματος μπορούν να αποκτηθούν με τη χρήση των μεθόδων που περιγράφονται στα (24), (25), (44) και (45), που προσδιορίζουν την πρόσληψη του ιζήματος ή την επιλογή σωματιδίου στους οργανισμούς δοκιμής.
27. Οι διαδικασίες χειρισμού για τα φυσικά ιζήματα πριν από τη χρήση στο εργαστήριο περιγράφονται στα σημεία (3), (7) και (12). Η προετοιμασία και αποθήκευση του τεχνητού ιζήματος που συνιστάται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή σε *Lumbriculus* περιγράφονται στο προσάρτημα 4.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

28. Η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στο ίζημα. Επειδή οι περισσότερες υπό δοκιμή χημικές ουσίες αναμένεται να έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, θα πρέπει να διαλυθούν σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (π.χ. ακετόνη, n-εξάνιο, κυκλοεξάνιο) σε όγκο όσο το δυνατόν μικρότερο, ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα παρακαταθήκης. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να αραιωθεί με τον ίδιο διαλύτη για την παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος από το αντίστοιχο διάλυμα. Το ίζημα θα πρέπει να εμβολιάζεται χύδην για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταξύ επαναλήψεων μεταβλητότητα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Καθένα από τα διαλύματα δοκιμής αναμειγνύεται στη συνέχεια με χαλαζιακή άμμο όπως περιγράφεται στο σημείο 22 (π.χ. 10 g χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής). Για να επιτευχθεί ο πλήρης εμπτισμός της χαλαζιακής άμμου αρκούν 0,20 — 0,25 ml ανά g άμμου. Στη συνέχεια, ο διαλύτης πρέπει να εξατμιστεί μέχρι ξηρού. Για να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας λόγω συνεξάτμισης (π.χ. ανάλογα με την τάση ατμών της χημικής ουσίας), η επικαλυμμένη άμμος θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την ξήρανση. Η ξηρή άμμος αναμειγνύεται με την κατάλληλη ποσότητα μορφοποιημένου ιζήματος στο αντίστοιχο επίπεδο συγκέντρωσης. Κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα της άμμου που παρέχεται από το μείγμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και άμμου (δηλ. το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι τελικά δεν εισάγεται διαλύτης στο ίζημα (7). Εναλλακτικά, π.χ. για ίζημα πεδίου, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να προστεθεί με εμβολιασμό ενός αερόξηρου, λεπτοαλεσμένου τμήματος του ιζήματος, όπως περιγράφεται ανωτέρω για τη χαλαζιακή άμμο, ή με ανάδευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο υγρό έδαφος, με επακόλουθη εξάτμιση, εάν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Αν χρειαστεί, μπορεί να αναλυθούν επιμέρους δείγματα για να επιβεβαιωθούν οι στοχευόμενες συγκεντρώσεις στο ίζημα και να προσδιοριστεί ο βαθμός ομοιογένειας. Μπορεί επίσης να είναι χρήσιμο να αναλυθούν τα επιμέρους δείγματα των διαλυμάτων δοκιμής για να επιβεβαιωθούν οι στοχευόμενες συγκεντρώσεις στο ίζημα. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης για την επικάλυψη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη χαλαζιακή άμμο, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας με διαλύτη που είναι παρασκευασμένος με την ίδια ποσότητα διαλύτη όπως τα ιζήματα δοκιμής. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό, καθώς και οι λόγοι για την επιλογή μιας συγκεκριμένης διαδικασίας εμβολιασμού πλην αυτής που περιγράφεται ανωτέρω πρέπει να αναφέρονται. Η μέθοδος εμβολιασμού ενδέχεται να προσαρμόζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. για να αποφεύγονται απώλειες λόγω της πτητικότητας κατά τον εμβολιασμό ή την εξισορρόπηση. Επιπλέον οδηγίες για τις διαδικασίες εμβολιασμού δίνονται στο "Environment Canada" (1995) (46).

29. Μόλις παρασκευαστεί το εμβολιασμένο ίζημα, αφού διανεμηθεί στα δοχεία των επαναλήψεων και συμπληρωθεί με το νερό δοκιμής, είναι σκόπιμο να επιτραπεί η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από το ίζημα στην υδατική φάση [(π.χ. (3)(7)(9)]. Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ενώσεις και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες) [π.χ. (27)(47)]. Σ' αυτήν τη δοκιμή, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται περίοδος εξισορρόπησης από 48 ώρες έως 7 ημέρες. Συνεπώς, θα ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος αποικοδόμησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο ίζημα μπορεί να υποστεί εξισορρόπηση ή παλαίωση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.
30. Στο τέλος της περιόδου εξισορρόπησης, τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον από το υπερκείμενο νερό και την κύρια μάζα του ιζήματος, τουλάχιστον στη υψηλότερη συγκέντρωση και στην κατώτερη, για ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της υπό δοκιμής χημικής ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες αρχικές συγκεντρώσεις. Γενικά, η δειγματοληψία διαταράσσει ή καταστρέφει το σύστημα ίζημα-νερό. Συνεπώς, δεν είναι συνήθως δυνατό να χρησιμοποιούνται τα ίδια πανομοιότυπα δοχεία για τη δειγματοληψία ιζήματος και σκωλήκων. Πρόσθετα "αναλυτικά" δοχεία κατάλληλων διαστάσεων πρέπει να τοποθετούνται, των οποίων ο χειρισμός να γίνεται με τον ίδιο τρόπο (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας οργανισμών δοκιμής) αλλά να μη χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις. Οι διαστάσεις του δοχείου θα πρέπει να επιλέγονται ώστε να παρέχονται οι ποσότητες δείγματος που απαιτούνται από την αναλυτική μέθοδο. Λεπτομέρειες σχετικά με τη δειγματοληψία παρέχονται στο προσάρτημα 53.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προκαταρκτική δοκιμή

31. Αν δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο *Lumbriculus variegatus*, είναι ίσως χρήσιμο να διεξαχθεί προκαταρκτικό πείραμα για να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα εξεταστούν στην οριστική δοκιμή και για να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες δοκιμής της οριστικής δοκιμής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια σειρά από συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με μεγάλα διαστήματα μεταξύ τους. Οι σκώληκες εκτίθενται σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για περίοδο (π.χ. 28 ημερών όπως στην οριστική δοκιμή) που επιτρέπει την εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής· δεν απαιτούνται επαναλήψεις. Η συμπεριφορά των σκωλήκων, για παράδειγμα η αποφυγή του ιζήματος, που μπορεί να προκαλείται από την υπό δοκιμή χημική ουσία και/ή το ίζημα, θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής δοκιμής. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1 000 mg/kg ξηρού βάρους ιζήματος δεν θα πρέπει να εξετάζονται στην προκαταρκτική δοκιμή.

Οριστική δοκιμή

32. Στην οριστική δοκιμή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να επιλέγονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις π.χ. βάσει του αποτελέσματος της προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους (σημείο 31) και όπως περιγράφεται στις παραγράφους 35, 36, 37 και 38.
33. Εκτός από τη σειρά δοκιμής, διεξάγεται δοκιμή ελέγχου (για τις επαναλήψεις βλέπε παραγράφους 36, 37 και 38) που περιέχει όλα τα συστατικά, εκτός από την υπό δοκιμή χημική ουσία. Αν χρησιμοποιείται παράγοντας διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, δεν θα πρέπει να έχει σημαντική επίδραση στους οργανισμούς δοκιμής όπως αποκαλύπτει πρόσθετη δοκιμή ελέγχου μόνο με τον διαλύτη.

Σχεδιασμός της δοκιμής

34. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση και του αριθμού των σκωλήκων που προστίθενται ανά δοχείο. Οι σχεδιασμοί για την εκτίμηση της EC_x, την εκτίμηση της NOEC και τη διεξαγωγή οριακής δοκιμής περιγράφονται στις παραγράφους 35, 36, 37 και 38.
35. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να αποφεύγεται η προεκβολή πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη θετική συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Αν — σε εξαιρετικές περιπτώσεις — γίνει τέτοια προεκβολή, πρέπει να δοθεί πλήρης εξήγηση στην έκθεση.

36. Αν πρέπει να εκτιμηθεί η EC₅₀, πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις και τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση· συνιστώνται έξι επαναλήψεις για τον μάρτυρα ή –αν χρησιμοποιείται– τον μάρτυρα με τον διαλύτη ώστε να βελτιωθεί η εκτίμηση της μεταβλητότητας του μάρτυρα. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται η χρησιμοποίηση επαρκών συγκεντρώσεων για μια ικανοποιητική εκτίμηση βάσει μοντέλου. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο (εξαιρέση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις που η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται, εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις στο εύρος των 5–95 %. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνει να οδηγεί σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη δοκιμή.
37. Αν πρέπει να εκτιμηθούν οι τιμές LOEC/NOEC, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις (συνιστώνται έξι επαναλήψεις για τον μάρτυρα ή –αν χρησιμοποιείται– το διάλυμα με τον μάρτυρα, ώστε να βελτιωθεί η εκτίμηση της μεταβλητότητας του μάρτυρα) και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.
38. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση σε έως και 1 000 mg/kg ιζήματος ξηρού βάρους, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρες). (π.χ. από προκαταρκτική δοκιμή προσδιορισμού εύρους) ή αν οι δοκιμές σε μία μόνη συγκέντρωση θα είναι κατάλληλες για να επιβεβαιώσουν μια τιμή NOEC που να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Στην τελευταία περίπτωση, στην έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιληφθεί αναλυτικό σκεπτικό για την επιλογή οριακής συγκέντρωσης. Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι η εκτέλεση της δοκιμής σε επαρκώς υψηλή συγκέντρωση, ώστε να επιτρέπεται στους ιθύνοντες να αποκλείσουν πιθανές τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ενώ το όριο τίθεται σε συγκέντρωση η οποία δεν αναμένεται να εμφανιστεί σε καμία περίπτωση. Συνιστάται η συγκέντρωση 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος). Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τους μάρτυρες. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.

Συνθήκες έκθεσης

Οργανισμοί δοκιμής

39. Η δοκιμή διεξάγεται με 10 τουλάχιστον σκώληκες για κάθε επανάληψη για τον προσδιορισμό των βιολογικών παραμέτρων. Αυτός ο αριθμός σκωλήκων αντιστοιχεί σε περίπου 50 — 100 mg υγρής βιομάζας. Αν υποθέσουμε ότι η επί ξηρού περιεκτικότητα είναι 17,1 % (48), αυτό έχει ως αποτέλεσμα 9 - 17 mg ξηρής βιομάζας ανά δοχείο. Η EPA των ΗΠΑ [2000 (7)] συνιστά να χρησιμοποιείται ρυθμός πλήρωσης που δεν υπερβαίνει 1:50 (ξηρή βιομάζα: TOC). Για το μορφοποιημένο ίζημα που περιγράφεται στο σημείο 22, αυτό αντιστοιχεί σε κατά προσέγγιση 43 g ιζήματος (ξηρό βάρος) ανά 10 σκώληκες σε περιεχόμενο TOC της τάξης του 2,0 % ξηρού ιζήματος. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται πάνω από 10 σκώληκες ανά δοχείο, η ποσότητα ιζήματος και υπερκείμενου νερού θα πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα.
40. Οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται σε μια συγκεκριμένη δοκιμή θα πρέπει να προέρχονται όλοι από την ίδια πηγή και να είναι ζώα με παρόμοια φυσιολογική κατάσταση (βλ. προσάρτημα 5). Θα πρέπει να επιλέγονται σκώληκες παρόμοιοι μεγέθους (βλ. σημείο 39). Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα από την παρτίδα ή το απόθεμα των σκωλήκων για να γίνεται εκτίμηση του μέσου βάρους.
41. Οι σκώληκες που θα χρησιμοποιηθούν σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια (βλ. προσάρτημα 5 για λεπτομέρειες). Μεγάλοι (ενήλικοι) σκώληκες χωρίς σημάδια πρόσφατης κατάτμησης μεταφέρονται σε γυάλινα τρυβλία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό. Στη συνέχεια συγχρονίζονται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5. Μετά την αναγέννηση για περίοδο από 10 έως 14 ημερών, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άδικοι ολόκληροι σκώληκες παρόμοιοι μεγέθους, που κολυμπούν ή σέρνονται ζωηρά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Αν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. ως προς τη θερμοκρασία, τον φωτισμό και το υπερκείμενο νερό), μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας π.χ. 24 ωρών κατά την οποία η θερμοκρασία, ο φωτισμός και το υπερκείμενο νερό θα είναι ίδια με της δοκιμής, θα πρέπει να είναι επαρκής για την προσαρμογή των σκωλήκων στις συνθήκες δοκιμής. Οι προσαρμοσμένοι ολιγόχαιτοι θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία στα δοχεία δοκιμής.

Σίτιση

42. Δεδομένου ότι τροφή προστίθεται στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (ή κατά τη διάρκεια της), οι σκώληκες δεν σιτίζονται επιπλέον κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

Φως και θερμοκρασία

43. Η φωτοπερίοδος στην καλλιέργεια και στη δοκιμή είναι συνήθως 16 ώρες (3), (7). Η ένταση φωτός θα πρέπει να είναι χαμηλή (π.χ. 100-500 lx), παρόμοια με φυσικές συνθήκες στην επιφάνεια του ιζήματος, και να μετρηθεί τουλάχιστον μία φορά κατά την περίοδο της έκθεσης. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Σε μια δεδομένη ημερομηνία μέτρησης, η διαφορά της θερμοκρασίας μεταξύ των δοχείων δοκιμής δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να τοποθετούνται στον επωαστήρα δοκιμής ή στην περιοχή δοκιμής τυχαία, π.χ. για την ελαχιστοποίηση της μεροληψίας στην αναπαραγωγή λόγω της θέσης του δοχείου.

Αερισμός

44. Το υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να αερίζεται ήπια (π.χ. 2-4 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος. Μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μην κατεβαίνει κάτω από το 30 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV). Η παροχή αέρα θα πρέπει να ελέγχεται και -αν είναι ανάγκη- να προσαρμόζεται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως τις εργάσιμες ημέρες.

Μετρήσεις ποιότητας νερού

45. Οι ακόλουθες παράμετροι για την ποιότητα του νερού θα πρέπει να μετριούνται στο υπερκείμενο νερό:

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Θερμοκρασία: | τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· αν είναι δυνατόν, μπορεί να καταγράφεται επιπλέον η θερμοκρασία στο περιβάλλον μέσο (αέρας περιβάλλοντος ή υδατόλουτρο) π.χ. σε ωριαία διαστήματα· |
| Περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο: | τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· εκφραζόμενη ως mg/l και % ASV (τιμή κορεσμού με αέρα)· |
| Παροχή αέρα: | θα πρέπει να ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά ημερησίως τις εργάσιμες ημέρες και -αν χρειαστεί- να προσαρμόζεται· |
| pH: | τουλάχιστον σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και ένα δοχείο δοκιμής των μαρτύρων μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· |
| Συνολική σκληρότητα νερού: | τουλάχιστον σε έναν μάρτυρα και σε ένα δοχείο δοκιμής στην ανώτατη συγκέντρωση στην αρχή και στο τέλος της περιόδου έκθεσης· εκφραζόμενη ως mg/l CaCO_3 · |
| Συνολική περιεκτικότητα σε αμμωνία: | τουλάχιστον σε έναν μάρτυρα και σε ένα δοχείο δοκιμής για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης στην αρχή της περιόδου έκθεσης και στη συνέχεια 3 x ανά εβδομάδα· εκφραζόμενη ως mg/l NH_4^+ ή NH_3 ή συνολική αμμωνία -N· |

Αν η μέτρηση των παραμέτρων ποιότητας του νερού απαιτεί την αφαίρεση σημαντικών δειγμάτων νερού από τα δοχεία, μπορεί να είναι προτιμητέο να τοποθετηθούν ξεχωριστά δοχεία για τις μετρήσεις ποιότητας του νερού, ώστε να μην αλλοιώνεται η αναλογία όγκος νερού προς ιζήμα.

Βιολογικές παρατηρήσεις

46. Κατά την έκθεση, τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να παρατηρούνται για την οπτική εκτίμηση τυχόν διαφορών στη συμπεριφορά των σκωλήκων (π.χ. αποφυγή ιζήματος, περιττώματα εμφανή στην επιφάνεια του ιζήματος) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να καταγράφονται.

47. Στο τέλος της δοκιμής, εξετάζεται κάθε δοχείο της δοκιμής (πρόσθετα δοχεία που προορίζονται για χημικές αναλύσεις μπορούν να αποκλείονται από την εξέταση). Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη μέθοδος για να ανακτηθούν όλοι οι σκώληκες από το δοχείο δοκιμής. Μέρη πρέπει να λαμβάνεται ώστε όλοι οι σκώληκες να ανακτώνται αλώβητοι. Μια πιθανή μέθοδος είναι το κοσκίνισμα των σκωλήκων από το ίζημα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέγμα ανοξειδωτού χάλυβα με διάμετρο οπών κατάλληλου μεγέθους. Το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου νερού μεταγγίζεται προσεκτικά και το εναπομείναν ίζημα και νερό ανακινείται ώστε να προκύψει πολτός που μπορεί να περάσει μέσα από το κόσκινο. Αν χρησιμοποιηθεί κόσκινο με διάμετρο οπής 500 μm, τα περισσότερα σωματίδια του ιζήματος θα περάσουν πολύ γρήγορα από το κόσκινο· ωστόσο, το κοσκίνισμα θα πρέπει να γίνει γρήγορα, ώστε οι σκώληκες να μην μπορούν να ανέβουν στο κόσκινο ή να περάσουν μέσα από τις οπές. Αν χρησιμοποιηθεί κόσκινο με διάμετρο οπής 250 μm οι σκώληκες δεν θα μπορούν να ανέβουν στο κόσκινο ή να περάσουν μέσα από τις οπές· ωστόσο, μέρη πρέπει να λαμβάνεται ώστε το κόσκινο να μη συγκρατεί παρά ελάχιστα σωματίδια από το ίζημα. Ο κοσκινισμένος πολτός κάθε δοχείου επαναληπτικής δοκιμής μπορεί να περάσει μέσα από κόσκινο δεύτερη φορά, ώστε να διασφαλιστεί ότι ανακτώνται όλοι οι σκώληκες. Μια εναλλακτική μέθοδος θα ήταν η θέρμανση του ιζήματος με την τοποθέτηση των δοχείων δοκιμής στο υδατόλουτρο στους 50-60 °C· οι σκώληκες απομακρύνονται από το ίζημα και μπορούν να συλλέγονται από την επιφάνεια του ιζήματος με τη χρήση ευρύστομου σιφώνιου του οποίου τα άκρα έχουν λειανθεί με φλόγα. Μια άλλη μέθοδος θα ήταν η παραγωγή πολτού ιζήματος και η μετάγγιση του πολτού αυτού σε ρηχό σκεύος κατάλληλου μεγέθους. Από το ρηχό επίπεδο, οι σκώληκες μπορούν να ανακτηθούν με χαλύβδινη λαβίδα ή τσιμπίδες με ελατήριο ωρολογιοποιών (να χρησιμοποιούνται σαν πιηρούνη και όχι ως πένσα ώστε να μην τραυματίζονται οι σκώληκες) και να μεταφερθούν σε καθαρό νερό. Αφού διαχωριστούν οι σκώληκες από τον πολτό ιζήματος, εκπλένονται στο μέσο δοκιμής και καταμετρώνται.
48. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδείξουν ότι το προσωπικό τους είναι σε θέση να ανακτά τουλάχιστον το 90 % κατά μέσο όρο των οργανισμών από όλο το ίζημα. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να προστεθεί ένας συγκεκριμένος αριθμός οργανισμών δοκιμής στο ίζημα-μάρτυρα ή στα ιζήματα δοκιμής και η ανάκτησή τους να καθοριστεί μετά από 1 ώρα (7).
49. Ο συνολικός αριθμός των ζώντων και νεκρών ατόμων ανά δοχείο επανάλιψης καταγράφεται και αξιολογείται. Οι ακόλουθες ομάδες σκωλήκων θεωρούνται νεκρές:
- α) δεν υπάρχει αντίδραση σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα·
 - β) υπάρχουν σημεία αποσύνθεσης [σε συνδυασμό με το στοιχείο α)]·
 - γ) αριθμός εκλιπόντων σκωλήκων.
- Επιπλέον, οι ζώντες σκώληκες μπορούν να αποδοθούν σε μία από τις τρεις ομάδες:
- α) μεγάλοι ολόκληροι σκώληκες (ενήλικοι) χωρίς αναγεννημένα μέρη σώματος·
 - β) ολόκληροι σκώληκες χωρίς αναγεννημένα μέρη σώματος με ανοιχτότερο χρώμα (δηλ. με νέο οπίσθιο μέρος, με νέο πρόσθιο μέρος, ή και με τα δύο, πρόσθιο και οπίσθιο μέρος)·
 - γ) ατελείς σκώληκες (δηλ. πρόσφατα κατατετημένοι με μη αναγεννημένα μέρη σώματος).
- Αυτές οι πρόσθετες παρατηρήσεις δεν είναι υποχρεωτικές αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόσθετη ερμηνεία των βιολογικών αποτελεσμάτων (για παράδειγμα, μεγάλος αριθμός σκωλήκων στην ομάδα γ μπορεί να σημαίνει καθυστέρηση αναπαραγωγής ή αναγέννηση σε συγκεκριμένη αγωγή). Επιπροσθέτως, τυχόν διαφορές που παρατηρούνται στην εμφάνιση (π.χ. βλάβες στο καλυπτήριο σύστημα, μέρη του σώματος με οιδήματα) μεταξύ σκωλήκων υπό αγωγή και μαρτύρων πρέπει να καταγράφονται.
50. Αμέσως μετά τη μέτρηση/αξιολόγηση, οι ζώντες σκώληκες που βρίσκονται σε κάθε δοχείο επανάλιψης μεταφέρονται σε ξηρά, προζυγισμένα και επισημασμένα ρηχά σκεύη (ένα ανά επανάλιψη) και θανατώνονται με μια σταγόνα αιθανόλης ανά σκεύος. Τα σκεύη τοποθετούνται σε κλίβανο ξήρασης στους 100 ± 5 °C για να ξηραθούν όλη τη νύκτα και στη συνέχεια ζυγίζονται αφού κρυώσουν σε ξηραντήρα και προσδιορίζεται το ξηρό βάρος των σκωλήκων (κατά πρότιμηση σε g, τουλάχιστον με τέσσερα δεκαδικά ψηφία).
51. Εκτός από το συνολικό ξηρό βάρος, το ξηρό βάρος πλην τέφρας μπορεί να προσδιοριστεί όπως περιγράφεται στο (49) ώστε να υπολογιστούν τα ανόργανα συστατικά που προέρχονται από το προσληφθέν ίζημα που είναι παρόν στο πεπτικό σύστημα των σκωλήκων.
52. Η βιομάζα προσδιορίζεται ως συνολική βιομάζα ανά επανάλιψη συμπεριλαμβανομένων ενήλικων και νεαρών σκωλήκων. Οι νεκροί σκώληκες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της βιομάζας ανά επανάλιψη.

Επαλήθευση των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

Δειγματοληψία

53. Τα δείγματα για τη χημική ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον στην υψηλότερη συγκέντρωση και σε μια χαμηλότερη, τουλάχιστον στο τέλος της φάσης εξορρόπησης (πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής), και στο τέλος της δοκιμής. Δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται για ανάλυση τουλάχιστον από την κύρια μάζα του ιζήματος και το υπερκείμενο νερό. Θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον δύο δείγματα ανά μήτρα και αγωγή σε κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Ένα από τα επαναλαμβανόμενα δείγματα μπορεί να αποθηκεύεται ως εφεδρικό (και να αναλύεται π.χ. σε περίπτωση που η αρχική ανάλυση ξεφεύγει από το εύρος του $\pm 20\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης). Στην περίπτωση ειδικών χημικών ιδιοτήτων, π.χ. αν αναμένεται ταχεία αποσύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορεί να τροποποιηθεί το αναλυτικό πρόγραμμα (π.χ. πιο συχνή δειγματοληψία, ανάλυση περισσότερων επιπέδων συγκέντρωσης) βάσει κρίσης εμπειρογνώμονα. Στην περίπτωση αυτή μπορούν να ληφθούν δείγματα σε ενδιάμεσες ημερομηνίες δειγματοληψίας (π.χ. την έβδομη ημέρα μετά την έναρξη της έκθεσης).
54. Η δειγματοληψία από το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό του υπερκείμενου νερού, ώστε να ελαχιστοποιείται η διαταραχή του ιζήματος. Καταγράφεται ο όγκος των δειγμάτων.
55. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο νερό, το ίζημα θα πρέπει να ομογενοποιείται και να μεταφέρεται σε κατάλληλο περιέκτη. Καταγράφεται το βάρος του δείγματος υγρού ιζήματος.
56. Αν χρειάζεται πρόσθετη ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ενδοπορικό νερό, τα ομογενοποιημένα και σταθμισμένα δείγματα του ιζήματος θα πρέπει να φυγοκεντρώνονται για να προκύψει ενδοπορικό νερό. Για παράδειγμα, κατά προσέγγιση 200 ml υγρού ιζήματος μπορούν να γεμίσουν ποτήρια ζέσεως 250 ml. Στη συνέχεια, τα δείγματα θα πρέπει να φυγοκεντρηθούν χωρίς διήθηση για απομόνωση του ενδοπορικού νερού, π.χ. σε $10\,000 \pm 600 \times g$ για 30 - 60 min σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στη δοκιμή. Μετά τη φυγοκέντρωση, αυτό που περισσεύει μεταφέρεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό του εναπομένου ιζήματος. Η εκτίμηση του ισοζυγίου μάζας ή η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα νερό-ίζημα μπορεί να διευκολυνθεί, αν το ξηρό βάρος ιζήματος προσδιορίζεται σε κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν θα είναι δυνατόν να αναλυθούν συγκεντρώσεις στο ενδοπορικό νερό καθώς το μέγεθος δείγματος είναι πολύ μικρό.
57. Αν δεν γίνει αμέσως ανάλυση, όλα τα δείγματα φυλάσσονται με κατάλληλη μέθοδο, π.χ. σε συνθήκες αποθήκευσης που συνιστώνται για ελάχιστη βιοαποικοδόμηση της συγκεκριμένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. τα περιβαλλοντικά δείγματα συνήθως αποθηκεύονται σε $-18\text{ }^\circ\text{C}$ στο σκοτάδι). Πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες για τις σωστές συνθήκες αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία –για παράδειγμα, διάρκεια και θερμοκρασία αποθήκευσης, διαδικασίες εκχύλισης κ.λπ.– πριν από την έναρξη της μελέτης.

Αναλυτική μέθοδος

58. Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ακρίβεια (accuracy), την πιστότητα (precision) και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή χημική ουσία, πρέπει να ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς επίσης και η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας από τα δείγματα νερού και ιζήματος είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο, τουλάχιστον στην κατώτατη και στην ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής. Ομοίως, πρέπει να εξακριβώνεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στους θαλάμους-μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν το όριο ποσοτικού προσδιορισμού. Αν χρειαστεί, διορθώνονται οι ονομαστικές συγκεντρώσεις για την ανάκτηση των εμβολιασμένων δειγμάτων ελέγχου της ποιότητας (π.χ. όταν η ανάκτηση είναι εκτός του 80 - 120 % της εμβολιασμένης ποσότητας). Ο χειρισμός όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής γίνεται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).
59. Η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού και το όριο της ανίχνευσης στο ίζημα και το νερό θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

60. Οι κύριες υποχρεωτικές μεταβλητές για την απόκριση της δοκιμής που πρέπει να αξιολογούνται στατιστικά είναι η βιομάζα και ο συνολικός αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη. Προαιρετικά, θα μπορούσαν να αξιολογηθούν επίσης η αναπαραγωγή (ως αύξηση του αριθμού των σκωλήκων) και η ανάπτυξη (ως αύξηση της ξηρής βιομάζας). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει η εκτίμηση του ξηρού βάρους των σκωλήκων στην αρχή της έκθεσης π.χ. με μέτρηση του ξηρού βάρους αντιπροσωπευτικού μερικού δείγματος της παρτίδας των συγχρονισμένων σκωλήκων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

61. Αν και η θνησιμότητα δεν είναι τελικό σημείο της δοκιμής αυτής, ο αριθμός των νεκρών σκωλήκων πρέπει να αξιολογείται κατά το δυνατόν. Για την εκτίμηση της θνησιμότητας, όσοι σκώληκες δεν αντιδρούν σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα ή δείχνουν σημάδια αποικοδόμησης, και οι εκλιπόντες σκώληκες πρέπει να θεωρούνται νεκροί. Οι νεκροί σκώληκες θα πρέπει τουλάχιστον να καταγράφονται και συνεκτιμώνται κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.
62. Οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις θα πρέπει να εκφράζονται σε mg/kg ξηρού βάρους ιζήματος. Αν η ανάκτηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που μετρείται στο ίζημα ή στο ίζημα και στο υπερκείμενο νερό στην αρχή της έκθεσης είναι μεταξύ 80 και 120 % των ονομαστικών συγκεντρώσεων, οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (EC_x , NOEC, LOEC) μπορούν να εκφραστούν βάσει των ονομαστικών συγκεντρώσεων. Αν η ανάκτηση αποκλίνει από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις κατά ± 20 % και πλέον των ονομαστικών συγκεντρώσεων, οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις (EC_x , NOEC, LOEC) θα πρέπει να βασίζονται στις αρχικά μετρούμενες συγκεντρώσεις στην αρχή της έκθεσης, π.χ. λαμβανομένου υπόψη του ισοζυγίου μάζας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα δοκιμής (βλ. σημείο 30). Στις περιπτώσεις αυτές, πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να αποκτηθούν από την ανάλυση των διαλυμάτων παρακαταθήκης και/ή εφαρμογής, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα ιζήματα δοκιμής παρασκευάστηκαν σωστά.

EC_x

63. Οι τιμές της EC_x , για τις παραμέτρους που περιγράφονται στο σημείο 60 υπολογίζονται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους (π.χ. ανάλυση Probit, λογιστική συνάρτηση ή συνάρτηση Weibull, απλοποιημένη μέθοδος Spearman-Kärber ή απλή παρεμβολή). Οδηγίες για τη στατιστική αξιολόγηση παρέχονται στις παραγράφους (15) και (50). Η EC_x λαμβάνεται εάν εισαχθεί στην εξίσωση τιμή που να αντιστοιχεί στο x % του μέσου όρου του μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC_{50} ή οποιασδήποτε άλλης EC_x , οι μέσοι όροι ανά αγωγή (\bar{X}) θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

NOEC/LOEC

64. Εάν μια στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον προσδιορισμό των NOEC/LOEC, απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι. Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις του υπό δοκιμή τεμαχίου σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται μέσω μονόπλευρου (μικρότερου) ελέγχου στατιστικής υπόθεσης με $p \leq 0,05$. Δίνονται στις ακόλουθες παραγράφους. Οδηγίες για την επιλογή των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων παρέχονται στα (15) και (50).
65. Η κανονική κατανομή των δεδομένων μπορεί να ελεγχθεί π.χ. με τον έλεγχο κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov, τον έλεγχο διασπαστικής τυπικής απόκλισης (δοκιμή R/s) ή τον έλεγχο Shapiro-Wilk (αμφίπλευρος, $p \leq 0,05$). Για τον έλεγχο της ομοιογένειας της διασποράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι έλεγχοι Cochran, Levene ή Bartlett, (αμφίπλευρος, $p \leq 0,05$). Αν ικανοποιούνται τα προαπαιτούμενα των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές), μπορούν να διεξαχθούν μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκρίσεις ανά ζεύγη (π.χ. δοκιμασία Dunnett) ή καθοδικά εφαρμοζόμενες δοκιμασίες τάσεων (π.χ. δοκιμασία Williams) για να υπολογιστεί αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων του υπό δοκιμή τεμαχίου. Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. Bonferroni-U κατά τον Holm ή έλεγχος φθίνουσας τάσης κατά Jonckheere-Terpstra) για τον προσδιορισμό των τιμών NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

66. Αν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις (συνολικός αριθμός σκωλήκων και βιομάζας ως ξηρό βάρος σκωλήκων) μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (έλεγχος t). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος t άνισης διασποράς (Welch-t) ή ένας μη παραμετρικός έλεγχος, όπως ο Mann-Whitney-U. Ορισμένες πληροφορίες για τη στατιστική ισχύ που διαπιστώνονται κατά τις δοκιμές υπόθεσης στη δοκιμή δακτυλίου της μεθόδου δοκιμών δίνονται στο προσάρτημα 6.
67. Για τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελεγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τους ελέγχους αυτούς δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

68. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των συγκεντρώσεων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου. Τυχόν αποκλίσεις από τη μέθοδο αυτή πρέπει να σημειώνονται.

Έκθεση δοκιμής

69. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας· πηγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε·
- άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τις φυσικές ιδιότητες και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως έχουν πριν από την έναρξη της δοκιμής [π.χ. υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ιζήμα, εάν είναι διαθέσιμος), $\log K_{ow}$, σταθερότητα στο νερό κ.λπ.]·

— Είδος δοκιμής:

- επιστημονική ονομασία, πηγή, τυχόν προηγούμενα αγωγή, εγκλιματισμός, συνθήκες καλλιέργειας κ.λπ.

— Συνθήκες δοκιμής:

- εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής νερού)·
- σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. αριθμός, υλικό και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, όγκος νερού ανά δοχείο, μάζα και όγκος ιζήματος ανά δοχείο, ρυθμός αντικατάστασης του όγκου νερού (για διαδικασίες συνεχούς ροής νερού ή ημιστατικές διαδικασίες), κάθε αερισμός που χρησιμοποιείται πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός των επαναλήψεων, αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη στην αρχή της έκθεσης, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια περιόδων έκθεσης και εξισορρόπησης, συχνότητα δειγματοληψίας)·
- βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού·
- μέθοδος προκατεργασίας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και εμβολιασμού/εφαρμογής·
- οι ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, λεπτομέρειες για τη δειγματοληψία για χημική ανάλυση και τις αναλυτικές μεθόδους με τις οποίες αποκτώνται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·
- τα χαρακτηριστικά του ιζήματος όπως περιγράφεται στις παραγράφους 24 — 25 και οποιεσδήποτε άλλες μετρήσεις έγιναν· παρασκευή του μορφοποιημένου ιζήματος·
- παρασκευή του νερού δοκιμής (αν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και τα χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, αγωγιμότητα, σκληρότητα και τυχόν άλλες μετρήσεις) πριν από την έναρξη της δοκιμής·
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης·
- ένταση φωτισμού και φωτοπερίοδος/-οι·
- μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για όλες τις βιολογικές παραμέτρους (π.χ. δειγματοληψία, επιθεώρηση, ζύγιση των οργανισμών δοκιμής) και όλες τις αβιοτικές παραμέτρους (π.χ. παράμετροι ποιότητας νερού και ιζήματος)·
- όγκοι και/ή βάρη όλων των δειγμάτων για χημική ανάλυση·
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία όλων των δειγμάτων για χημική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένων λεπτομερειών για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή χημική ουσία, και ανακτήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

- Αποτελέσματα:
 - ποιότητα του νερού εντός των δοχείων δοκιμής (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, σκληρότητα, συγκεντρώσεις αμμωνίας και τυχόν άλλες μετρήσεις)·
 - συνολική περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), αναλογία ξηρού βάρους προς υγρό βάρος, pH του ιζήματος και τυχόν άλλες μετρήσεις·
 - ο συνολικός αριθμός, και αν προσδιοριστεί, ο αριθμός των ολόκληρων και ατελών σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·
 - ξηρό βάρος των σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής και, αν μετρηθεί, το ξηρό βάρος ενός μερικού δείγματος των σκωλήκων στην αρχή της δοκιμής·
 - τυχόν παρατηρούμενη ανώμαλη συμπεριφορά σε σύγκριση με τους μάρτυρες (π.χ. αποφυγή του ιζήματος, παρουσία ή απουσία περιττωμάτων)·
 - τυχόν παρατηρούμενη θνησιμότητα στους σκωλήκες·
 - εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων, (π.χ. EC_x, NOEC και/ή LOEC), και οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους·
 - ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής·
 - τυχόν αποκλίσεις από τα κριτήρια εγκυρότητας.
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:
 - συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στο σημείο 13·
 - συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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), Λουξεμβούργο.
- (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), Παρίσι.
- (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) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος, “Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος”.
- (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, Μάρτιος 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, σ. 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, Μάρτιος 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*: Reorganization 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) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Παρίσι.
- (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, Παρίσι, Γαλλία.
- (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, Γερμανία, σ. 107-119.

Πρόσθετη βιβλιογραφία για τις στατιστικές διαδικασίες:

- 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.), σ. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, Λονδίνο.
- 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. Νέα Υόρκη.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. John Wiley & Sons. Νέα Υόρκη.
- 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.

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία μια ουσία ή ένα μείγμα.

Η **περίοδος εγκλιματισμού** χρησιμοποιείται για να σταθεροποιηθεί το μικροβιακό συστατικό του ιζήματος και να αφαιρεθεί π.χ. η αμμωνία που προέρχεται από συστατικά του ιζήματος· λαμβάνει χώρα πριν από τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνήθως, το υπερκείμενο νερό απορρίπτεται μετά τον εγκλιματισμό.

EC_x: η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ίζημα που έχει επίδραση x % (π.χ. 50 %) σε μια βιολογική παράμετρο εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης.

Η **περίοδος εξισορρόπησης** επιτρέπει την κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ της στερεής φάσης, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού· λαμβάνει χώρα μετά τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία και πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής.

Φάση έκθεσης: το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία.

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα: ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC): η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία παρατηρείται ότι μια ουσία έχει σημαντική τοξική επίδραση (με $p \leq 0,05$), συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ωστόσο, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής που υπερβαίνουν τη LOEC πρέπει να έχουν επίδραση ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται στη LOEC. Σε περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να πληρούνται οι δύο αυτοί όροι, πρέπει να εξηγηθεί πλήρως ο τρόπος επιλογής της LOEC (και, κατ' επέκταση, της NOEC).

Συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC): η αμέσως χαμηλότερη της LOEC συγκέντρωση, η οποία, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p \leq 0,05$) σε συγκεκριμένη χρονική διάρκεια έκθεσης.

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow} : εκφράζεται επίσης μερικές φορές ως P_{ow}): ο λόγος της διαλυτότητας μιας χημικής ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό σε ισορροπία και αντιπροσωπεύει τη λιποφιλία μιας χημικής ουσίας (κεφάλαιο A.24 του παρόντος παραρτήματος). Η K_{ow} ή ο λογάριθμος της K_{ow} ($\log K_{ow}$) χρησιμοποιούνται ως ένδειξη του δυναμικού μιας χημικής ουσίας για βιοσυσσώρευση από υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής σε οργανικό άνθρακα-νερό (K_{oc}): ο λόγος της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα ιζήματος προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό, σε κατάσταση ισορροπίας.

Υπερκείμενο νερό: το νερό που καλύπτει το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Ενδοπορικό ή διάμεσο νερό: το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο ίζημα: το ίζημα στο οποίο έχει προστεθεί η υπό δοκιμή χημική ουσία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Στελέχη που έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για τη δοκιμή

[από το κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος (1)].

α) Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου

Διαλύονται 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

β) Διάλυμα θειικού μαγνησίου

Διαλύονται 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

γ) Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου

Διαλύονται 2,59 g NaHCO_3 σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

δ) Διάλυμα χλωριούχου καλίου

Διαλύονται 0,23 g KCl σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

Όλες οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας.

Η αγωγιμότητα του απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Αναμειγνύονται 25 ml κάθε διαλύματος α) έως δ) και ο συνολικός όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το άθροισμα των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου σε αυτά τα διαλύματα είναι 2,5 mmol/l.

Η αναλογία των ιόντων Ca:Mg είναι 4:1 και των ιόντων Na:K είναι 10:1. Η ικανότητα οξέος $\text{K}_{\text{S}4.3}$ αυτού του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Το νερό αραίωσης αερίζεται μέχρι την επίτευξη κορεσμού με οξυγόνο και, στη συνέχεια, αποθηκεύεται για περίπου δύο ημέρες χωρίς περαιτέρω αερισμό πριν από τη χρήση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

(1) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.

Προσάρτημα 3

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραιώσης

| Συστατικό | Συγκεντρώσεις |
|---------------------------------------------------------------------|---------------|
| Σωματίδια | < 20 mg/l |
| Ολικός οργανικός άνθρακας | < 2 µg/l |
| Μη ιονισμένη αμμωνία | < 1 µg/l |
| Υπολείμματα χλωρίου | < 10 µg/l |
| Σύνολο οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων | < 50 ng/l |
| Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια | < 50 ng/l |
| Ολικό οργανικό χλώριο | < 25 ng/l |

[Εγκρίθηκε από τον ΟΟΣΑ (1992) (1)]

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals Ap. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. ΟΟΣΑ, Παρίσι.

Προσάρτημα 4

Συνιστώμενο τεχνητό ιζήμα — οδηγίες για την Παρασκευή και την αποθήκευσή

Συστατικά ιζήματος

| Συστατικό | Χαρακτηριστικά | % ξηρού βάρους του ιζήματος |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Τύρφη | Τύρφη σφάγγων, βαθμός αποικοδόμησης: “μέτρια”, αερόξηρη, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm) \leq | 5 \pm 0,5 |
| Χαλαζιακή άμμος | Μέγεθος κόκκων: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 m | 75 - 76 |
| Καολιντική άργιλος | Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 % | 20 \pm 1 |
| Πηγή τροφής | π.χ. σκόνη <i>Urtica</i> (<i>Folia urticae</i>), φύλλα από <i>Urtica dioica</i> (τσουκνίδα), λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm): σύμφωνα με φαρμακευτικά πρότυπα, για ανθρώπινη κατανάλωση· επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 0,4 - 0,5 % |
| Οργανικός άνθρακας | Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου | 2 \pm 0,5 |
| Ανθρακικό ασβέστιο | CaCO ₃ , κονιοποιημένο, χημικώς καθαρό, επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 0,05 - 1 |
| Απιονισμένο νερό | Αγωγιμότητα ≤ 10 μ S/cm, επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 30 - 50 |

Σημείωση: Αν αναμένεται αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας, π.χ. αν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι γνωστό ότι αναστέλλει τη νιτροποίηση, μπορεί να είναι χρήσιμο να αντικατασταθεί το 50 % της πλούσιας σε άζωτο σκόνης *Urtica* με κутταρίνη [π.χ. σκόνη α-κутταρίνης, χημικά καθαρή, μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm· (1) (2)].

Παρασκευή

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 \pm 0,5 με CaCO₃. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 \pm 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετρείται ξανά και θα πρέπει να είναι 6,0 \pm 0,5. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολιντική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ιζήμα με περιεκτικότητα σε νερό 30–50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με CaCO₃, εάν είναι απαραίτητο. Ωστόσο, εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, μπορεί να είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH του ιζήματος κάτω από 7,0 (π.χ. μεταξύ 6,0 και 6,5). Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Αν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, το μορφοποιημένο ιζήμα μπορεί

να εγκλιματιστεί για επτά ημέρες στις ίδιες συνθήκες που επικρατούν στη δοκιμή που ακολουθεί (π.χ. λόγος ιζήματος-νερού 1:4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής) πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή χημική ουσία, δηλ. θα πρέπει να συμπληρωθεί με νερό, το οποίο θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε αερισμό. Στο τέλος αυτής της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Στη συνέχεια, η εμβολιασμένη χαλαζιακή άμμος αναμειγνύεται με το ίζημα για κάθε επίπεδο αγωγής, το ίζημα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής επανάληψης και συμπληρώνεται με νερό δοκιμής. Στη συνέχεια, τα δοχεία επωάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο σημείο αυτό ξεκινάει η περίοδος εξισορρόπησης. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αερίζεται.

Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή χημική ουσία. Μπορεί να αναμειγνύεται αρχικά με το εναιώρημα τύρφης (βλ. ανωτέρω). Ωστόσο, είναι δυνατό να αποφεύγεται η υπερβολική αποικοδόμηση της πηγής τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής –π.χ. στην περίπτωση μεγάλης χρονικής περιόδου εξισορρόπησης– με διατήρηση της χρονικής περιόδου μεταξύ της προσθήκης τροφής και της έναρξης της έκθεσης όσο το δυνατό πιο σύντομης. Για να διασφαλίζεται επαρκής επαφή της τροφής με την υπό δοκιμή χημική ουσία, η πηγή τροφής θα πρέπει να αναμειγνύεται με το ίζημα το αργότερο μέχρι την ημέρα εμβολιασμού της υπό δοκιμής χημικής ουσίας στο ίζημα.

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το παρασκευασμένο ίζημα που έχει εμβολιαστεί με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή αμέσως. Τα δείγματα του εμβολιασμένου ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή χημική ουσία, μέχρι την ανάλυση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (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, Γερμανία. σ. 107-119.

Προσάρτημα 5

Μέθοδοι καλλιέργειας για τον *Lumbriculus variegatus*

Το είδος *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER) (Lumbriculidae, Oligochaeta) ζει σε ιζήματα γλυκών νερών και χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοτοξικολογικές δοκιμές. Η καλλιέργεια του γίνεται και σε εργαστηριακές συνθήκες. Περίληψη των μεθόδων καλλιέργειας δίνεται στη συνέχεια.

Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι συνθήκες καλλιέργειας για το *Lumbriculus variegatus* περιγράφονται λεπτομερώς στα έγγραφα Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Μια σύντομη σύνοψη αυτών των συνθηκών παρέχεται παρακάτω. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *L. variegatus* είναι η ταχεία αναπαραγωγή, που έχει ως αποτέλεσμα ταχέως αυξανόμενη βιομάζα σε πληθυσμούς εργαστηριακής καλλιέργειας [π.χ. (1), (3), (4), (5)].

Οι σκώληκες μπορούν να αναπαράγονται σε μεγάλα ενυδρεία (57-80 l) στους 23 °C με φωτοπερίοδο 16 L:8 D (100-1 000 lux) με τη χρήση φυσικού νερού που ανανεώνεται ημερησίως (45-50 l ανά ενυδρείο). Το υπόστρωμα παρασκευάζεται με κοπή αλεύκαστων καφέ χαρτιών σε λωρίδες, οι οποίες στη συνέχεια αναμειγνύονται με νερό καλλιέργειας για λίγα δευτερόλεπτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποστρώματος αποτελούμενου από μικρά κομμάτια χαρτιού. Το υπόστρωμα αυτό μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί άμεσα στα ενυδρεία της καλλιέργειας *Lumbriculus* και να καλύψει το κάτω μέρος της δεξαμενής, ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο σε απιονισμένο νερό για μετέπειτα χρήση. Το νέο υπόστρωμα στη δεξαμενή γενικά διαρκεί για περίπου δύο μήνες.

Κάθε καλλιέργεια σκώληκων ξεκινάει με 500-1 000 σκώληκες, ενώ ως τροφή παρέχονται 10 ml εναιωρήματος που περιέχουν 6 g αρχικής τροφής για πέστροφες, 3 φορές την εβδομάδα κάτω από συνθήκες ανανέωσης νερού ή συνεχούς ροής νερού. Ο ρυθμός σίτισης στις στατικές ή ημιστατικές καλλιέργειες θα πρέπει να είναι χαμηλότερος για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αριθμός των ατόμων στην καλλιέργεια γενικά διπλασιάζεται σε περίπου 10 έως 14 ημέρες.

Εναλλακτικά, ο *Lumbriculus variegatus* μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί σε σύστημα που αποτελείται από ένα στρώμα χαλαζιακής άμμου όπως χρησιμοποιείται για το τεχνητό ιζήμα (βάθος 1 - 2 cm), και ανασυσταθέν νερό. Ως δοχεία καλλιέργειας μπορούν να χρησιμοποιούνται γυάλινο περιέκτες ή περιέκτες από ανοξείδωτο χάλυβα ύψους 12 έως 20 cm. Η υδάτινη μάζα υποβάλλεται σε ήπιο αερισμό (π.χ. 2 φουσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος. Για την αποφυγή συσσώρευσης π.χ. αμμωνίας, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αλλάζεται με χρήση συστήματος συνεχούς ροής νερού, ή χειροκίνητα τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Οι ολιγόχαιτοι μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός (ένταση 100 - 1 000 lx) και 8 ώρες σκότους. Στην ημιστατική καλλιέργεια (ανανέωση νερού τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα), οι σκώληκες σιτίζονται με TetraMin δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. 0,6 - 0,8 mg ανά cm² επιφάνειας ιζήματος), που μπορούν να δίνονται ως εναιώρημα 50 mg TetraMin ανά ml απιονισμένου νερού.

Ο *Lumbriculus variegatus* μπορεί να απομακρύνεται από τις καλλιέργειες, π.χ. με μεταφορά σε ένα ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως υποστρώματος μέσω ενός διχτυού λεπτού πλέγματος ή οργανισμών μέσω γυάλινου σιφωνίου με ευρύ στόμιο (διάμετρος περίπου 5 mm) που έχει υποστεί γυάλισμα με φλόγα. Εάν οι σκώληκες μεταφερθούν στο ποτήρι ζέσεως μαζί με υπόστρωμα, το ποτήρι ζέσεως που περιέχει σκώληκες και υπόστρωμα παραμένει όλη τη νύχτα κάτω από συνθήκες συνεχούς ροής νερού, διαδικασία με την οποία απομακρύνεται το υπόστρωμα από το ποτήρι ζέσεως ενώ οι σκώληκες παραμένουν στο κάτω μέρος του δοχείου. Στη συνέχεια, μπορούν να τοποθετηθούν σε προσφάτως παρασκευασμένες δεξαμενές καλλιέργειας ή να υποστούν περαιτέρω κατεργασία για τη δοκιμή, όπως περιγράφεται στα σημεία (3) και (4).

Ένα ζήτημα που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη χρήση του *L. variegatus* σε δοκιμές ιζήματος είναι ο τρόπος αναπαραγωγής του [αρχιτομία ή μορφάλλαξη, π.χ. (6)]. Αυτός ο ασεξουαλικός τρόπος αναπαραγωγής έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο τμημάτων, τα οποία δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο μέχρι την αναγέννηση του μέρους του κεφαλιού ή της ουράς [π.χ. (7)(8)]. Αυτό σημαίνει ότι στον *L. variegatus* η έκθεση μέσω της πρόσληψης μολυσμένου ιζήματος δεν πραγματοποιείται συνεχώς.

Επομένως, θα πρέπει να πραγματοποιείται συγχρονισμός για την ελαχιστοποίηση της μη ελεγχόμενης αναπαραγωγής και αναγέννησης και, κατ' επέκταση, της υψηλής μεταβλητότητας στα αποτελέσματα δοκιμής. Η εν λόγω μεταβλητότητα μπορεί να προκύψει, όταν ορισμένα άτομα, τα οποία έχουν υποστεί κατάτμηση και επομένως δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο, είναι λιγότερο εκτεθειμένα στην υπό δοκιμή χημική ουσία σε σχέση με άλλα άτομα, τα οποία δεν υφίστανται κατάτμηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, π.χ. (9), (10), (11). Οι σκώληκες θα πρέπει να υποστούν τεχνητή κατάτμηση 10 έως 14 ημέρες πριν από την έναρξη της έκθεσης (συγχρονισμός). Μεγαλόσωμοι (ενήλικοι) σκώληκες, που δεν δείχνουν κατά προτίμηση σημεία πρόσφατης μορφάλλαξης θα πρέπει να επιλέγονται για συγχρονισμό. Αυτοί οι σκώληκες μπορούν να τοποθετούνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες σε μια σταγόνα νερού καλλιέργειας και να διατέμνονται στην περιοχή του μέσου σώματος με ένα νυστέρι. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε τα οπίσθια άκρα να είναι παρόμοια μεγέθους. Στη συνέχεια, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να παραμένουν για να αναγεννηθούν νέα κεφάλια μέσα σε ένα δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το ίδιο υπόστρωμα με αυτό που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια και ανασυσταθέν νερό μέχρι την έναρξη της έκθεσης. Η αναγέννηση νέων κεφαλιών υποδεικνύεται από το φώλιασμα των συγχρονισμένων σκώληκων μέσα στο

υπόστρωμα (η παρουσία αναγεννημένων κεφαλιών μπορεί να επιβεβαιώνεται με επιθεώρηση ενός αντιπροσωπευτικού επιμέρους δείγματος με διοφθάλμιο μικροσκόπιο). Μετά τη διαδικασία αυτή, οι οργανισμοί δοκιμής αναμένεται ότι βρίσκονται σε παρόμοια φυσιολογική κατάσταση. Αυτό σημαίνει ότι όταν προκύψει αναπαραγωγή μέσω μορφοπλαξίας σε συγχρονισμένους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αναμένεται ότι σχεδόν όλα τα ζώα θα είναι εκτεθειμένα εξίσου στο εμβολιασμένο ίζημα. Η σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων θα πρέπει να πραγματοποιείται μία φορά μόλις οι σκώληκες αρχίσουν να φωλιάζουν στο υπόστρωμα ή 7 ημέρες μετά τη διατομή τους. Το κάθεστώς σίτισης θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό των κανονικών καλλιιεργειών, ωστόσο ίσως θα ήταν σκόπιμο να γίνεται σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων με την ίδια πηγή τροφής με αυτήν που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Οι σκώληκες θα πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία δοκιμής, στους 20 ± 2 °C. Μετά την αναγέννηση, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άδικτοι ολόκληροι σκώληκες, που κολυμπούν ή σέρνονται ζωηρά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφωνίων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή με τη χρήση βελόνων από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό αυτών των σκωλήκων.

Πηγές για εναρκτήριες καλλιέργειες του *Lumbriculus variegatus* [οι διευθύνσεις στις ΗΠΑ από το (4)]

Ευρώπη

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Γερμανία

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Γερμανία

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Φινλανδία

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Γερμανία

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI
Ιταλία

ΗΠΑ

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

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (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, Μάρτιος 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, σ. 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, Μάρτιος 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.

Προσάρτημα 6

Περίληψη των αποτελεσμάτων της δοκιμής δακτυλίου (ring test)

“Τεστ τοξικότητας ιζήματος σε *Lumbriculus variegatus*”

Πίνακας 1

Αποτελέσματα των επιμέρους δοκιμών δακτυλίου: Μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη στο τέλος της δοκιμής· SD = τυπική απόκλιση· CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

| | μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες | SD | CV (%) | n | μέσος αριθμός σκωλήκων στους μάρτυρες με διαλύτη | SD | CV (%) | n |
|------------------------------|---------------------------------------|-------|--------------|---|--------------------------------------------------|------|--------------|---|
| | 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 |
| διεργαστηριακός μέσος | 29,59 | | 20,10 | | 30,61 | | 13,26 | |
| SD | 8,32 | | 10,03 | | 7,57 | | 10,48 | |
| n | 15 | | | | 15 | | | |
| min | 16,3 | | | | 15,0 | | | |
| max | 42,0 | | | | 43,7 | | | |
| CV (%) | 28,1 | | | | 24,7 | | | |

Πίνακας 2

Αποτελέσματα των επιμέρους δοκιμών δακτυλίου: Μέσο συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη στους μάρτυρες και στους μάρτυρες με διαλύτη στο τέλος της δοκιμής. SD = τυπική απόκλιση. CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

| | συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη (μάρτυρες) | SD | CV (%) | n | συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων ανά επανάληψη (μάρτυρες με διαλύτη) | SD | CV (%) | n |
|------------------------------|-------------------------------------------------------|------|--------------|---|------------------------------------------------------------------|-------|--------------|---|
| | 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 |
| διεργαστηριακός μέσος | 25,15 | | 20,36 | | 27,68 | | 17,53 | |
| SD | 7,87 | | 12,56 | | 7,41 | | 9,10 | |
| n | 15 | | | | 15 | | | |
| min | 12,9 | | | | 10,5 | | | |
| max | 41,3 | | | | 41,4 | | | |
| CV (%) | 31,3 | | | | 26,8 | | | |

Πίνακας 3

Τοξικότητα του PCP: Περίληψη των τελικών σημείων στη δοκιμή δακτυλίου· διεργαστηριακός μέσος για EC₅₀, NOEC και LOEC· SD = τυπική απόκλιση· CV = συντελεστής μεταβλητότητας.

| βιολογική παράμετρος | | Διεργαστηριακός μέσος (mg/kg) | min | max | Διεργαστηριακός συντελεστής | SD | CV (%) | γεωμετρικός μέσος (mg/kg) |
|-------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------|------|-----------------------------|------|--------|---------------------------|
| συνολικός αριθ. σκωλήκων | EC ₅₀ | 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 |
| | MDD (%) | 22,5 | 7,1 | 39,1 | | | | |
| συνολικό ξηρό βάρος σκωλήκων | EC ₅₀ | 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 |
| | MDD (%) | 24,8 | 10,9 | 44,7 | | | | |
| θνησιμότητα/ επιβίωση | LC ₅₀ | 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 |
| αναπαραγωγή (αύξηση του αριθμού των σκωλήκων ανά επανάληψη) | EC ₅₀ | 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 |
| | MDD (%) | 29,7 | 13,9 | 47,9 | | | | |
| ανάπτυξη (αύξηση της βιομάζας ανά επανάληψη) | EC ₅₀ | 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 |
| | MDD (%) | 32,2 | 13,6 | 65,2 | | | | |

MDD: ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά από τις τιμές του μάρτυρα κατά τις δοκιμές υπόθεσης· χρησιμοποιείται ως μέτρο στατιστικής ισχύος

ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ

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.

Γ.36 ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΡΠΑΚΤΙΚΟΥ ΑΚΑΡΕΟΣ [HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER] ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 226 του ΟΟΣΑ (2008). Δεδομένου ότι προορίζεται να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των επιδράσεων χημικών ουσιών που περιέχει το έδαφος στην αναπαραγωγική απόδοση του είδους ακάρεων του εδάφους *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), επιτρέπει την εκτίμηση της αναστολής του ρυθμού ανάπτυξης του συγκεκριμένου πληθυσμού (1,2). Ως αναπαραγωγική απόδοση νοείται στην παρούσα μέθοδο ο αριθμός νεαρών ακάρεων στο τέλος της περιόδου δοκιμής. Το είδος *H. aculeifer* αντιπροσωπεύει ένα τροφικό επίπεδο επιπλέον των ειδών για τα οποία υπάρχουν ήδη μέθοδοι δοκιμών. Για τον σκοπό της παρούσας μεθόδου δοκιμών κρίνεται κατάλληλη μια δοκιμή αναπαραγωγής χωρίς διάκριση ούτε ποσοτικοποίηση των διαφόρων σταδίων του αναπαραγωγικού κύκλου. Για τις χημικές ουσίες με άλλο σενάριο έκθεσης πλην του εδάφους θα μπορούσαν να ενδεικνύονται άλλες προσεγγίσεις (3).
2. Το άκαρι *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* θεωρείται αντιπροσωπευτικό της πανίδας του εδάφους και, ειδικότερα, των αρπακτικών ακάρεων. Πρόκειται για είδος με παγκόσμια εξάπλωση (5), το οποίο μπορεί εύκολα να συλλέγεται και να εκτρέφεται στο εργαστήριο. Στο προσάρτημα 7 παρέχεται περιλήψη των βιολογικών χαρακτηριστικών του *H. aculeifer*. Πληροφορίες τεκμηρίωσης για την οικολογία των ειδών ακάρεων και τη χρήση τους σε οικοτοξικολογικές δοκιμές υπάρχουν στις δημοσιεύσεις (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

3. Ενήλικα θηλυκά εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμειχθεί με έδαφος. Η δοκιμή αρχίζει με 10 ενήλικα θηλυκά ανά δοχείο επανάληψης (replicate). Δεν εισάγονται αρσενικά στη δοκιμή, διότι από την πείρα προκύπτει ότι, παρουσία αρσενικών, τα θηλυκά συζεύγνυται αμέσως ή σχεδόν αμέσως μετά την εκκόλαψη από το δεύτερο νυμφικό στάδιο (δευτερονύμφη). Επιπροσθέτως, η παρουσία αρσενικών θα παρέτεινε τη δοκιμή κατά τρόπο που θα καθιστούσε αναγκαία την απαιτητική διάκριση μεταξύ ηλικιακών σταδίων. Συνεπώς, η σύζευξη δεν συμπεριλαμβάνεται στη δοκιμή. Τα θηλυκά εισάγονται στη δοκιμή 28-35 ημέρες μετά την έναρξη της περιόδου αναπαραγωγής των αυγών κατά τον συγχρονισμό (βλ. προσάρτημα 4), διότι τότε μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν ήδη συζευχθεί και έχουν περάσει το στάδιο της πρωοτοκίας. Στους 20 °C η δοκιμή τερματίζεται την 14η ημέρα από την εισαγωγή των θηλυκών (ημέρα 0), διάστημα που επιτρέπει στον πρώτο απόγονο-μάρτυρα να φτάσει στο στάδιο της δευτερονύμφης (βλ. προσάρτημα 4). Για την κύρια μετρούμενη μεταβλητή, προσδιορίζονται ο αριθμός νεαρών ατόμων ανά δοχείο δοκιμής και, επιπροσθέτως, ο αριθμός επιζώντων θηλυκών. Η αναπαραγωγική απόδοση των ακάρεων που εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία συγκρίνεται με εκείνη των μαρτύρων ώστε να προσδιοριστεί η τιμή EC_x (e.g. EC_{10} , EC_{50}) ή η συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης (NOEC) (για τους ορισμούς, βλ. προσάρτημα 1), ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος (βλ. σημείο 29). Επισκόπηση του χρονοδιαγράμματος της δοκιμής παρατίθεται στο προσάρτημα 8.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

4. Θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά η υδατοδιαλυτότητα, η τιμή $\log K_{ow}$, ο συντελεστής κατανομής μεταξύ εδάφους και νερού και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Είναι σκόπιμο να υπάρχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως ο ρυθμός βιοτικής και αβιοτικής αποικοδόμησης.
5. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για υδατοδιαλυτές ή μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας διαφέρει ανάλογα. Η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε πηκτικές χημικές ουσίες, δηλ. σε χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής μεταξύ αέρα και νερού είναι μεγαλύτερα από τη μονάδα ή η τάση ατμών υπερβαίνει το 0,0133 Pa στους 25 °C.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Για να θεωρείται έγκυρο ένα αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στους μάρτυρες που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή:
 - Η μέση θνησιμότητα των ενήλικων θηλυκών ατόμων θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής.
 - Ο μέσος αριθμός των νεαρών ατόμων ανά δοχείο επανάληψης (όπου έχουν εισαχθεί 10 ενήλικα θηλυκά) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 50 στο τέλος της δοκιμής.
 - Ο συντελεστής μεταβλητότητας που υπολογίζεται για τον αριθμό των νεαρών ακάρεων ανά δοχείο επανάληψης θα πρέπει να μην υπερβαίνει το 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

7. Πρέπει να προσδιορίζονται η EC_x και/ή NOEC μιας χημικής ουσίας αναφοράς ώστε να διασφαλίζεται ότι οι συνθήκες της εργαστηριακής δοκιμής είναι κατάλληλες και να επαληθεύεται ότι η απόκριση των οργανισμών δοκιμής δεν αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Ο εστέρας dimethoate (CAS 60-51-5) είναι κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς, η οποία έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στο μέγεθος του πληθυσμού (4). Ως εναλλακτική χημική ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί το βορικό οξύ (CAS 10043-35-3), η εμπειρία με το οποίο είναι μικρότερη. Υπάρχουν δύο εναλλακτικές δυνατότητες σχεδιασμού:
- Η χημική ουσία αναφοράς μπορεί να υποβληθεί στη δοκιμή παράλληλα με τον προσδιορισμό της τοξικότητας κάθε υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μία συγκέντρωση, για την οποία πρέπει να έχει προηγουμένως καταδειχθεί, σε μελέτη δόσης-απόκρισης, ότι έχει ως αποτέλεσμα μείωση των απογόνων κατά > 50 %. Στην περίπτωση αυτή, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι ο ίδιος όπως στους μάρτυρες (βλ. σημείο 29).
 - Εναλλακτικά, η χημική ουσία αναφοράς ελέγχεται 1 - 2 φορές ετησίως με δοκιμή δόσης-απόκρισης. Ο αριθμός των συγκεντρώσεων και επαναλήψεων και ο συντελεστής διαστήματος (βλ. σημείο 29) διαφέρουν ανάλογα με τον σχεδιασμό που έχει επιλεγεί, αλλά ως απόκριση θα πρέπει να επιτυγχάνεται επίδραση 10-90 % (συντελεστής διαστήματος 1,8). Η τιμή EC₅₀ για το dimethoate βάσει του αριθμού νεαρών ατόμων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3,0 και 7,0 mg δραστικής ουσίας/kg εδάφους (βάρος ξηρού). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με το βορικό οξύ μέχρι σήμερα, η τιμή EC₅₀ βάσει του αριθμού νεαρών ατόμων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 100 και 500 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δοχεία και εξοπλισμός δοκιμής

8. Πρέπει να χρησιμοποιούνται δοχεία δοκιμής διαμέτρου 3-5 cm (ύψος εδάφους ≥ 1,5 cm), κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλο χημικά αδρανές υλικό και εφοδιασμένα με κάλυμμα που εφαρμόζει πολύ καλά. Προτιμώνται τα βιδωτά πώματα και, στην περίπτωση αυτή, τα δοχεία είναι δυνατόν να αερίζονται δύο φορές εβδομαδιαίως. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλύμματα που επιτρέπουν την απευθείας ανταλλαγή αερίων μεταξύ του υποστρώματος και της ατμόσφαιρας (π.χ. γάζα). Επειδή πρέπει να διατηρείται υψηλή υγρασία στη διάρκεια της δοκιμής, είναι απαραίτητο να ελέγχεται το βάρος κάθε πειραματικού δοχείου κατά τη διάρκεια της δοκιμής και, αν είναι ανάγκη, να αναπληρώνεται το νερό. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερος σημαντικός, αν δεν υπάρχουν βιδωτά πώματα. Αν χρησιμοποιείται αδιαφανές δοχείο δοκιμής, το πώμα θα πρέπει να είναι κατασκευασμένο από υλικό που επιτρέπει την πρόσβαση στο φως (π.χ. μέσω διάτρητου διαφανούς καλύμματος), εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διαφυγή των ακάρεων. Το μέγεθος και το είδος των δοχείων δοκιμής εξαρτάται από τη μέθοδο εξαγωγής (για λεπτομέρειες, βλ. προσάρτημα 5). Αν εφαρμόζεται θερμική εξαγωγή απευθείας στο δοχείο δοκιμής, είναι δυνατόν να προστεθεί δικτυωτός πυθμένας με κατάλληλο μέγεθος οπών (σφραγισμένος έως την εξαγωγή), ενώ το βάθος του εδάφους θα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η βαθμίδωση της θερμοκρασίας και της υγρασίας.
9. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:
- κατά προτίμηση γυάλινα δοχεία με βιδωτά πώματα·
 - ξηραντήριο·
 - στερεοσκοπικό μικροσκόπιο·
 - ψήκτρες για τη μεταφορά των ακάρεων·
 - πεχάμετρο και φωτόμετρο luxmeter·
 - κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας·
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας του αέρα (δεν είναι απαραίτητος εάν τα δοχεία έκθεσης καλύπτονται με πώματα)·
 - επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας·
 - εξοπλισμός εξαγωγής (βλ. προσάρτημα 5) (13)
 - φωτιστικό οροφής τύπου πάνελ με ρυθμιζόμενη φωτεινή ένταση·
 - κώδωνες συλλογής των εξαγόμενων ακάρεων.

Παρασκευή του τεχνητού εδάφους

10. Για την παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται τεχνητό έδαφος που αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά (όλες οι τιμές βασίζονται σε ξηρή μάζα):
- 5 % τύρφης σφάγγων, αερόξηρης και λεπτοαλεσμένης (είναι αποδεκτό μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm)·
 - 20 % καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση πάνω από 30 %)·
 - περίπου 74 % αερόξηρης, βιομηχανικής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα CaCO_3 που απαιτείται), όπου θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %. Η ακριβής ποσότητα της άμμου εξαρτάται από την ποσότητα του CaCO_3 (βλ. κατωτέρω), ώστε το άθροισμά τους να ισούται με 75 %·
 - < 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3 , κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας), για να επιτευχθεί pH $6,0 \pm 0,5$ · η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστεθεί ενδέχεται να εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα/το είδος της τύρφης (βλ. σημείωση 1).

Σημείωση 1: Η απαιτούμενη ποσότητα CaCO_3 εξαρτάται από τα συστατικά του εδαφικού υποστρώματος και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μέτρηση του pH των μερικών δειγμάτων εδάφους αμέσως πριν από τη δοκιμή (14).

Σημείωση 2: Η περιεκτικότητα του τεχνητού εδάφους σε τύρφη αποκλίνει από άλλες μεθόδους δοκιμών σε οργανισμούς του εδάφους, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται 10 % τύρφης [π.χ. (15)]. Ωστόσο, κατά τον οργανισμό φυτοπροστασίας ΕΡΡΟ (16), ένα τυπικό γεωργικό έδαφος δεν περιέχει πάνω από 5 % οργανικής ύλης και, συνεπώς, η μείωση της περιεκτικότητας σε τύρφη αντικατοπτρίζει τις μειωμένες πιθανότητες προσρόφησης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε οργανικό άνθρακα στο φυσικό έδαφος.

Σημείωση 3: Εάν απαιτείται, π.χ. για συγκεκριμένους σκοπούς δοκιμής, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως υπόστρωμα δοκιμής και/ή καλλιέργειας. Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται με βάση τουλάχιστον την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH, την υφή (κατανομή μεγέθους σωματιδίων) και την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη. Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στον χαρακτηρισμό, εφόσον είναι γνωστά, ο τύπος και το όνομα του εδάφους σύμφωνα με την ταξινόμηση των εδαφών, το δε έδαφος θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ρύπανση. Στην περίπτωση που η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι μέταλλο ή οργανομεταλλική ένωση, θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται η κατιοανταλλακτική ικανότητα (CEC) του φυσικού εδάφους. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να αποδίδεται στην ικανοποίηση των κριτηρίων εγκυρότητας, δεδομένου ότι κατά κανόνα σπανίζουν οι πληροφορίες τεκμηρίωσης για τα φυσικά εδάφη.

11. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμειγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμείκτη μεγάλης κλίμακας). Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M ή χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) 0,01 M σε αναλογία 1:5 [βλ. (14) και προσάρτημα 3]. Εάν η οξύτητα του εδάφους υπερβαίνει το απαιτούμενο εύρος τιμών (βλ. σημείο 10), μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας CaCO_3 . Αν το έδαφος είναι υπερβολικά αλκαλικό, μπορεί να διορθωθεί με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του μείγματος που περιέχει τα πρώτα τρία συστατικά που περιγράφονται στο σημείο 10, εξαιρουμένου του CaCO_3 .
12. Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 2. Δύο έως επτά ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, το ξηρό τεχνητό έδαφος προϋγραίνεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε νερό, η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 % και 60 % της μέγιστης WHC. Η υγρασία ρυθμίζεται στο 40-60 % της μέγιστης WHC με την προσθήκη του διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και/ή αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού (βλ. παραγράφους 16-18). Επιπροσθέτως, η υγρασία του εδάφους θα πρέπει να ελέγχεται κατά προσέγγιση με ήπια συμπίεση του εδάφους στην παλάμη του χεριού: εάν η υγρασία είναι σωστή, θα πρέπει να εμφανίζονται μικρές σταγόνες νερού μεταξύ των δακτύλων.
13. Η υγρασία του εδάφους προσδιορίζεται στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105 °C, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11465 (17), και το pH του εδάφους σύμφωνα με το προσάρτημα 3 ή το πρότυπο ISO 10390 (14). Οι μετρήσεις αυτές θα πρέπει να εκτελούνται σε πρόσθετα δείγματα χωρίς ακάρεα, λαμβανόμενα τόσο από το έδαφος-μάρτυρα όσο και από κάθε έδαφος με συγκέντρωση δοκιμής. Το pH του εδάφους δεν πρέπει να ρυθμίζεται όταν υποβάλλονται σε δοκιμή οξεία ή βάσεις. Η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με περιοδική ζύγιση των δοχείων (βλ. παραγράφους 20 και 24).

Επιλογή και προετοιμασία των υπό δοκιμή ζώων

14. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι το *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Για την έναρξη της δοκιμής απαιτούνται ενήλικα θηλυκά ακάρεα από συγχρονισμένη κούρτη. Τα ακάρεα θα πρέπει να εισάγονται περίπου 7-14 ημέρες μετά την ενηλικίωσή τους, 28-35 ημέρες μετά την έναρξη της εναπόθεσης των αυγών κατά τον συγχρονισμό (βλ. σημείο 3 και προσάρτημα 4). Θα πρέπει να καταγράφεται η πηγή των ακάρεων ή ο προμηθευτής και η διατήρηση της εργαστηριακής καλλιέργειας. Αν διατηρείται εργαστηριακή καλλιέργεια, συνιστάται να επιβεβαιώνεται η ταυτότητα του είδους τουλάχιστον μία φορά ετησίως. Στο προσάρτημα 6 περιλαμβάνεται φύλλο ταυτοποίησης.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

15. Η υπό δοκιμή χημική ουσία αναμειγνύεται με το έδαφος. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να υποβοηθήσουν την αγωγή του εδάφους με την υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να επιλέγονται βάσει της χαμηλής τους τοξικότητας για τα ακάρεα και στον σχεδιασμό της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνεται κατάλληλος μάρτυρας με τον διαλύτη (βλ. σημείο 29).

Υπό δοκιμή χημική ουσία διαλυτή στο νερό

16. Παρασκευάζεται διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε απιονισμένο νερό, σε ποσότητα που επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκεντρώσεως δοκιμής. Συνιστάται να χρησιμοποιείται η κατάλληλη ποσότητα νερού για την επίτευξη της απαιτούμενης υγρασίας, δηλ. 40 έως 60 % της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (βλ. σημείο 12). Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμειγνύεται πλήρως με μία παρτίδα του προϋγραθέντος εδάφους πριν από την εισαγωγή του στο δοχείο δοκιμής.

Υπό δοκιμή χημική ουσία αδιάλυτη στο νερό

17. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλύεται στον μικρότερο δυνατό όγκο κατάλληλου φορέα (π.χ. ακετόνης). Μόνο πηκτικοί διαλύτες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Όταν χρησιμοποιούνται τέτοιοι φορείς, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής και ο μάρτυρας θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ελάχιστη ποσότητα φορέα. Ο φορέας ψεκάζεται σε μικρή ποσότητα, π.χ. 10 g, λεπτής χαλαζιακής άμμου ή αναμειγνύεται με αυτήν. Η συνολική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε άμμο θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την ποσότητα αυτή. Ο φορέας απομακρύνεται με εξάτμιση σε απαγωγή επί τουλάχιστον μία ώρα. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως με αυτό μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη υγρασία. Το τελικό μείγμα εισάγεται στα δοχεία δοκιμής. Να σημειωθεί ότι ορισμένοι διαλύτες μπορεί να είναι τοξικοί για τα ακάρεα. Συνεπώς, συνιστάται να χρησιμοποιείται πρόσθετος μάρτυρας με νερό χωρίς φορέα, αν δεν είναι γνωστή η τοξικότητα του διαλύτη για τα ακάρεα. Αν καταδειχθεί επαρκώς η απουσία επίδρασης του διαλύτη (στις συγκεντρώσεις που πρόκειται να εφαρμοστούν), μπορεί να παραλειφθεί ο μάρτυρας με νερό.

Υπό δοκιμή χημική ουσία δυσδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

18. Όταν πρόκειται για χημικές ουσίες δυσδιάλυτες στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, αναμειγνύεται το ισοδύναμο 2,5 g λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής (για παράδειγμα 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για τέσσερις επαναλήψεις) με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, για να ληφθεί η επιθυμητή συγκεντρωμένη δοκιμή. Η συνολική περιεκτικότητα του υποστρώματος σε άμμο θα πρέπει να διορθώνεται ως προς την ποσότητα αυτή. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο προϋγραθέν έδαφος και αναμειγνύεται πλήρως με αυτό μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού για να επιτευχθεί η απαιτούμενη υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκεντρωμένη δοκιμή και παρασκευάζεται επίσης κατάλληλος μάρτυρας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**Ομάδες δοκιμής και μάρτυρες**

19. Συνιστώνται δέκα ενήλικα θηλυκά σε 20 g ξηρής μάζας τεχνητού εδάφους για κάθε μάρτυρα και δοχείο αγωγής. Οι οργανισμοί δοκιμής θα πρέπει να προστίθενται εντός δύο ωρών από την παρασκευή του τελικού υποστρώματος δοκιμής (δηλ. μετά την εφαρμογή του δοκιμίου). Σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. όταν η γήρανση του εδάφους θεωρείται καθοριστικός παράγοντας), το χρονικό διάστημα μεταξύ της παρασκευής του τελικού υποστρώματος δοκιμής και της προσθήκης των ακάρεων μπορεί να παραταθεί [για λεπτομέρειες σχετικά με τη γήρανση, βλ. (18)]. Ωστόσο, σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να παρέχεται επιστημονική αιτιολογία.

20. Μετά την προσθήκη τους στο έδαφος, τα ακάρεα σιτίζονται και μετρίεται το αρχικό βάρος κάθε δοχείου δοκιμής, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αναφοράς για την παρακολούθηση της υγρασίας του εδάφους σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής, όπως περιγράφεται στο σημείο 24. Στη συνέχεια, τα δοχεία δοκιμής καλύπτονται όπως περιγράφεται στο σημείο 8 και τοποθετούνται στον θάλαμο δοκιμής.
21. Ετοιμάζονται οι κατάλληλοι μάρτυρες για καθεμία από τις μεθόδους εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που περιγράφονται στις παραγράφους 15 έως 18. Για την ετοιμασία των μαρτύρων εφαρμόζονται οι αντίστοιχες διαδικασίες που περιγράφονται, χωρίς όμως να προστίθεται η υπό δοκιμή χημική ουσία. Συνεπώς, εφαρμόζονται στους μάρτυρες, ανάλογα με την περίπτωση, οργανικοί διαλύτες, χαλαζιακή άμμος ή άλλοι φορείς στις ίδιες συγκεντρώσεις/ποσότητες όπως στις διάφορες αγωγές. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης ή άλλος φορέας για την προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει επίσης να ετοιμάζεται και να ελέγχεται ένας επιπλέον μάρτυρας χωρίς τον φορέα ή την υπό δοκιμή χημική ουσία, σε περίπτωση που η τοξικότητα του διαλύτη δεν είναι γνωστή (βλ. σημείο 17).

Συνθήκες δοκιμής

22. Η θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C, να καταγράφεται τουλάχιστον σε ημερήσια βάση και να ρυθμίζεται, αν χρειαστεί. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκότους (κατά προτίμηση, 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux κοντά στα δοχεία δοκιμής. Για λόγους συγκρισιμότητας, οι συνθήκες αυτές είναι οι ίδιες όπως σε άλλες οικοτοξικολογικές δοκιμές εδάφους [π.χ. (15)].
23. Η ανταλλαγή αερίων πρέπει να εξασφαλίζεται με αερισμό των δοχείων δοκιμής τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται βιδωτά πώματα. Αν χρησιμοποιούνται καλύμματα από γάζα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη διατήρηση της υγρασίας του εδάφους (βλ. παραγράφους 8 και 24).
24. Η περιεκτικότητα του εδαφικού υποστρώματος σε νερό στα δοχεία δοκιμής διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής με ζύγιση και, αν χρειαστεί, με περιοδική προσθήκη νερού στα δοχεία (π.χ. μία φορά εβδομαδιαίως). Οι απώλειες αναπληρώνονται, όταν χρειάζεται, με αποιονισμένο νερό. Η υγρασία κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να μη διαφέρει περισσότερο από 10 % από την αρχική τιμή.

Σίτιση

25. Τα ακάρεα των τυριών [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] έχουν αποδειχθεί καλή πηγή σίτισης. Κατάλληλα μπορεί να είναι επίσης (21) μικρά κολλέμβολα [π.χ. *Folsomia candida* Willem, 1902 ή *Onychiurus fimatus* (19), (20)], *enchytraeids* (π.χ. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ή νηματώδεις (π.χ. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913). Συνιστάται να ελέγχεται η τροφή πριν από τη χρήση σε δοκιμή. Το είδος και η ποσότητα της τροφής θα πρέπει να καλύπτει επαρκή αριθμό νεαρών ατόμων ώστε να πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας (σημείο 6). Για την επιλογή της λείας θα πρέπει να εξετάζεται ο τρόπος δράσης του δοκιμίου (π.χ. ένα ακαρεοκτόνο μπορεί να είναι τοξικό και για τα ακάρεα τροφίμων, βλ. σημείο 26).
26. Η τροφή θα πρέπει να παρέχεται κατά βούληση (*ad libitum*), δηλ. κάθε φορά μικρή ποσότητα (στην άκρη μιας σπάτουλας). Για τον σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης συσκευή ροής αέρα με χαμηλή αναρρόφηση, όπως η προτεινόμενη στη δοκιμή σε κολλέμβολα, ή ένα λεπτό πινέλο. Συνήθως αρκεί η χορήγηση τροφής στην αρχή της δοκιμής και, κατόπιν, δύο έως τρεις φορές εβδομαδιαίως. Όταν το δοκίμιο φαίνεται να είναι τοξικό για τη λεία, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αυξημένου ρυθμού σίτισης και/ή εναλλακτική πηγή τροφής.

Επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής

27. Αν είναι εκ των προτέρων γνωστή η τοξικότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, π.χ. από μελέτες προσδιορισμού εύρους τιμών, διευκολύνεται η επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής. Αν χρειαστεί, διεξάγεται δοκιμή προσδιορισμού του εύρους τιμών με πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ 0,1 και 1 000 mg/kg ξηρού εδάφους, με τουλάχιστον μία επανάληψη για τις αγωγές και τον μάρτυρα. Η διάρκεια της δοκιμής προσδιορισμού εύρους τιμών είναι 14 ημέρες, μετά την παρέλευση των οποίων προσδιορίζονται η θνησιμότητα των ενήλικων ακάρεων και ο αριθμός των νεαρών ατόμων. Το εύρος συγκεντρώσεων για την τελική δοκιμή θα πρέπει κατά προτίμηση να επιλέγεται έτσι ώστε να περικλείει συγκεντρώσεις που επιδρούν στον αριθμό των νεαρών ατόμων, αλλά δεν επιδρούν στην επιβίωση της μητρικής γενεάς. Αυτό πάντως δεν είναι ίσως δυνατό όταν πρόκειται για χημικές ουσίες που έχουν θανατηφόρες και υποθανατηφόρες επιδράσεις σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση επίδρασης (π.χ. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να καλύπτονται από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Η προεκβολή σε τιμές πολύ χαμηλότερες από την κατώτατη συγκέντρωση που έχει επίδραση στους οργανισμούς δοκιμής ή υψηλότερες από την ανώτατη συγκέντρωση που ελέγχθηκε επιτρέπεται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις και θα πρέπει να αιτιολογείται πλήρως στην έκθεση.

Σχεδιασμός του πειράματος

Δοκιμές δόσης-απόκρισης

28. Προτείνονται τρεις σχεδιασμοί, βάσει των συστάσεων που προκύπτουν από άλλη δοκιμή δακτυλίου [δοκιμή αναπαραγωγής *enchytraeid* (22)]. Η γενική καταλληλότητα όλων αυτών των σχεδιασμών επιβεβαιώθηκε με το αποτέλεσμα της επικύρωσης σε *H. aculeifer*.
29. Κατά τον καθορισμό του εύρους συγκεντρώσεων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:
- Για τον προσδιορισμό της EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}), θα πρέπει να ελέγχονται δώδεκα συγκεντρώσεις. Συνιστώνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις με μάρτυρες. Ο συντελεστής διασπείρωσης μπορεί να διαφέρει, δηλ. να είναι μικρότερος ή ίσος με 1,8 στο αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων επίδρασης και πάνω από 1,8 στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση.
 - Για τον προσδιορισμό της NOEC, θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση δοκιμής συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 2,0.
 - Με μια συνδυαστική προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός και της NOEC και της EC_x . Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστώνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή συν οκτώ μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να απέχουν κατά συντελεστή που δεν υπερβαίνει το 1,8.

Οριακή δοκιμή

30. Αν δεν παρατηρηθούν επιδράσεις στην ανώτατη συγκέντρωση κατά τη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών (δηλ. 1 000 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους), η οριστική δοκιμή αναπαραγωγής είναι δυνατόν να διεξαχθεί ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση συγκέντρωσης δοκιμής ίσης με 1 000 mg/kg βάρους ξηρού εδάφους. Η οριακή δοκιμή δίνει τη δυνατότητα να καταδειχθεί ότι η NOEC ή η EC_{10} για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από την οριακή συγκέντρωση, ενώ ελαχιστοποιείται ο αριθμός των ακάρεων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις, τόσο για το έδαφος αγωγής όσο και για τον μάρτυρα.

Διάρκεια της δοκιμής και μετρήσεις

31. Τυχόν παρατηρούμενες διαφορές ως προς τη συμπεριφορά και τη μορφολογία των ακάρεων μεταξύ των δοχείων-μαρτύρων και των υπό αγωγή δοχείων θα πρέπει να καταγράφονται.
32. Την 14η μέρα τα επιζώντα ακάρεα εξάγονται από το έδαφος με θερμότητα/φωτεινή ακτινοβολία ή με άλλη κατάλληλη μέθοδο (βλ. προσάρτημα 5). Καταμετρώνται ξεχωριστά τα νεαρά άτομα (δηλ. προνύμφες, πρωτόνυμφες και δευτερόνυμφες) και τα ακμαία. Τυχόν ενήλικα ακάρεα που δεν παρατηρούνται κατά τη χρονική αυτή στιγμή καταγράφονται ως νεκρά, με την παραδοχή ότι πέθαναν και αποσυντέθηκαν πριν από την αξιολόγηση. Η απόδοση της εξαγωγής πρέπει να επικυρώνεται μία ή δύο φορές ετησίως σε μάρτυρες με γνωστό αριθμό ενήλικων και νεαρών ατόμων. Η απόδοση θα πρέπει να είναι πάνω από 90 %, κατά μέσον όρο, για τον συνδυασμό όλων των αναπτυξιακών σταδίων (βλ. προσάρτημα 5). Δεν γίνεται διόρθωση του αριθμού των ενήλικων και νεαρών ατόμων για να ληφθεί υπόψη η απόδοση.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

33. Στις παραγράφους 36 έως 41 παρατίθενται πληροφορίες για τις στατιστικές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Επιπροσθέτως, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (31) (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: οδηγίες για την εφαρμογή).
34. Το κύριο τελικό σημείο της δοκιμής είναι η αναπαραγωγική απόδοση, εν προκειμένω ο αριθμός νεαρών ατόμων ανά δοχείο επαναληπτικής δοκιμής (όπου έχουν εισαχθεί 10 ενήλικα θηλυκά ακάρεα). Η στατιστική ανάλυση απαιτεί να υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος (\bar{X}) και η διασπορά (s^2) για την αναπαραγωγική απόδοση ανά αγωγή και ανά μάρτυρα. Οι τιμές \bar{X} και s^2 χρησιμοποιούνται για τις διαδικασίες ANOVA, όπως οι δοκιμασίες Student's *t* test, Dunnett ή Williams, καθώς και για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95 %.

Σημείωση: Αυτό το κύριο τελικό σημείο είναι ισοδύναμο με τη γονιμότητα που μετρείται ως το πηλίκο του αριθμού των ζώντων νεαρών ατόμων που παράγονται κατά τη δοκιμή δια του αριθμού των γονικών θηλυκών που εισάγονται στην αρχή της δοκιμής.

35. Ο αριθμός των επιζώντων θηλυκών στους μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή αποτελεί σημαντικό κριτήριο εγκυρότητας και θα πρέπει να τεκμηριώνεται. Όπως και στη δοκιμή προσδιορισμού εύρους τιμών, κάθε άλλη ένδειξη πρόκλησης βλάβης θα πρέπει να αναφέρεται και στην τελική έκθεση.

EC_x

36. Υπολογίζονται οι τιμές EC_x, συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο που περιγράφεται στο σημείο 34, με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (π.χ. ανάλυση probit, λογιστική καμπύλη ή συνάρτηση Weibull, σταθμισμένη μέθοδος Spearman-Kärber ή απλή παρεμβολή). Η EC_x λαμβάνεται με την εισαγωγή στην προκύπτουσα εξίσωση τιμής που να αντιστοιχεί στο x % της μέσης τιμής για τον μάρτυρα. Για τον υπολογισμό της EC₅₀ ή οποιασδήποτε άλλης EC_x, οι μέσες τιμές (X) ανά αγωγή θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση παλινδρόμησης.

NOEC/LOEC

37. Εάν πρόκειται να γίνει στατιστική ανάλυση για τον προσδιορισμό των NOEC/LOEC, απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι (σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). Γενικώς, οι δυσμενείς επιδράσεις του δοκιμίου σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται με δοκιμασία μονόπλευρης (ελάσσονος) υπόθεσης με $p \leq 0,05$. Παραδείγματα παρέχονται στις επόμενες παραγράφους.
38. Η κανονική κατανομή των δεδομένων μπορεί να ελεγχθεί, π.χ. με τη δοκιμασία ποιότητας προσαρμογής Kolmogorov-Smirnov, τη δοκιμασία λόγου εύρους προς τυπική απόκλιση (δοκιμασία R/s) ή τη δοκιμασία Shapiro-Wilk (αμφίπλευρη, $p \leq 0,05$). Για τον έλεγχο της ομοιογένειας της διασποράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι δοκιμασίες Cochran, Levene ή Bartlett (αμφίπλευρες, $p \leq 0,05$). Αν πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογενής διασπορά), μπορούν να διεξαχθούν μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και οι επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές συγκρίσεις (π.χ. Dunnett's t test) ή δοκιμασίες φθίνουσας τάσης (π.χ. δοκιμασία Williams σε περίπτωση μονότονης σχέσης δόσης-απόκρισης) για να υπολογιστεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων του δοκιμίου (επιλογή της συνιστώμενης δοκιμασίας σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). Διαφορετικά, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. Bonferroni-U test κατά Holm ή δοκιμασία τάσης κατά Jonckheere-Terpstra) για τον προσδιορισμό των τιμών NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

39. Εάν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμασίας (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (t-test). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνωτης διασποράς (Welch t-test) ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Mann-Whitney-U-test.
40. Για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τους ελέγχους αυτούς δεν εντοπιστούν σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

41. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

— Υπό δοκιμή χημική ουσία

- ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όνομα, αριθμός φορτίου, αριθμός παρτίδας και αριθμός CAS, καθαρότητα·
- φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας [π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και, κατά προτίμηση, πληροφορίες για την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος].

— Οργανισμοί δοκιμής

- ταυτοποίηση και προμηθευτής των οργανισμών δοκιμής, περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας·
- ηλικία των οργανισμών δοκιμής.

- Συνθήκες δοκιμής
 - περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και της πειραματικής διαδικασίας·
 - λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του εδάφους δοκιμής· λεπτομερείς προδιαγραφές στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος (προέλευση, ιστορικό, κατανομή μεγέθους σωματιδίων, pH, περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και, αν είναι γνωστή, ταξινόμηση του εδάφους)·
 - μέγιστη υδατοχωρητικότητα του εδάφους·
 - περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος·
 - λεπτομέρειες των βοηθητικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας·
 - μέγεθος των δοχείων δοκιμής και ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής ανά δοχείο·
 - συνθήκες δοκιμής: ένταση του φωτός, διάρκεια των κύκλων φωτός-σκότους, θερμοκρασία·
 - περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, του είδους και της ποσότητας της τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης·
 - pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής (μάρτυρας και κάθε αγωγή)·
 - λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου εξαγωγής και της απόδοσης της εξαγωγής·
- Αποτελέσματα της δοκιμής
 - αριθμός νεαρών ατόμων που προσδιορίστηκε σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·
 - αριθμός ενήλικων θηλυκών ατόμων και θνησιμότητα των ενήλικων (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής·
 - περιγραφή των εμφανών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς·
 - τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς·
 - συνοπτικά στατιστικά στοιχεία (EC_x και/ή NOEC) συμπεριλαμβανομένων ορίων εμπιστοσύνης 95 % και περιγραφής της μεθόδου υπολογισμού·
 - γραφική παράσταση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης·
 - αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής·

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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 σελίδες.
- (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, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: σ. 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: σ. 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, σ. 239-251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Rømbke, 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 σελίδες.
- (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, Γενεύη.
- (15) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος — Τοξικότητα για τους γαιοσκώληκες.
- (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, Γενεύη.
- (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) Κεφάλαιο Γ.32 του παρόντος παραρτήματος- Δοκιμή αναπαραγωγής σε *Enchytraeid*.
- (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, Γενεύη.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 σελίδες.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 σελίδες.
- (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.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί (σε αυτήν τη δοκιμή όλες οι συγκεντρώσεις επίδρασης εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής):

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

NOEC (συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης): η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση. Στην παρούσα δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενης επίδρασης): η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

EC_x (αποτελεσματική συγκέντρωση για το x % της επίδρασης): η συγκέντρωση που προκαλεί το x % της επίδρασης στους οργανισμούς δοκιμής εντός συγκεκριμένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με μάρτυρα. Για παράδειγμα, EC₅₀ είναι η συγκέντρωση που εκτιμάται ότι, στο τελικό σημείο δοκιμής, έχει επίδραση σε ποσοστό 50 % του εκτιθέμενου πληθυσμού επί καθορισμένη περίοδο έκθεσης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Προσδιορισμός της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για τον προσδιορισμό της μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους. Περιγράφεται στο παράρτημα Γ του προτύπου ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction) [Ποιότητα εδάφους — Επιδράσεις ρυπαντικών ουσιών στους γαιοσκώληκες (*Eisenia fetida*). Μέρος 2: Προσδιορισμός επιδράσεων στην αναπαραγωγή] (23).

Συλλέγεται συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) του υπό δοκιμή εδαφικού υποστρώματος με τη χρήση κατάλληλης συσκευής δειγματοληψίας (σωλήνας ελικοειδούς διάτρησης κ.λπ). Το κάτω άκρο του σωλήνα καλύπτεται με ένα τεμάχιο διηθητικού χαρτιού διαβρεγμένο με νερό και ο σωλήνας, αφού τοποθετηθεί σε στήριγμα, φέρεται σε υδατόλουτρο. Ο σωλήνας θα πρέπει να βυθίζεται προοδευτικά έως ότου η στάθμη του νερού καλύψει την επιφάνεια του εδάφους και, έπειτα, να μένει στο νερό επί τρεις ώρες περίπου. Δεδομένου ότι το έδαφος δεν μπορεί να συγκρατήσει το σύνολο του νερού που απορροφά μέσω των τριχοειδών πόρων του, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αφήνεται να στραγγίξει για δύο ώρες με την τοποθέτηση του σωλήνα σε ένα στρώμα πολύ υγρής λεπτοαλεσμένης χαλαζιακής άμμου που περιέχεται σε καλυμμένο δοχείο (ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση). Το δείγμα θα πρέπει στη συνέχεια να ζυγίζεται και να ξηραίνεται μέχρι σταθερής μάζας στους 105 °C. Η υδατοχωρητικότητα (WHC) μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο από νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

Προσάρτημα 3

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος προσδιορισμού του pH του εδάφους βασίζεται στην περιγραφή που παρατίθεται στο πρότυπο ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (Ποιότητα εδάφους — Προσδιορισμός του pH) (16).

Συγκεκριμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες τουλάχιστον. Κατόπιν, παρασκευάζεται εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 g εδάφους) σε πενταπλάσιο όγκο είτε διαλύματος 1 M χλωριούχου καλίου (KCl) αναλυτικής καθαρότητας είτε διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) αναλυτικής καθαρότητας. Το εναιώρημα ανακινείται ζωηρά επί πέντε λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία επί 2 τουλάχιστον ώρες, το πολύ όμως 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται με χρήση πεχάμετρου, το οποίο βαθμονομείται κάθε φορά πριν από τη μέτρηση, με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

Προσάρτημα 4

Εκτροφή του *Hygroaspis (geolaelaps) aculeifer* και των άκαρων τροφίμων, συγχρονισμός καλλιέργειαςΕκτροφή του *Hygroaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Οι καλλιέργειες μπορούν να διατηρούνται σε πλαστικά δοχεία ή γυάλινους κώδωνες που έχουν πληρωθεί με μείγμα γύψου-σκόνης άνθρακα (9:1). Η γύψος μπορεί να διατηρηθεί υγρή με την προσθήκη λίγων σταγόνων αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού, αν χρειαστεί. Οι θερμοκρασίες εκτροφής είναι βέλτιστες στην περιοχή 20 ± 2 °C, ενώ η φωτοπερίοδος δεν έχει σημασία για το συγκεκριμένο είδος. Η λεία μπορεί να είναι τα ακάρεα *Tyroglyphus putrescentiae* ή *Caloglyphus* sp. (ο χειρισμός των ακάρεων τροφίμων πρέπει να γίνεται με προσοχή, διότι μπορεί να προκαλέσουν αλλεργίες στον άνθρωπο), αλλά κατάλληλα προς τούτο είναι και οι νηματώδεις, οι enchytraeids και τα κολλέμβολα. Η πηγή της λείας θα πρέπει να καταγράφεται. Η ανάπτυξη του πληθυσμού μπορεί να αρχίσει με ένα μόνο θηλυκό, διότι τα αρσενικά αναπτύσσονται σε μη γονιμοποιημένα αυγά. Οι γενεές επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό. Ένα θηλυκό μπορεί να ζήσει τουλάχιστον 100 ημέρες και να εναποθέσει κατά προσέγγιση 100 αυγά στη διάρκεια της ζωής του. Ο μέγιστος ρυθμός ωοτοκίας επιτυγχάνεται μεταξύ 10ης και 40ης ημέρας (μετά την ενηλικίωση) και ανέρχεται σε 2,2 αυγά ανά θηλυκό άτομο ανά ημέρα. Ο χρόνος ανάπτυξης από το αυγό στο ακμαίο (ενήλικο) θηλυκό είναι κατά προσέγγιση 20 ημέρες στους 20 °C. Θα πρέπει να διατηρούνται πολλές καλλιέργειες πριν από τη δοκιμή.

Εκτροφή του *Tyroglyphus putrescentiae*:

Τα ακάρεα τροφίμων φυλάσσονται σε γυάλινο δοχείο που έχει πληρωθεί με λεπτή σκόνη ζύμης ζυθοποιίας και τοποθετείται σε πλαστικό κάδο με διάλυμα KNO_3 , ώστε να αποτρέπεται η διαφυγή τους. Τα ακάρεα τροφίμων φέρονται στην επιφάνεια αυτής της σκόνης. Στη συνέχεια, αναμειγνύονται προσεκτικά με τη σκόνη (που πρέπει να αντικαθίσταται δύο φορές την εβδομάδα) με τη χρήση σπάτουλας.

Συγχρονισμός καλλιέργειας:

Τα δείγματα ακάρεων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή θα πρέπει να έχουν την ίδια ηλικία (περίπου 7 ημερών αφότου φτάσουν στο στάδιο της ενηλικίωσης). Σε θερμοκρασία εκτροφής 20 °C, αυτό επιτυγχάνεται ως εξής:

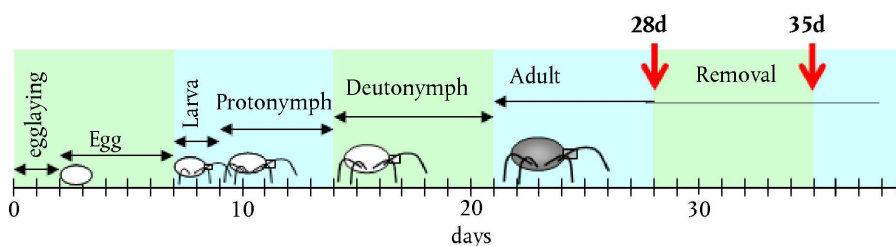
Μεταφέρονται θηλυκά άτομα σε καθαρό δοχείο εκτροφής και προστίθεται επαρκής ποσότητα τροφής.

- Δίνεται περιθώριο δύο έως τριών ημερών για την εναπόθεση των αυγών, έπειτα απομακρύνονται τα θηλυκά.
- Λαμβάνονται ενήλικα θηλυκά για τη δοκιμή μεταξύ της 28ης και της 35ης ημέρας από την τοποθέτησή τους στα καθαρά δοχεία εκτροφής.

Τα ενήλικα θηλυκά διακρίνονται εύκολα από τα αρσενικά και τα άλλα αναπτυξιακά στάδια, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, του διογκωμένου σχημάτός τους και του καστανόχρωμου νότου τους (τα αρσενικά είναι πιο λεπτά και επίπεδα), ενώ τα άωρα είναι λευκά έως υπόλευκα. Η ανάπτυξη των ακάρεων ακολουθεί κατά προσέγγιση το κατωτέρω σχήμα στους 20 °C (σχήμα): αυγό 5 ημ., προνύμφη 2 ημ., πρωτονύμφη 5 ημ., δευτερονύμφη 7 ημ., περίοδος προωοτοκίας του θηλυκού 2 ημ. Στη συνέχεια, τα ακάρεα είναι ακμαία.

Σχήμα

Ανάπτυξη του *Hygroaspis (Geolaelaps) aculeifer* στους 20 °C. [απομάκρυνση (*removal*) = θηλυκά που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή]



Τα ενήλικα υπό δοκιμή ζώα απομακρύνονται από τη συγχρονισμένη καλλιέργεια και εισάγονται στα δοχεία δοκιμής μεταξύ της 28ης και της 35ης ημέρας αφότου αρχίσει η εναπόθεση αυγών από τα γονικά θηλυκά (δηλ. 7 - 14 ημέρες αφότου ενηλικιωθούν). Αυτό εξασφαλίζει ότι έχει ήδη παρέλθει η περίοδος προωοτοκίας των υπό δοκιμή ζώων και ότι αυτά έχουν συζευχθεί με τα αρσενικά που είναι παρόντα στο δοχείο καλλιέργειας. Από παρατηρήσεις σε εργαστηριακές καλλιέργειες έχουν προκύψει ενδείξεις ότι, παρουσία αρσενικών, τα θηλυκά συζεύγνυνται αμέσως ή σχεδόν αμέσως μετά την ενηλικίωσή τους (Ruf, Vanippen, προσωπικές παρατηρήσεις). Η περίοδος των επτά ημερών έχει επιλεγεί για τη διευκόλυνση της ενσωμάτωσης στην εργαστηριακή ρουτίνα και για την ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας της ανάπτυξης μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού των ακάρεων. Η ωοτοκία θα πρέπει να αρχίζει με τον ίδιο τουλάχιστον αριθμό θηλυκών που θα χρειαστούν τελικά για τη δοκιμή. Για παράδειγμα, αν χρειάζονται 400 θηλυκά για τη δοκιμή, θα πρέπει να δοθεί η δυνατότητα ωοτοκίας τουλάχιστον σε 400 θηλυκά για δύο ή τρεις μέρες. Η αφετηρία για τον συγχρονισμένο πληθυσμό θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 200 αυγά (αναλογία φύλων περίπου 0,5, θνησιμότητα περίπου 0,2). Για να αποφευχθεί ο κανιβαλισμός, είναι σκοπιμότερο να μην διατηρούνται στο ίδιο δοχείο περισσότερα από 20-30 θηλυκά σε ωοτοκία.

Προσάρτημα 5

Μέθοδοι εξαγωγής

Για τα μικροαρθρόποδα, η θερμική εξαγωγή είναι κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού των δειγμάτων ζώων από το έδαφος / υπόστρωμα (βλ. σχήμα κατωτέρω). Καθώς η μέθοδος βασίζεται στη δραστηριότητα των οργανισμών, μόνο κινούμενα δείγματα είναι δυνατόν να καταγραφούν. Η αρχή της θερμικής εξαγωγής συνίσταται στη βαθμιαία επιδείνωση των συνθηκών του δείγματος για τους οργανισμούς, ώστε αυτοί να εγκαταλείψουν το υπόστρωμα και να πέσουν σε υγρό καθήλωσης (π.χ. αιθανόλη). Τα κρίσιμα σημεία είναι η διάρκεια της εξαγωγής και η βαθμιαία μεταβολή των συνθηκών για τους οργανισμούς από καλές σε μέτριες και αντίξοες. Η διάρκεια της εξαγωγής στις οικοτοξικολογικές δοκιμές πρέπει να είναι όσο το δυνατόν συντομότερη, επειδή τυχόν αύξηση του πληθυσμού κατά την εξαγωγή θα αλλοιώνε τα αποτελέσματα. Από την άλλη πλευρά, η θερμοκρασία και η υγρασία του δείγματος πρέπει πάντα να κυμαίνονται εντός εύρους που επιτρέπει στα ακάρεα να κινούνται. Η θέρμανση ενός δείγματος εδάφους έχει ως αποτέλεσμα την ξήρανση του υποστρώματος. Αν ο ρυθμός ξήρανσης είναι υπερβολικά ταχύς, ορισμένα ακάρεα ενδέχεται να αφυδατωθούν προτού κατορθώσουν να διαφύγουν.

Συνεπώς, προτείνεται η ακόλουθη διαδικασία (24) (25):

Συσκευή: Χοάνη Tullgren ή παρόμοιες μέθοδοι, όπως π.χ. η μέθοδος McFadyen (θέρμανση από πάνω, τοποθέτηση του δείγματος πάνω από χοάνη)

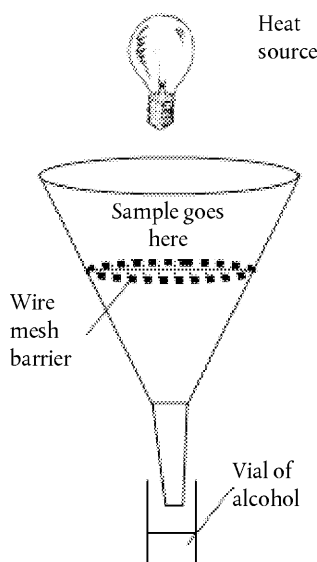
Προγραμματισμός θέρμανσης: 25 °C επί 12 ώρες, 35 °C επί 12 ώρες, 45 °C επί 24 ώρες (συνολικά 48 ώρες). Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετριέται στο υπόστρωμα.

Υγρό καθήλωσης: αιθανόλη 70 %

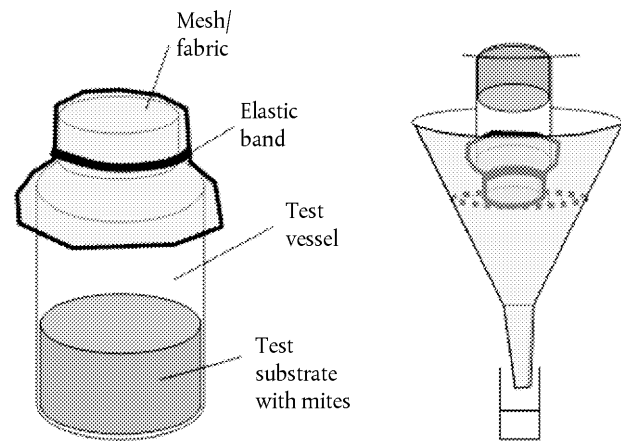
Λεπτομέρειες εκτέλεσης: Χρησιμοποιείται το γυάλινο φιαλίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμή. Αφαιρείται το πώμα και γύρω από το στόμιο τυλίγεται ένα τεμάχιο δικτυωτού ή υφάσματος. Το ύφασμα πρέπει να έχει μέγεθος οπών 1,0 έως 1,5 mm. Στερεώνεται το ύφασμα με ελαστική ταινία. Ανατρέπεται με προσοχή το φιαλίδιο και τοποθετείται στη συσκευή εξαγωγής. Το ύφασμα εμποδίζει το υπόστρωμα να εισχωρήσει στο υγρό καθήλωσης, αλλά επιτρέπει στα ακάρεα να εγκαταλείψουν το δείγμα. Η θέρμανση αρχίζει αφού τοποθετηθούν όλα τα φιαλίδια. Η εξαγωγή τερματίζεται σε 48 ώρες. Αφαιρούνται τα φιαλίδια και καταμετρώνται τα ακάρεα με στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

Η απόδοση της επιλεγμένης μεθόδου ως προς την εξαγωγή πρέπει να αποδεικνύεται τουλάχιστον μία ή δύο φορές ετησίως με τη χρήση δοχείων που περιέχουν γνωστό αριθμό νεαρών και ενήλικων ατόμων, διατηρούμενων σε υπόστρωμα δοκιμής χωρίς αγωγή. Η απόδοση θα πρέπει να είναι ≥ 90 % κατά μέσον όρο για τον συνδυασμό όλων των αναπτυξιακών σταδίων.

Συσκευή εξαγωγής τύπου Tullgren



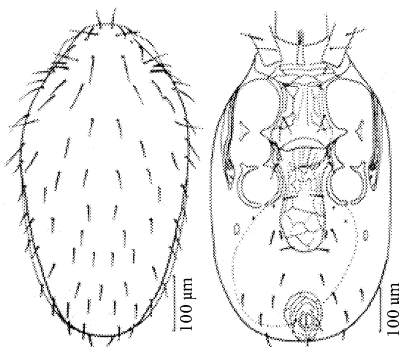
Ετοιμασία του δοκιμαστικού φιαλιδίου μετά το τέλος της δοκιμής, πριν από την εξαγωγή



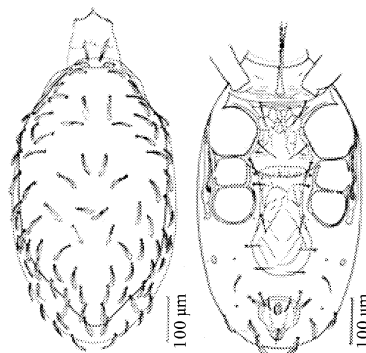
Προσάρτημα 6

Ταυτοποίησή του *hyroaspis (geolaelaps) aculeifer*

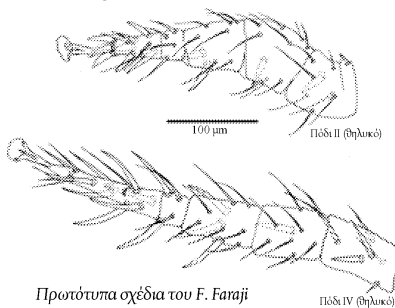
| | | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Υφομοταξία/τάξη/υποτάξη: | Οικογένεια: | Γένος/υπογένος/είδος: |
| Ακάρεα/Παρασιτόμορφα/Γαμασιίδες | Laelaridae | <i>Hyroaspis (Geolaelaps) aculeifer</i> |
| Συγγραφέας και ημερομηνία: | F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 Ιανουαρίου 2007 | |
| Σχετική βιβλιογραφία: | <p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 σελίδες.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 σελίδες.</p> | |
| Προσδιοριστικά χαρακτηριστικά: | <p>Τέγος (tectum) με στρογγυλεμένο οδοντωτό περιθώριο· υποστοματικές αύλακες με πάνω από 6 οδοντίσκους· ουραίες νωτιαίες τρίχες Z4 όχι πολύ μακριές· τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες· συνηθής γεννητικός θυρεός, όχι πολύ πεπλατυσμένος, που δεν φθάνει μέχρι τον εδρικό θυρεό· οπίσθιο ήμισυ του σώματος χωρίς άζυγες τρίχες· πόδια II και IV με μερικά παχιά μακροτρίχια· νωτιαίες τρίχες Z5 μήκους περίπου διπλάσιου εκείνου των J5· σταθερό δάκτυλο χηλικεραίας με 12-14 δόντια και κινητό δάκτυλο με 2 δόντια· ιδιόσωμα μήκους 520-685 μm.</p> <p>Το <i>Hyroaspis miles</i> χρησιμοποιείται επίσης στον βιολογικό έλεγχο επιβλαβών οργανισμών και μπορεί να δημιουργηθεί σύγχυση με το <i>H. aculeifer</i>. Η κυριότερη διαφορά είναι η εξής:</p> <p>Το <i>Hyroaspis miles</i> ανήκει στο υπογένος <i>Cosmolaelaps</i> και έχει λεπίδομορφες νωτιαίες τρίχες, ενώ το <i>H. aculeifer</i> ανήκει στο υπογένος <i>Geolaelaps</i> και έχει τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες.</p> | |



Hyroaspis aculeifer σύμφωνα με τον Hughes, 1976

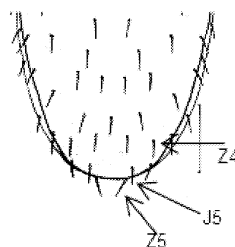


Hyroaspis miles σύμφωνα με τον Hughes, 1976



Προτύπου σχέδια του F. Faraji

Πόδι IV (θηλυκό)



Hyroaspis aculeifer, ραχιαίος θυρεός με χαρακτηριστικές τριχόμορφες νωτιαίες τρίχες

Προσάρτημα 7

Βασικές πληροφορίες για τη βιολογία του *hyroaspis (geolaelaps) aculeifer*

Το *Hyroaspis aculeifer* ανήκει στην οικογένεια των Lealariidae, τάξη των Ακάρεων, ομοταξία των Αραχνιδίων (Αραχνόμορφων), άθροισμα των Αρθροπόδων. Ζει σε όλων των ειδών τα εδάφη και τρέφεται με άλλα ακάρεα, νηματώδεις, enchytraeids και κολλέμβολα (26). Σε περίπτωση έλλειψης τροφής παρατηρείται κανιβαλισμός (27). Τα αρπακτικά ακάρεα είναι ταγματωμένα σε ιδιόσωμα και γναθόσωμα. Στο ιδιόσωμα δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση ανάμεσα σε πρόσωμα (κεφαλή) και οπισθόσωμα (κοιλία). Το γναθόσωμα (κεφαλοθώρακας) φέρει τα εξαρτήματα θρέψης, όπως προσακτρίδες και χηλικεραίες. Οι χηλικεραίες είναι τριχοτομημένες και φέρουν δόντια διαφόρων σχημάτων. Εκτός από την πρόσληψη τροφής, τα αρσενικά χρησιμοποιούν τις χηλικεραίες τους κυρίως για να μεταφέρουν τα σπερματοφόρα στα θηλυκά. Το ιδιόσωμα καλύπτεται σχεδόν τελείως από το νώτο. Μεγάλο τμήμα του ιδιοσώματος των θηλυκών καταλαμβάνουν τα αναπαραγωγικά όργανα, που είναι ιδιαίτερος διακριτά λίγο πριν από την εναπόθεση των αυγών. Στην κοιλιακή χώρα βρίσκονται δύο θυρεοί, ο στερνικός και ο γεννητικός. Όλα τα πόδια φέρουν σμήριγγες και άκανθες. Οι σμήριγγες χρησιμοποιούνται ως άγκιστρα όταν το άκαρι κινείται στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια του εδάφους. Το πρώτο ζεύγος ποδιών χρησιμοποιείται κυρίως ως κεραία. Το δεύτερο ζεύγος ποδιών δεν χρησιμοποιείται μόνο για την κίνηση αλλά και για την ακινητοποίηση της λείας. Οι άκανθες του τέταρτου ζεύγους ποδιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προστασία καθώς και ως κινητήριος μοχλός (28). Τα αρσενικά έχουν μήκος 0,55 - 0,65 mm και βάρος 10 - 15 μg. Τα θηλυκά έχουν μήκος 0,8 - 0,9 mm και βάρος 50 - 60 μg (8) (28) (εικόνα 1).

Εικόνα 1

Θηλυκό, αρσενικό, πρωτονύμφη και pronύμφη του *H. aculeifer*

Στους 23 °C, τα ακάρεα ωριμάζουν προς αναπαραγωγή ύστερα από 16 ημέρες (θηλυκά) και 18 ημέρες (αρσενικά) (6). Τα θηλυκά μεταφέρουν το σπέρμα με το σωληνόστομα, από όπου καταλήγει στην ωοθήκη. Στην ωοθήκη, τα σπερματοζωάρια ωριμάζουν και στη συνέχεια αποθηκεύονται. Η γονιμοποίηση γίνεται μόνο μετά την ωρίμαση των σπερματοζωαρίων στην ωοθήκη. Τα θηλυκά εναποθέτουν γονιμοποιημένα και μη γονιμοποιημένα αυγά σε μάζες ή ξεχωριστά, κατά προτίμηση μέσα σε ρωγμές ή οπές. Τα συζευγμένα θηλυκά μπορούν να γεννήσουν απογόνους και των δύο φύλων, ενώ από τα αυγά των μη συζευγμένων θηλυκών εκκολάπτονται μόνο αρσενικά άτομα. Τέσσερα είναι τα αναπτυξιακά στάδια έως την ενηλικίωση (αυγό — pronύμφη, pronύμφη — πρωτονύμφη (πρώτο νυμφικό στάδιο), πρωτονύμφη — δευτερονύμφη (δεύτερο νυμφικό στάδιο), δευτερονύμφη — ακμαίο).

Το αυγό είναι γαλακτόχρωμο, υαλώδες, ελλειπτικού σχήματος και έχει μήκος περίπου 0,37 mm με συμπαγή μανδύα. Σύμφωνα με τη δημοσίευση (8), η pronύμφη έχει μέγεθος μεταξύ 0,42 - 0,45 mm και μόνο τρία ζεύγη ποδιών. Στην περιοχή της κεφαλής αναπτύσσονται προσακτρίδες και χηλικεραίες. Οι χηλικεραίες, που φέρουν μερικούς οδοντίσκους, χρησιμοποιούνται για την εκκόλαψη από το αυγό. Μετά την πρώτη έκδυση, 1 - 2 ημέρες από την εκκόλαψη, αναπτύσσονται οι πρωτονύμφες. Είναι επίσης χρώματος λευκού, μεγέθους 0,45 - 0,62 mm (8) και έχουν τέσσερα ζεύγη ποδιών. Στις χηλικεραίες τα δόντια έχουν πλήρως εμφανιστεί. Ήδη από το στάδιο αυτό τα ακάρεα αρχίζουν να συλλέγουν τροφή. Για τον σκοπό αυτό, διαπερνούν με τις χηλικεραίες τη δερμίδα του εξωσκελετού της λείας τους και καλύπτουν την τελευταία με έκκριση για εξωτερική πέψη. Το άκαρι μπορεί στη συνέχεια να απομυζήσει τον πολτό τροφής. Οι χηλικεραίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διάρρηξη βλών τροφής και την απόσπαση μεγαλύτερων σωματιδίων (28). Ύστερα από μία ακόμη έκδυση, αναπτύσσονται οι δευτερονύμφες. Έχουν μήκος 0,60 - 0,80 mm (8) και χρώμα κίτρινο ως ανοιχτό καστανό. Από το στάδιο αυτό και έπειτα διακρίνονται σε θηλυκά και αρσενικά. Ύστερα από μία ακόμα έκδυση, στη διάρκεια της οποίας τα ζώα είναι αδρανή και αναπτύσσεται το καστανόχρωμο νώτο (περίπου μετά από 14 ημέρες), τα ακάρεα είναι ακμαία (28) (29) (30). Η διάρκεια ζωής τους κυμαίνεται μεταξύ 48 και 100 ημερών στους 25 °C (27).

Προσάρτημα 8

Περίληψη και χρονοδιάγραμμα των κυριότερων ενεργειών για την εκτέλεσή της δοκιμής με τον **hygroaspis**

| Χρόνος (ημέρες) Έναρξη δοκιμής = ημέρα 0 | Ενέργεια / εργασία |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ημέρα -35 μέχρι -28 | Μεταφορά θηλυκών από την καλλιέργεια παρακαταθήκης σε καθαρά δοχεία για να αρχίσει ο συγχρονισμός Μετά 2 ημέρες: απομάκρυνση των θηλυκών Δύο έως τρεις φορές εβδομαδιαίως: χορήγηση επαρκούς ποσότητας τροφής |
| Ημέρα -5 (+/- 2) | Παρασκευή τεχνητού εδάφους |
| Ημέρα -4 (+/- 2) | Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας του τεχνητού εδάφους Ξήρανση για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση δειγμάτων και υπολογισμός υδατοχωρητικότητας |
| Ημέρα -4 (+/- 2) | Προύγρυνση του τεχνητού εδάφους για να επιτευχθεί ποσοστό 20 - 30 % της υδατοχωρητικότητας |
| Ημέρα 0 | Έναρξη της δοκιμής: προσθήκη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο τεχνητό έδαφος Εισαγωγή 10 θηλυκών σε κάθε δοχείο επανάληψης (replicate) Ζύγιση κάθε δοχείου επανάληψης Ετοιμασία αβιοτικών μαρτύρων για την υγρασία και το pH, 2 επαναλήψεις ανά αγωγή Ξήρανση των μαρτύρων υγρασίας για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση των μαρτύρων υγρασίας Επόμενη ημέρα: μέτρηση του pH των ξηρών αβιοτικών μαρτύρων |
| Ημέρα 3, 6, 9, 12 (περίπου) | Τροφοδότηση κάθε δοχείου επανάληψης με επαρκή ποσότητα λείας Ζύγιση κάθε δοχείου επανάληψης και ενδεχομένως αναπλήρωση του εξατμισμένου νερού |
| Ημέρα 14 | Λήξη της δοκιμής, εξαγωγή με όλα τα δοχεία επανάληψης συν τους μάρτυρες απόδοσης εξαγωγής Ξήρανση των μαρτύρων υγρασίας για μία νύχτα Επόμενη ημέρα: ζύγιση των μαρτύρων υγρασίας Επόμενη ημέρα: μέτρηση του pH των ξηρών μαρτύρων |
| Ημέρα 16 | Λήξη της εξαγωγής |
| Ημέρα 16+ | Καταγραφή του αριθμού των ενηλίκων και νεαρών ατόμων στο εξαχθέν υλικό Αναφορά των αποτελεσμάτων σε πρότυπους πίνακες Αναφορά της διαδικασίας δοκιμής σε φύλλα πρωτοκόλλου δοκιμής |

Γ.37. ΔΟΚΙΜΗ 21-ΗΜΕΡΩΝ ΣΕ ΨΑΡΙΑ: ΜΙΑ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ, ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 230 του ΟΟΣΑ (2009). Η ανάγκη ανάπτυξης κι επικύρωσης μιας δοκιμής σε ψάρια για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που έχουν επίδραση στο ενδοκρινικό προέρχεται από τις ανησυχίες ότι τα επίπεδα των χημικών ουσιών στο περιβάλλον ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στους ανθρώπους όσο και στην άγρια πανίδα και χλωρίδα λόγω της αλληλεπίδρασης των εν λόγω χημικών ουσιών με το ενδοκρινικό σύστημα. Το 1998 ο ΟΟΣΑ δρομολόγησε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών και την ανάπτυξη νέων για τη διαλογή και τη δοκιμή δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον έλεγχο των χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα διαφόρων ειδών ψαριών. Η δοκιμή ενδοκρινικού ελέγχου 21 ημερών σε ψάρια υποβλήθηκε σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης αποτελούμενο από διεργαστηριακές μελέτες με επιλεγμένες χημικές ουσίες για να επιδειχθεί η συνάφεια και η αξιοπιστία της δοκιμής για την ανίχνευση οιστρογονικών χημικών ουσιών και χημικών ουσιών αναστολής της αρωματάσης (1, 2, 3, 4, 5) στα τρία είδη ψαριών που αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας (τον λιποκέφαλο φοξίνο, το ρυζόψαρο και το ζεβρόψαρο): η ανίχνευση της ανδρογονικής δράσης είναι εφικτή στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο, αλλά όχι στο ζεβρόψαρο. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών δεν επιτρέπει την ανίχνευση αντιανδρογονικών χημικών ουσιών. Η εργασία επικύρωσης έχει αξιολογηθεί από ομάδα ομότιμων εμπειρογνομόνων που ορίστηκαν από τους εθνικούς συντονιστές του προγράμματος κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών (6). Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για να εντοπίσει συγκεκριμένους μηχανισμούς ορμονικών διαταραχών λόγω του ότι τα πειραματόζωα διατηρούν άδικο τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), ο οποίος μπορεί να ανταποκριθεί σε χημικές ουσίες που επηρεάζουν τον άξονα HPG σε διάφορα επίπεδα. Η βραχυπρόθεσμη δοκιμή αναπαραγωγής σε ψάρια (ΟΟΣΑ TG 229) περιλαμβάνει τις μετρήσεις γονιμότητας και, ανάλογα με την περίπτωση, της γοναδικής ιστοπαθολογίας για τον λιποκέφαλο φοξίνο, καθώς και όλα τα τελικά σημεία που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η κατευθυντήρια γραμμή TG 229 του ΟΟΣΑ προβλέπει έλεγχο των χημικών ουσιών που επηρεάζουν την αναπαραγωγή μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινικών διαδικασιών. Αυτό θα πρέπει να εξεταστεί πριν από την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου δοκιμών.
2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει μία *in vivo* δοκιμή ελέγχου όπου σεξουαλικά ώριμα αρσενικά και θηλυκά ψάρια κρατούνται μαζί και εκτίθενται σε μία χημική ουσία κατά ένα μικρό μέρος του κύκλου ζωής τους (21 ημέρες). Κατά τη λήξη της 21ήμερης περιόδου έκθεσης, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο είδος, μετρούνται ένα ή δύο τελικά σημεία βιοδεικτών σε αρσενικά και θηλυκά ως δείκτες οιστρογονικής ή ανδρογονικής δράσης ή αναστολής της αρωματάσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: τα τελικά αυτά σημεία είναι η λεκιδογενίνη και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Η λεκιδογενίνη μετράται στον λιποκέφαλο φοξίνο, στο ρυζόψαρο, και στο ζεβρόψαρο, ενώ τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται μόνο στον λιποκέφαλο φοξίνο και στο ρυζόψαρο.
3. Η παρούσα βιοδοκιμή λειτουργεί ως δοκιμή διαλογής *in vivo* για συγκεκριμένους τρόπους δράσης στο ενδοκρινικό και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο “Έννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών” (28).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Η λεκιδογενίνη παράγεται συνήθως από το ήπαρ των θηλυκών ωοτόκων σπονδυλωτών ως απόκριση στα κυκλοφορούντα ενδογενή οιστρογόνα. Είναι πρόδρομος των πρωτεϊνών του κρόκου του αυγού και, αφού παραχθεί στο ήπαρ, ταξιδεύει μέσα από την κυκλοφορία του αίματος στην ωοθήκη, όπου απορροφάται και τροποποιείται από τα αναπτυσσόμενα αυγά. Η λεκιδογενίνη είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο πλάσμα των μη ώριμων θηλυκών και αρσενικών ψαριών επειδή δεν διαθέτουν επαρκή κυκλοφορούντα οιστρογόνα· ωστόσο, το ήπαρ είναι ικανό να συνθέσει και να εκκρίνει λεκιδογενίνη ως απόκριση σε εξωγενή οιστρογόνο διέγερση.
5. Η μέτρηση της λεκιδογενίνης χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με διάφορες οιστρογόνους δράσεις. Η ανίχνευση χημικών οιστρογόνων είναι εφικτή μέσω της μέτρησης της πρόκλησης έκκρισης λεκιδογενίνης στα αρσενικά ψάρια, και έχει τεκμηριωθεί με αφθονία στην επιστημονική βιβλιογραφία που έχει αξιολογηθεί από ομότιμους κριτές (π.χ. (7)). Η πρόκληση έκκρισης λεκιδογενίνης έχει επίσης καταδειχτεί μετά από έκθεση σε αρωματοποιησίμα ανδρογόνα (8, 9). Μείωση του κυκλοφορούντος επιπέδου των οιστρογόνων σε θηλυκά, για παράδειγμα μέσω της αναστολής της αρωματάσης για τη μετατροπή των ενδογενών ανδρογόνων στο φυσικό οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη, προκαλεί μείωση στο επίπεδο λεκιδογενίνης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χημικών ουσιών με ιδιότητες αναστολής της αρωματάσης (10, 11). Η βιολογική συνάφεια της απόκρισης της λεκιδογενίνης μετά από αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων/αναστολή της αρωματάσης έχει καθιερωθεί και έχει τεκμηριωθεί ευρέως. Ωστόσο, η παραγωγή λεκιδογενίνης (VTG) στα θηλυκά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα.

6. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία και έχουν τυποποιηθεί για συστηματική χρήση. Αυτό ισχύει για τις ειδικές ανά είδος μεθόδους ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) με τη χρήση ανοσοχημείας για την ποσοτικοποίηση της λεκιδιογενίνης που παράγεται σε μικρά δείγματα αίματος ή ήπατος που συλλέγονται από μεμονωμένα ψάρια (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Από το αίμα του λιποκέφαλου φοξίνου, το αίμα ή τους ομογενοποιημένους ιστούς κεφαλής και ουράς του ζεβρόψαρου και το συκώτι του ρυζόψαρου λαμβάνονται δείγματα για μέτρηση της VTG. Στο ρυζόψαρο υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της VTG που μετράται από το αίμα και από το συκώτι (19). Στο προσάρτημα 6 ορίζονται οι συνιστώμενες διαδικασίες για τη συλλογή δειγμάτων για ανάλυση της λεκιδιογενίνης. Κιτ για τη μέτρηση της λεκιδιογενίνης είναι ευρέως διαθέσιμα· τα εν λόγω κιτ θα πρέπει να βασίζονται σε επικυρωμένη ειδική ανά είδος μέθοδο ELISA.
7. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στα αρσενικά ψάρια ορισμένων ειδών είναι εξωτερικά ορατά, ποσοτικοποιήσιμα και ανταποκρίνονται στα κυκλοφορούντα επίπεδα ενδογενών ανδρογόνων· αυτό ισχύει για τον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο — αλλά όχι για τα ζεβρόψαρα που δεν διαθέτουν ποσοτικοποιήσιμα δευτερογενή χαρακτηριστικά που αφορούν το φύλο. Τα θηλυκά διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης αρσενικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, όταν εκτεθούν σε ανδρογόνες χημικές ουσίες στο νερό. Διάφορες μελέτες είναι διαθέσιμες στην επιστημονική βιβλιογραφία για να τεκμηριώσουν αυτό το είδος αντίδρασης στο λιποκέφαλο φοξίνο (20) και στο ρυζόψαρο (21). Η μείωση σε δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου σε αρσενικά θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή λόγω της χαμηλής στατιστικής αξιοπιστίας, και θα πρέπει να βασίζεται στην κρίση εμπειρογνομόνων και το βάρος της απόδειξης. Υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση ζεβρόψαρου στην παρούσα δοκιμή, λόγω της απουσίας ποσοτικοποιήσιμων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου που να ανταποκρίνονται σε χημικές ουσίες με ανδρογόνο δράση.
8. Στον λιποκέφαλο φοξίνο, ο κύριος δείκτης της εξωγενούς ανδρογόνου έκθεσης είναι ο αριθμός των γαμήλιων φυματιών που βρίσκονται στο ρύγχος των θηλυκών ψαριών. Στο ρυζόψαρο, ο αριθμός των θηλυκών διεργασιών αποτελεί την κύρια ένδειξη εξωγενούς έκθεσης σε ανδρογόνες χημικές ουσίες σε θηλυκά ψάρια. Στο προσάρτημα 5A και στο προσάρτημα 5B αναφέρονται οι συνιστώμενες διαδικασίες που πρέπει να ακολουθούνται για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του φύλου στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο αντίστοιχα.
9. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Στη δοκιμή, τα αρσενικά και θηλυκά ψάρια σε αναπαραγωγική κατάσταση εκτίθενται μαζί στα δοχεία δοκιμής. Η ενήλικη και αναπαραγωγική τους κατάσταση επιτρέπει σαφή διαφοροποίηση του κάθε φύλου, και, ως εκ τούτου, μια σχετική ως προς το φύλο ανάλυση για κάθε τελικό σημείο, και διασφαλίζει την ευαισθησία τους έναντι των εξωγενών χημικών ουσιών. Στο τέλος της δοκιμής, το φύλο επιβεβαιώνεται με μακροσκοπική εξέταση των γονάδων από κοιλιακό άνοιγμα της κοιλιακής μοίρας με ψαλίδι. Επισκόπηση των σχετικών προϋποθέσεων βιοδοκιμών περιλαμβάνεται στο προσάρτημα 2. Η δοκιμή δρομολογείται συνήθως με ψάρια που ελήφθησαν ως δείγματα από ένα πληθυσμό που είναι σε αναπαραγωγική κατάσταση· δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γερασμένα ζώα. Οδηγίες για την ηλικία των ψαριών και την αναπαραγωγική κατάσταση περιλαμβάνονται στην ενότητα για την επιλογή των ψαριών. Η δοκιμή διεξάγεται με τη χρήση τριών συγκεντρώσεων χημικής έκθεσης καθώς και έναν μάρτυρα με νερό, και έναν μάρτυρα με διαλύτη, εάν είναι απαραίτητο. Χρησιμοποιούνται δύο δοχεία ή πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή (κάθε δοχείο περιέχει 5 αρσενικά και 5 θηλυκά) για ρυζόψαρα και ζεβρόψαρα, ενώ χρησιμοποιούνται τέσσερα δοχεία ή πανομοιότυπα δείγματα ανά αγωγή (κάθε δοχείο περιέχει 2 αρσενικά και 4 θηλυκά) για λιποκέφαλους φοξίνους. Αυτό γίνεται για να συμπεριληφθεί η χωροκατακτητική συμπεριφορά του αρσενικού λιποκέφαλου φοξίνου διατηρώντας παράλληλα επαρκή ισχύ της δοκιμασίας. Η έκθεση αυτή διεξάγεται για 21 ημέρες και η δειγματοληψία των ψαριών πραγματοποιείται κατά την 21η ημέρα της έκθεσης.
11. Για τη δειγματοληψία κατά την 21η ημέρα, τα ζώα θανατώνονται με τρόπο ανώδυνο. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μετρούνται σε λιποκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα (βλέπε προσάρτημα 5A και προσάρτημα 5B). Για τον προσδιορισμό της λεκιδιογενίνης σε ζεβρόψαρα και λιποκέφαλους φοξίνους συλλέγονται δείγματα αίματος· εναλλακτικά μπορούν να συλλεχθούν κεφαλή/ουρά για τον προσδιορισμό της λεκιδιογενίνης στα ζεβρόψαρα (προσάρτημα 6)· για την ανάλυση λεκιδιογενίνης στα ρυζόψαρα συλλέγεται το ήπαρ (προσάρτημα 6).

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Για να γίνουν αποδεκτά τα αποτελέσματα της δοκιμής, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:
 - Η θνησιμότητα μαρτύρων σε νερό (ή διαλύτη) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10 % στο τέλος της περιόδου έκθεσης·
 - η συγκέντρωση του διαλελυμένου οξυγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον το 60 % της τιμής κορεσμού σε αέρα (TKA) σε όλη τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης·

- η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των δοχείων δοκιμής δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο του ± 1.5 °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και να διατηρείται με δυνατότητα απόκλισης 2 °C στην περιοχή των θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 2).
- θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα διατηρήθηκαν ικανοποιητικά στα όρια του ± 20 % του μέσου όρου των τιμών που μετρήθηκαν.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαστηριακός εξοπλισμός

13. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα ακόλουθα:
 - α) οξύγονόμετρα και pHμετρα·
 - β) εξοπλισμός για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και αλκαλικότητας του νερού·
 - γ) κατάλληλη συσκευή για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με δυνατότητα συνεχούς, κατά προτίμηση, παρακολούθησης·
 - δ) δεξαμενές κατασκευασμένες από χημικώς αδρανές υλικό και κατάλληλης χωρητικότητας ανάλογα με τη συνιστώμενη φόρτιση και την πυκνότητα πληθυσμού (βλέπε παράρτημα 2)·
 - ε) υπόστρωμα ωτοκίας για λιποκέφαλους φοξίνους και ζεβρόψαρα, το παράρτημα 4 παρέχει τα απαραίτητα στοιχεία·
 - στ) ζυγός κατάλληλης ακρίβειας (δηλαδή ακρίβεια έως $\pm 0,5$ mg).

Νερό

14. Ως νερό δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε νερό στο οποίο το υπό δοκιμή είδος εμφανίζει την ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη επιβίωση και ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH του νερού θα πρέπει να είναι της τάξεως του 6,5 έως 8,5, κατά τη διάρκεια όμως μιας δεδομένης δοκιμής δεν θα πρέπει να κυμαίνεται πέραν των $\pm 0,5$ μονάδων pH. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραιώσης δεν θα επηρεάσει ατόπως το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. με τη δημιουργία συμπλόκων με την υπό δοκιμή χημική ουσία) θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Όταν το νερό αραιώσης είναι γνωστό ως σχετικώς σταθερό από ποιοτικής πλευράς, θα πρέπει, π.χ. κάθε τρεις μήνες, να γίνονται μετρήσεις βαρέων μετάλλων (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd και Ni), βασικών ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , και SO_4^{2-}), φυτοφαρμάκων (π.χ. ολικών οργανοφωσφορικών και ολικών οργανοχλωριούχων φυτοφαρμάκων), ολικού οργανικού άνθρακα και αιωρούμενων στερεών σωματιδίων. Εάν η ποιότητα του νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερή για ένα τουλάχιστον χρόνο, η συχνότητα των προσδιορισμών μπορεί να περιοριστεί και τα διαστήματα να αυξηθούν (π.χ. κάθε έξι μήνες). Μερικά χημικά χαρακτηριστικά αποδεκτού νερού αραιώσης καταγράφονται στο παράρτημα 3.

Διαλύματα δοκιμής

15. Τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση αρχικού πυκνού διαλύματος. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρασκευάζεται με απλή ανάμιξη ή ανακίνηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε νερό αραιώσης, χρησιμοποιώντας μηχανικά μέσα (π.χ. ανάδευση ή υπερήχους). Για να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στήλες κορεσμού (στήλες διαλυτότητας). Δεν συνιστάται η χρήση φορέα διαλύτη. Ωστόσο, σε περίπτωση που απαιτείται διαλύτης, ένας μάρτυρας με διαλύτη πρέπει να λειτουργεί παράλληλα, με την ίδια συγκέντρωση διαλύτη όπως οι χημικές αγωγές. Για δύσκολες υπό δοκιμή χημικές ουσίες, ο διαλύτης μπορεί να είναι, από τεχνικής άποψης, η βέλτιστη λύση· θα πρέπει να ανατρέξει κανείς στο έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές τοξικότητας στο υδάτινο περιβάλλον για τις δύσκολες ουσίες και μείγματα (Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (22). Η επιλογή του διαλύτη θα καθοριστεί από τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ συνιστά 100μl/l κατά το μέγιστο, όριο που θα πρέπει να τηρείται. Ωστόσο, μια πρόσφατη έρευνα (23) ανέδειξε πρόσθετες ανησυχίες όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες για δοκιμές ενδοκρινικής δράσης. Ως εκ τούτου, συνιστάται η συγκέντρωση του διαλύτη, εφόσον χρειάζεται, να ελαχιστοποιείται όποτε αυτό είναι τεχνικά εφικτό (εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας).
16. Θα χρησιμοποιηθεί σύστημα δοκιμής συνεχούς ροής. Ένα τέτοιο σύστημα παρέχει συνεχώς και αραιώνει ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής, σύστημα κορεσμού) για την προσαγωγή των διαλυμάτων στους δοκιμαστικούς θαλάμους. Οι ταχύτητες ροής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραιώσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα, κατά προτίμηση κάθε μέρα, κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 10 % σε όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών σωληνώσεων χαμηλής ποιότητας ή άλλων υλικών που ενδέχεται να περιέχουν βιολογικά δραστικές χημικές ουσίες. Κατά την επιλογή του υλικού για το σύστημα συνεχούς ροής, θα πρέπει να συνυπολογίζεται η πιθανή προσρόφηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υλικό αυτό.

Διατήρηση των ψαριών

17. Τα προς δοκιμή ψάρια επιλέγονται από εργαστηριακό πληθυσμό, κατά προτίμηση από μεμονωμένο πληθυσμό παρακαταθήκης, που έχουν εγκλιματιστεί για δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από τη δοκιμή, υπό συνθήκες ποιότητας νερού και φωτισμού παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Είναι σημαντικό, ο ρυθμός πλήρωσης και η πυκνότητα πληθυσμού (για ορισμούς βλέπε προσάρτημα 1) να είναι κατάλληλα για το χρησιμοποιούμενο είδος ψαριών (βλέπε προσάρτημα 2).
18. Έπειτα από ένα πρώτο χρονικό διάστημα 48 ωρών, καταγράφονται οι θνησιμότητες και εφαρμόζονται τα ακόλουθα κριτήρια:
 - ποσοστά θνησιμότητας άνω του 10 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: απορρίπτεται ολόκληρη η παρτίδα,
 - ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ 5 % και 10 % του πληθυσμού: εγκλιματισμός για επτά ακόμη ημέρες. Εάν, κατά τη διάρκεια των επτά επόμενων ημερών, καταγραφεί ποσοστό θνησιμότητας άνω του 5 %, ολόκληρη η παρτίδα απορρίπτεται,
 - ποσοστά θνησιμότητας λιγότερο από το 5 % του πληθυσμού σε επτά ημέρες: η παρτίδα γίνεται αποδεκτή
19. Τα ψάρια δεν πρέπει να λαμβάνουν αγωγή για ασθένεια κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, της περιόδου προέκθεσης, ή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης.

Προέκθεση και επιλογή των ψαριών

20. Συνιστάται περίοδος προέκθεσης μιας εβδομάδας, με τα ζώα να τοποθετούνται σε δοχεία, παρόμοια με εκείνα της πραγματικής δοκιμής. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση (*ad libitum*), καθ' όλη την περίοδο διατήρησης και κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης. Η φάση της έκθεσης ξεκινά με ενήλικα ψάρια με φυλετικό (σεξουαλικό) διμορφισμό από εργαστηριακά αποθέματα ώριμων από αναπαραγωγική άποψη ζώων (π.χ. με σαφή δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου ορατά όσον αφορά τον λιποκέφαλο φοξίνο και το ρυζόψαρο), και σε ενεργή ωτοκοκία. Ως γενική κατεύθυνση και μόνο (και να μην ληφθεί υπόψη ανεξάρτητα από την παρατήρηση της τρέχουσας αναπαραγωγικής κατάστασης μιας δεδομένης παρτίδας ή ψαριού) οι λιποκέφαλοι φοξίνοι θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 20 (\pm 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 25 \pm 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ρυζόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (\pm 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 25 \pm 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ζεβρόψαρα θα πρέπει να είναι ηλικίας περίπου 16 (\pm 2) εβδομάδων, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν καλλιεργηθεί στους 26 \pm 2 °C κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

21. Χρησιμοποιούνται τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, ένας μάρτυρας (νερό) και, εφόσον χρειαστεί, ένας μάρτυρας με διαλύτη. Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν για να καθοριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποκρίσεων αγωγής και των αποκρίσεων μαρτύρων. Οι αναλύσεις αυτές θα δώσουν πληροφορίες σχετικά με το κατά πόσο απαιτείται περαιτέρω μακροπρόθεσμη δοκιμή για δυσμενείς επιδράσεις (δηλαδή, την επιβίωση, την ανάπτυξη, τη μεγέθυνση και την αναπαραγωγή) για την χημική ουσία, παρά για χρήση στην εκτίμηση κινδύνου (24).
22. Για τα ζεβρόψαρα και τα ρυζόψαρα, την 21η ημέρα του πειράματος, αρσενικά και θηλυκά κάθε επιπέδου της αγωγής (5 αρσενικά και 5 θηλυκά σε κάθε ένα από τα δύο αντίγραφα) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της λεκιδογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, ανάλογα με την περίπτωση. Για τους λιποκέφαλους φοξίνο, την 21η ημέρα της έκθεσης, αρσενικά και θηλυκά (2 αρσενικά και 4 θηλυκά σε κάθε ένα από τα τέσσερα αντίγραφα) και από τον(τους) μάρτυρα(ες) υποβάλλονται σε δειγματοληψία για τη μέτρηση της λεκιδογενίνης και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

23. Για τους σκοπούς της δοκιμής αυτής, η υψηλότερη συκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να ορίζεται σύμφωνα με τη μέγιστη ανεκτή συκέντρωση (ΜΑΣ) η οποία θα πρέπει να ορίζεται με βάση προκαταρκτική δοκιμή προσδιορισμού των συγκεντρώσεων της δοκιμής ή από άλλα δεδομένα τοξικότητας, ή 10 mg/l, ή τη μέγιστη διαλυτότητα στο νερό, όποιο είναι χαμηλότερο. Η ΜΑΣ ορίζεται ως η υψηλότερη συκέντρωση της χημικής ουσίας στη δοκιμή που έχει ως αποτέλεσμα θνησιμότητα μικρότερη από 10 %. Η χρήση αυτής της προσέγγισης προϋποθέτει την ύπαρξη εμπειρικών δεδομένων οξείας τοξικότητας ή άλλων δεδομένων τοξικότητας από τα οποία μπορεί να γίνει εκτίμηση της ΜΑΣ. Η εκτίμηση της ΜΑΣ μπορεί να μην είναι ακριβής και συνήθως απαιτεί τη γνώμη ενός ειδικού.
24. Απαιτούνται τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής, με σταθερό παράγοντα κλιμάκωσης που δεν υπερβαίνει το 10, και ένα μάρτυρα νερού αραιώσης (και μάρτυρα με διαλύτη, εάν χρειάζεται). Συνιστάται εύρος παραγόντων κλιμάκωσης μεταξύ 3,2 και 10.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επιλογή και ζύγιση των υπό δοκιμή ψαριών

25. Είναι σημαντικό να ελαχιστοποιείται η διακύμανση του βάρους των ψαριών στην αρχή της δοκιμής. Κατάλληλες περιοχές μεγεθών για τα διάφορα είδη που συνιστώνται για χρήση στη δοκιμή αυτή δίνονται στο προσάρτημα 2. Για το σύνολο της παρτίδας ψαριών που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, το εύρος βάρους σώματος ανά άτομο για αρσενικά και θηλυκά ψάρια στην έναρξη της δοκιμής θα πρέπει, εάν είναι δυνατόν, να διατηρείται εντός του $\pm 20 \%$ του αριθμητικού μέσου βάρους του ίδιου φύλου. Πριν από τη δοκιμή συνιστάται να ζυγίζεται ένα μερικό δείγμα του αποθέματος ψαριών, για να εκτιμάται το μέσο βάρος.

Συνθήκες έκθεσης*Διάρκεια*

26. Η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 21 ημέρες, μετά από μια περίοδο προέκθεσης. Η συνιστώμενη περίοδος προέκθεσης είναι μία εβδομάδα.

Σίτιση

27. Τα ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται κατά βούληση (*ad libitum*) με κατάλληλη τροφή (προσάρτημα 2) και σε επίπεδα επαρκή για να διατηρηθεί η φυσική κατάσταση. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροβίων και η εμφάνιση θολότητας στο νερό. Ως γενική κατεύθυνση, το ημερήσιο σιτηρέσιο μπορεί να διαιρείται σε δύο ή τρεις ίσες μερίδες για πολλαπλές σιτίσεις την ημέρα, διαχωριζόμενες από τουλάχιστον τρεις ώρες ανάμεσα σε κάθε σίτιση. Ένα μόνο μεγαλύτερο σιτηρέσιο είναι αποδεκτό, ιδίως για τα σαββατοκύριακα. Η σίτιση των ψαριών θα πρέπει να διακόπτεται 12 ώρες πριν από τη δειγματοληψία/νεκρωσία.
28. Η τροφή των ψαριών θα πρέπει να αξιολογείται για την παρουσία προσμειξεων όπως οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), πολυχλωριωμένα διφαινυλίου (PCB). Τροφές με υψηλό επίπεδο φυτοοιστρογόνων που μπορούν να διακυβέυσουν την απόκριση της δοκιμής σε γνωστό αγωνιστή οιστρογόνων (π.χ. 17β-οιστραδιόλη) θα πρέπει να αποφεύγονται.
29. Τα υπολείμματα των τροφών και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται από τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα, π.χ. με προσεκτικό καθαρισμό του πυθμένα κάθε δεξαμενής με σιφόνιο.

Φως και θερμοκρασία

30. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα είδη δοκιμής (βλ. προσάρτημα 2).

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

31. Πριν από την έναρξη της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να διασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του συστήματος παροχής της χημικής ουσίας. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που απαιτούνται, θα πρέπει να έχουν καθιερωθεί, συμπεριλαμβανομένων επαρκών γνώσεων σχετικά με τη χημική σταθερότητα στο σύστημα δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας προσδιορίζονται σε τακτά διαστήματα, ως εξής: οι ταχύτερες ροής του μέσου αραίωσης και του τοξικού διαλύματος παρακαταθήκης θα πρέπει να ελέγχονται κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα και δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Συνιστάται οι πραγματικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας να μετρηθούν σε όλα τα δοχεία κατά την έναρξη της δοκιμής, και κατόπιν ανά εβδομάδα.
32. Συνιστάται να βασίζονται τα αποτελέσματα σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του $\pm 20 \%$ της ονομαστικής συγκεντρώσεως καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.
33. Ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειάζεται να διηθηθούν (π.χ. χρησιμοποιώντας διηθητικό μέσο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm) ή να φυγοκεντρηθούν. Εάν χρειάζεται, τότε η συνιστώμενη διαδικασία είναι η φυγοκέντρωση. Πάντως, εφόσον η υπό δοκιμή ουσία δεν προσροφάται στα φίλτρα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η διήθηση.

34. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το διαλυμένο οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται σε όλα τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η συνολική σκληρότητα και αλκαλικότητα θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο με την υψηλότερη συγκέντρωση τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε ένα, τουλάχιστον, δοχείο δοκιμής.

Παρατηρήσεις

35. Ορισμένες γενικές (π.χ. επιβίωση) και βασικές βιολογικές αντιδράσεις (π.χ. τα επίπεδα λεκιδιογενίνης) αξιολογούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Η μέτρηση και η αξιολόγηση αυτών των τελικών σημείων και η χρησιμότητά τους περιγράφονται κατωτέρω.

Επιβίωση

36. Τα ψάρια θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου της δοκιμής, να καταγράφεται οποιαδήποτε θνησιμότητα και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται το ταχύτερο δυνατό. Τα νεκρά ψάρια δεν θα πρέπει να αντικαθίσταται ούτε στα δοχεία του μάρτυρα ούτε στα δοχεία αγωγής. Το φύλο των ψαριών που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής θα πρέπει να προσδιορίζεται με μακροσκοπική αξιολόγηση των γονάδων.

Συμπεριφορά και εμφάνιση

37. Κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά (σε σχέση με τους μάρτυρες) θα πρέπει να σημειώνεται· αυτό μπορεί να περιλαμβάνει ενδείξεις γενικής τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων υπεραερισμού, μη συγχρονισμένης κολύμβησης, απώλεια ισορροπίας και άτυπης αδράνειας ή άτυπης συμπεριφοράς σίτισης. Επίσης, θα πρέπει να σημειώνονται τυχόν εξωτερικές ανωμαλίες (όπως π.χ. αιμορραγία, αποχρωματισμός). Οι εν λόγω ενδείξεις τοξικότητας θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή κατά την ερμηνεία των στοιχείων, δεδομένου ότι μπορούν να αναφέρουν συγκεντρώσεις στις οποίες οι βιοδείκτες της ενδοκρινικής δραστηριότητας δεν είναι αξιόπιστοι. Τέτοιες παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά μπορούν ενδεχομένως να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές πληροφορίες για την ενημέρωση των δυνητικών μελλοντικών απαιτήσεων για τις δοκιμές σε ψάρια. Για παράδειγμα, η χωροκατακτητική επιθετικότητα σε κανονικά αρσενικά ή αρρενοποιημένα θηλυκά έχει παρατηρηθεί σε λιποκέφαλους φοξίνους που εκτίθενται σε ανδρογόνα· στα ζεβράψαρα, η χαρακτηριστική συμπεριφορά ζευγαρώματος και ωοτοκίας μετά την ενεργοποίηση του φωτός για το χάρωμα μειώνεται ή παρεμποδίζεται από την έκθεση σε οιστρογόνα ή αντι-ανδρογόνα.
38. Επειδή ορισμένες πτυχές της εμφάνισης (κυρίως το χρώμα) μπορούν να αλλάξουν γρήγορα με τον χειρισμό, είναι σημαντικό οι ποιοτικές παρατηρήσεις να πραγματοποιούνται πριν από την απομάκρυνση των ζώων από το σύστημα δοκιμής. Η μέχρι σήμερα εμπειρία με τον λιποκέφαλο φοξίνο δείχνει ότι μερικές χημικές ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα ενδέχεται αρχικά να επιφέρουν αλλαγές στα ακόλουθα εξωτερικά χαρακτηριστικά: χρώμα σώματος (ανοιχτό ή σκούρο), μοτίβα χρωματισμού (παρουσία κάθετων λωρίδων), και σχήμα σώματος (κεφάλι και θωρακική περιοχή). Ως εκ τούτου, οι παρατηρήσεις της φυσικής εμφάνισης των ψαριών θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής και κατά την ολοκλήρωση της μελέτης

Μη βίαιη θανάτωση των ψαριών

39. Κατά την 21η ημέρα, δηλαδή κατά τον τερματισμό της έκθεσης, τα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία με κατάλληλες ποσότητες τρικαιίνης (μεθανοσουλφονική τρικαιίνη, μετακαΐνη, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l όπου έχει προστεθεί ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 300 mg/l NaHCO₃ (διττανθρακικό νάτριο, CAS 144-55-8) για τον περιορισμό του ερεθισμού του βλεννογόνου· στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα ιστών ή αίματος για τον προσδιορισμό της λεκιδιογενίνης, όπως εξηγείται στην ενότητα για τη λεκιδιογενίνη.

Παρατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου

40. Μερικές χημικές ουσίες που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα μπορούν να επιφέρουν αλλαγές σε εξειδικευμένα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (αριθμός γαμήλιων φυματίων σε αρσενικούς λιποκέφαλους φοξίνους, θηλώδεις διεργασίες σε αρσενικά ρυζόψαρα). Ιδίως χημικές ουσίες με ορισμένους τρόπους δράσης μπορεί να προκαλέσουν ασυνήθη εμφάνιση δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε ζώα του αντίθετου φύλου· Για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η τρενβολόνη, η μεθυλοτεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη, μπορεί να κάνουν τους θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους να αναπτύξουν προεξέχοντα γαμήλια φυμάτια ή τα θηλυκά ρυζόψαρα να αναπτύξουν θηλώδεις διεργασίες (11, 20, 21). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των γαμήλιων φυματίων και το μέγεθος του ραχιαίου λιπώματος στα ενήλικα αρσενικά (25, 26). Τέτοιες μακροσκοπικές μορφολογικές παρατηρήσεις μπορούν ενδεχομένως να παράσχουν χρήσιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για την ενημέρωση των δυνητικών μελλοντικών απαιτήσεων για τις δοκιμές σε ψάρια. Ο αριθμός και το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στους λιποκέφαλους φοξίνους και οι θηλώδεις διεργασίες στα ρυζόψαρα μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα ποσοτικά ή πιο ουσιαστικά σε διατηρημένα δείγματα. Συνιστώμενες διαδικασίες για την αξιολόγηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στους λιποκέφαλους φοξίνους και στα ρυζόψαρα διατίθενται από το προσάρτημα 5α και 5β αντίστοιχα.

Λεκιθογενίνη (VTG)

41. Το αίμα συλλέγεται από την ουραία αρτηρία/φλέβα με τριχοειδή ηπαρινισμένα σωληνάκια αιματοκρίτη ή, εναλλακτικά, με καρδιακή παρακέντηση με σύριγγα. Ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών, οι ποσότητες αίματος που μπορούν να συλλεγούν κυμαίνονται γενικά από 5 έως 60 μl ανά άτομο για τους λιποκέφαλους φοξίνους και 5-15 μl ανά άτομο για τα ζεβρόψαρα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης, και φυλάσσεται με αναστολείς πρωτεάσης στους -80°C , μέχρι να αναλυθεί για λεκιθογενίνη. Εναλλακτικά, στα ρυζόψαρα θα χρησιμοποιηθεί το ήπαρ, ενώ στα ζεβρόψαρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλής/ουράς για τον προσδιορισμό της λεκιθογενίνης (προσάρτημα 6). Η μέτρηση της λεκιθογενίνης (VTG) θα πρέπει να βασίζεται σε επικυρωμένη ομόλογη μέθοδο ELISA, με χρήση πρότυπων και ομόλογων αντισωμάτων VTG. Συνιστάται η χρήση μιας μεθόδου που να επιτρέπει την ανίχνευση επιπέδων VTG τόσο χαμηλών όσο λίγων ng/ml πλάσματος (ή ng/mg ιστού), που αποτελεί το επίπεδο υποβάθρου σε μη εκτεθειμένα αρσενικά ψάρια.
42. Ο έλεγχος ποιότητας της ανάλυσης της λεκιθογενίνης θα διεξαχθεί με τη χρήση προτύπων, τυφλών δειγμάτων και τουλάχιστον διπλών αναλύσεων. Για κάθε μέθοδο ELISA θα πρέπει να διεξάγεται μια δοκιμή για την επίδραση της μήτρας (επίδραση της αραίωσης του δείγματος) για τον προσδιορισμό του ελάχιστου συντελεστή αραίωσης του δείγματος. Κάθε τρυβλίο ELISA που χρησιμοποιείται για δοκιμές VTG θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα δείγματα ελέγχου της ποιότητας: τουλάχιστον 6 πρότυπα βαθμονόμησης που καλύπτουν το εύρος των αναμενόμενων συγκεντρώσεων λεκιθογενίνης και τουλάχιστον μία τυφλή δοκιμή μη ειδικής δέσμευσης (ανάλυση εις διπλούν). Η απορρόφηση των εν λόγω τυφλών δειγμάτων πρέπει να είναι μικρότερη από το 5 % της μέγιστης απορρόφησης του προτύπου βαθμονόμησης. Αναλύονται τουλάχιστον δύο κλάσματα (διπλές πλάκες βοθρίων) από κάθε αραίωση δείγματος. Διπλές πλάκες βοθρίων που διαφέρουν περισσότερο του 20 % θα πρέπει να επανυποβάλλονται σε ανάλυση.
43. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) για τις καμπύλες βαθμονόμησης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 0,99. Ωστόσο, η υψηλή συσχέτιση δεν αρκεί για να διασφαλιστεί επαρκής πρόβλεψη της συγκέντρωσης σε όλο το εύρος τιμών. Πέρα από την ύπαρξη μίας αρκούντως υψηλής συσχέτισης για την καμπύλη βαθμονόμησης, η συγκέντρωση του κάθε προτύπου, όπως υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 120 % της ονομαστικής συγκέντρωσης. Εάν οι ονομαστικές συγκεντρώσεις τείνουν να απομακρύνονται από τη γραμμή παλινδρόμησης της βαθμονόμησης (π.χ. σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις), μπορεί να είναι απαραίτητο να χωριστεί η καμπύλη βαθμονόμησης σε χαμηλό και υψηλό εύρος τιμών ή να χρησιμοποιηθεί μη γραμμικό μοντέλο για να ενταχθούν επαρκώς τα δεδομένα απορρόφησης. Εάν η καμπύλη διαχωριστεί, αμφότερα τα τμήματα γραμμής θα πρέπει να έχουν $R^2 > 0,99$.
44. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η συγκέντρωση του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου, και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ορίζεται ως η συγκέντρωση του χαμηλότερου αναλυτικού προτύπου πολλαπλασιαζόμενο με τον χαμηλότερο συντελεστή αραίωσης.
45. Για κάθε ημέρα που εκτελούνται δοκιμές λεκιθογενίνης, αναλύεται ένα δείγμα εμπλουτισμού που καταρτίζεται με χρήση ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών (προσάρτημα 7). Ο λόγος της αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα από κάθε σύνολο δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

Αξιολόγηση των αποκρίσεων των βιοδεικτών με ανάλυση διασποράς (ANOVA)

46. Για τον προσδιορισμό δυνητικής ενδοκρινικής δραστηριότητας μιας χημικής ουσίας, οι αποκρίσεις συγκρίνονται μεταξύ των αγωγών και των ομάδων μαρτύρων με ανάλυση διασποράς (ANOVA). Εάν χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη, θα πρέπει να εκτελείται κατάλληλη στατιστική δοκιμή μεταξύ του νερού αραίωσης και των μαρτύρων με διαλύτη για κάθε τελικό σημείο. Οδηγίες για τον τρόπο χειρισμού των στοιχείων του νερού αραίωσης και του μάρτυρα με διαλύτη στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση περιέχονται στον ΟΟΣΑ, 2006c (27). Όλα τα δεδομένα βιολογικής απόκρισης θα πρέπει να αναλυθούν και να αναφέρονται χωριστά ανά φύλο. Εάν δεν πληρούνται οι υποθέσεις που απαιτούνται για παραμετρικές μεθόδους — μη κανονική κατανομή (π.χ. δοκιμή Shapiro-Wilk ή δοκιμή Leven) ή ετερογενής μεταβλητότητα (variance) (δοκιμή Bartlett), θα πρέπει να εξεταστεί η μετατροπή των δεδομένων για την ομοιογενοποίηση των βαθμών μεταβλητότητας (variance) πριν από την εκτέλεση της ANOVA ή η εκτέλεση σταθμισμένης ANOVA. Μια δοκιμή Dunnett (παραμετρική) σε πολλαπλές συγκρίσεις με ζεύγη ή μια δοκιμή Mann-Whitney με προσαρμογή Bonferroni (μη παραμετρική) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μη μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης. Άλλες στατιστικές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν (π.χ. δοκιμή Jonckheere-Terpstra ή δοκιμή Williams) εάν η σχέση δόσης-απόκρισης είναι σχεδόν μονοτονική. Ένα στατιστικό διάγραμμα ροής παρέχεται στο προσάρτημα 8 για να βοηθήσει στην απόφαση σχετικά με την καταλληλότερη στατιστική δοκιμή που πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Συμπληρωματικές πληροφορίες διατίθενται επίσης από το έγγραφο του ΟΟΣΑ σχετικά με τις τρέχουσες προσεγγίσεις για στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικότοξικότητας (Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data) (27).

Αναφορά των αποτελεσμάτων των δοκιμών

47. Στα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών:

- υπεύθυνο προσωπικό και οι αρμοδιότητές του στη μελέτη·
- Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει ότι διαθέτει τεχνική ικανότητα χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα αντιπροσωπευτικών χημικών ουσιών

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- Χαρακτηρισμός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας
- Φυσική μορφή και φυσικοχημικές ιδιότητες που άπτονται της δοκιμασίας,
- Μέθοδος και συχνότητα προετοιμασίας των συγκεντρώσεων δοκιμής
- Πληροφορίες για τη σταθερότητα και τη βιοαποδομησιμότητα

Διαλύτης:

- Χαρακτηρισμός του διαλύτη (φύση, χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση)
- Αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Ζώα δοκιμής:

- Είδος και στέλεχος
- Προμηθευτής και συγκεκριμένες εγκαταστάσεις του προμηθευτή
- Ηλικία των ψαριών κατά την έναρξη της δοκιμής και αναπαραγωγική κατάσταση / κατάσταση ωοτοκίας
- Λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία εγκλιματισμού των ζώων
- Σωματικό βάρος των ψαριών κατά την έναρξη της έκθεσης (από ένα μερικό δείγμα από το απόθεμα ψαριών)

Συνθήκες δοκιμής:

- Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (είδος δοκιμής, ρυθμός πλήρωσης, πυκνότητα πληθυσμού, κ.λπ.)·
- Μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και ταχύτητα ροής·
- Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, εβδομαδιαία μετρούμενες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δοκιμής και αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται, μέσες τιμές των μετρηθεισών τιμών και οι τυπικές αποκλίσεις τους στα δοχεία δοκιμής και ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα·
- Χαρακτηριστικά του νερού αραιώσης (συμπεριλαμβανομένων του pH, της σκληρότητας, της αλκαλικότητας, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης διαλελυμένου οξυγόνου, των επιπέδων υπολειμματικού χλωρίου, του ολικού οργανικού άνθρακα, των αιωρούμενων στερεών και τυχόν άλλων μετρήσεων)
- Ποιότητα του νερού στα δοχεία δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης) καθώς και αναλύσεις για ανίχνευση σχετικών προσμειξεων, εάν υπάρχουν (π.χ. PCB, PAH και οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα).

Αποτελέσματα

- Στοιχεία ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής·
- Στοιχεία για τους θανάτους που προέκυψαν σε κάθε συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα·
- Χρησιμοποιηθείσες στατιστικές αναλυτικές τεχνικές, επεξεργασία των δεδομένων και αιτιολόγηση των χρησιμοποιηθεισών τεχνικών·
- Στοιχεία σχετικά με τις βιολογικές παρατηρήσεις της μακροσκοπικής μορφολογίας, συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και της λεκιθογενίνης·
- Αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων, κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα και γραφική μορφή·
- Στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή χημική ουσία.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

48. Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει ορισμένα θέματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών για τα διάφορα τελικά σημεία που μετρήθηκαν. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία φαίνεται να προκαλεί έκδηλη τοξικότητα ή επιδρά στη γενική κατάσταση του ζώου δοκιμής.
49. Στον καθορισμό του πεδίου των συγκεντρώσεων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη υπερβαίνεται η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων. Είναι σημαντικό να υπάρχει τουλάχιστον μία αγωγή στην οποία δεν υπάρχουν ενδείξεις τοξικών επιδράσεων. Ενδείξεις νόσου και ενδείξεις τοξικών επιδράσεων θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς και να αναφέρονται. Για παράδειγμα, η παραγωγή λεκιδιογενίνης (VTG) στα θηλυκά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενική τοξικότητα και μη ενδοκρινικούς τοξικούς τρόπους δράσης, π.χ. ηπατοτοξικότητα. Ωστόσο, η ερμηνεία των επιδράσεων μπορεί να ενισχυθεί με άλλα επίπεδα αγωγής στα αποτελέσματα των οποίων δεν επιδρά η συστηματική τοξικότητα ως συγχυτικός παράγοντας.
50. Υπάρχουν ορισμένες πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την αποδοχή των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Ενδεικτικά, τα επίπεδα VTG σε ομάδες μαρτύρων αρσενικών και θηλυκών θα πρέπει να είναι διακριτά και χωριστά κατά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους στον λιποκέφαλο φοξίνο και το ζεβρόψαρο, και περίπου μία τάξη μεγέθους στο ρυζόψαρο. Παραδείγματα από το φάσμα τιμών που ανέκυψαν στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής είναι διαθέσιμες στις εκθέσεις επικύρωσης (1, 2, 3, 4). Υψηλές τιμές VTG σε αρσενικούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την ικανότητα απόκρισης της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης ασθενών αγωνιστών οιστρογόνων. Χαμηλές τιμές VTG σε θηλυκούς μάρτυρες μπορούν να διακυβεύσουν την ικανότητα απόκρισης της δοκιμής και την ικανότητα ανίχνευσης αναστολέων αρωματάσης και αγωνιστών οιστρογόνων. Οι μελέτες επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των εν λόγω οδηγιών.
51. Εάν το εργαστήριο δεν έχει πραγματοποιήσει τη δοκιμή στο παρελθόν ή εάν έχουν πραγματοποιηθεί ουσιαστικές αλλαγές (π.χ. αλλαγή του στελέχους ή του προμηθευτή ψαριών) είναι σκόπιμο να διεξαχθεί μελέτη τεχνικής ικανότητας. Συνιστάται η χρήση χημικών ουσιών που καλύπτουν ένα φάσμα τρόπων δράσης ή επιπτώσεων για ορισμένα από τα τελικά σημεία της δοκιμής. Στην πράξη, κάθε εργαστήριο ενθαρρύνεται να δημιουργήσει δικά του ιστορικά δεδομένα μαρτύρων για αρσενικά και θηλυκά και να πραγματοποιήσει μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για οιστρογόνο δράση (π.χ. 17β-οιστραδιόλη σε 100 ng/l, ή έναν γνωστό ασθενή αγωνιστή) που να προκαλεί αύξηση της VTG στα αρσενικά ψάρια, μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για την αναστολή της αρωματάσης (π.χ. φαδροζόλη ή prochloraz σε 300 µg/l) που να προκαλεί μείωση της VTG στα θηλυκά ψάρια, και μια δοκιμή με θετικό μάρτυρα για ανδρογόνο δράση (π.χ. 17β-τρενβολόνη σε 5 µg/l) που να έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους και ρυζόψαρα. Όλα αυτά τα στοιχεία μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα στοιχεία από τις μελέτες επικύρωσης (1, 2, 3) να διασφαλιστεί η επάρκεια του εργαστηρίου.
52. Σε γενικές γραμμές, οι μετρήσεις λεκιδιογενίνης θα πρέπει να θεωρούνται θετικές εάν προκύπτει μια στατιστικά σημαντική αύξηση της VTG στα αρσενικά ($p < 0,05$), ή μια στατιστικά σημαντική μείωση στα θηλυκά ($p < 0,05$) τουλάχιστον στην υψηλότερη δόση δοκιμής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, και εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις γενικής τοξικότητας. Το θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται περαιτέρω από την απόδειξη βιολογικά ευλογοφανούς σχέσης μεταξύ της δόσης και της καμπύλης απόκρισης. Όπως προαναφέρθηκε, η μείωση της λεκιδιογενίνης δεν μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά στο ενδοκρινικό σύστημα· ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει εν γένει να ερμηνεύεται ως ένδειξη ενδοκρινικής δραστηριότητας *in vivo*, και θα πρέπει κανονικά να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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 1 B). 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> (πρόσβαση 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Αδημοσίευτη έκδοση με ημερομηνία 15 Δεκεμβρίου 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 17β-estradiol and 17β-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, Homung 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 17β-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
-

Προσάρτημα 1

Συντμήσεις και ορισμοί

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα

CV: Συντελεστής μεταβλητότητας.

ELISA: Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης

Πληθυσμιακός φόρτος: Το υγρό βάρος των ψαριών κατ' όγκο νερού.

Πυκνότητα πληθυσμού: Ο αριθμός των ψαριών κατ' όγκο νερού.

VTG (Δεκιθογενίνη): Πρόδρομη ουσία των φωσφογλυκολιποπρωτεϊνών της λεκίδου του αυγού σε σεξουαλικά ενεργά θηλυκά όλων των ωστόκων ειδών.

Άξονας (HPG): Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων.

ΜΑΣ: Μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση, που αντιπροσωπεύει περίπου 10 % της LC₅₀.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμή ενδοκρινικού έλεγχου σε ψάρια

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Συνιστώμενα είδη | Λιποκέφαλος φοξίνος (<i>Pimephales promelas</i>) | Ρυζόψαρο (<i>Oryzias latipes</i>) | Ζεβρόψαρο (<i>Danio rerio</i>) |
| 2. Τύπος δοκιμής | Συνεχούς ροής | Συνεχούς ροής | Συνεχούς ροής |
| 3. Θερμοκρασία νερού | 25 ± 2 °C | 25 ± 2 °C | 26 ± 2 °C |
| 4. Ποιότητα φωτισμού | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) |
| 5. Ένταση φωτός | 10-20 μE/m ² /s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) | 10-20 μE/m ² /s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) | 10-20 μE/m ² /s, 540-1 000 lux, ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) |
| 6. Φωτοπερίοδος [οι φάσεις μετάβασης (χάραμα/σούρουπο) είναι προαιρετικές, ωστόσο δεν θεωρούνται απαραίτητες] | 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι | 12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι | 12-16 ώρες φως, 12-8 ώρες σκοτάδι |
| 7. Πληθυσμιακός φόρτος | < 5 g ανά l | < 5 g ανά l | < 5 g ανά l |
| 8. Μέγεθος θαλάμου δοκιμής | 10 l (τουλάχιστον) | 2 l (τουλάχιστον) | 5 l (τουλάχιστον) |
| 9. Όγκος διαλύματος δοκιμής | 8 l (τουλάχιστον) | 1,5 l (τουλάχιστον) | 4 l (τουλάχιστον) |
| 10. Ανανεώσεις όγκου διαλυμάτων δοκιμής | Τουλάχιστον 6 ημερησίως | Τουλάχιστον 5 ημερησίως | Τουλάχιστον 5 ημερησίως |
| 11. Ηλικία των οργανισμών δοκιμής | Βλ. σημείο 20 | Βλ. σημείο 20 | Βλ. σημείο 20 |
| 12. Κατά προσέγγιση υγρό βάρος των ενήλικων ψαριών (g) | Θηλυκά 1,5 ± 20 % Αρσενικά: 2,5 ± 20 % | Θηλυκά 0,35 ± 20 % Αρσενικά: 0,35 ± 20 % | Θηλυκά 0,65 ± 20 % Αρσενικά: 0,4 ± 20 % |
| 13. Αριθμός ψαριών ανά δοχείο δοκιμής | 6 (2 αρσενικά και 4 θηλυκά) | 10 (5 αρσενικά και 5 θηλυκά) | 10 (5 αρσενικά και 5 θηλυκά) |
| 14. Αρ. αγωγών | = 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) | = 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) | = 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) |
| 15. Αρ. δοχείων ανά αγωγή | 4 κατ' ελάχιστο. | 2 κατ' ελάχιστο. | 2 κατ' ελάχιστο. |
| 16. Αριθμός ψαριών ανά συγκέντρωση δοκιμής | 16 ενήλικα θηλυκά και 8 αρσενικά (4 θηλυκά και 2 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης) | 10 ενήλικα θηλυκά και 10 αρσενικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης) | 10 ενήλικα θηλυκά και 10 αρσενικά (5 θηλυκά και 5 αρσενικά σε κάθε δοχείο επανάληψης) |

| | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17. Καθεστώς σίτισης | Ζωντανή ή κατεψυγμένη ενήλικη ή παυρλίι γαρίδα δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω | Γαρίδα παυρλίι δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω | Γαρίδα παυρλίι δύο ή τρεις φορές ημερησίως κατά βούληση (ad libitum), τροφή που διατίθεται στο εμπόριο ή συνδυασμός των παραπάνω |
| 18. Αερισμός | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα |
| 19. Νερό αραιώσης | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωρωμένο νερό βρύσης | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωρωμένο νερό βρύσης | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό ή αποχλωρωμένο νερό βρύσης |
| 20. Περίοδος προέκθεσης | Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες | Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες | Συνιστώμενο διάστημα: 7 ημέρες |
| 21. Διάρκεια έκθεσης στη χημική ουσία | 21 ημέρες | 21 ημέρες | 21 ημέρες |
| 22. Βιολογικά τελικά σημεία | επιβίωση συμπεριφορά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου λεκιθογενίνη | επιβίωση συμπεριφορά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου λεκιθογενίνη | επιβίωση συμπεριφορά λεκιθοβενίνη |
| 23. Αποδοχή της δοκιμής | Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία $25 \pm 2^\circ \text{C}$ · 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής. | Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία $24 \pm 2^\circ \text{C}$ · 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής. | Διαλυμένο οξυγόνο > 60 % της συγκέντρωσης κορεσμού· μέση θερμοκρασία $26 \pm 2^\circ \text{C}$ · 90 % επιβίωση των ψαριών στους μάρτυρες· μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής εντός του 20 % των μέσων μετρούμενων τιμών ανά επίπεδο αγωγής. |

Προσάρτημα 3

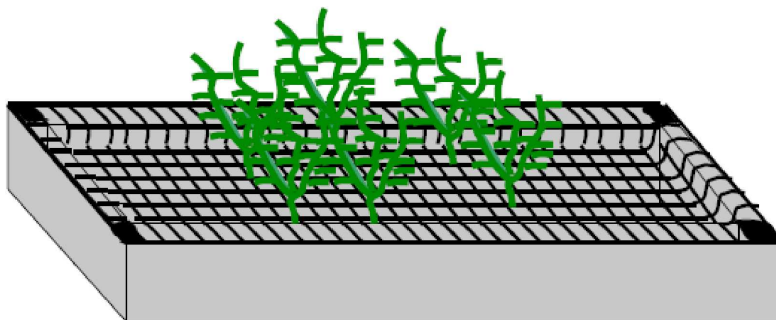
Ορισμένα χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού ύδατος αραιώσης

| Συστατικό | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ |
|---------------------------------------------------------------------|---------------|
| Σωματίδια | < 20 mg/l |
| Ολικός οργανικός άνθρακας | < 2 mg/l |
| Μη ιονισμένη αμμωνία | < 1 µg/l |
| Υπολείμματα χλωρίου | < 10 µg/l |
| Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα | < 50 ng/l |
| Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια | < 50 ng/l |
| Ολικό οργανικό χλώριο | < 25 ng/l |

Προσάρτημα 4Α

Υπόστρωμα ωτοκίας για ζεβροψαρα

Δίσκος ωτοκίας: εργαστηριακή γυάλινη πλάκα, για παράδειγμα 22 × 15 × 5.5 cm (μήκος x πλάτος x βάθος), καλυμμένη με αφαιρούμενο συρμάτινο πλέγμα από ανοξείδωτο χάλυβα (με ανοίγματα 2mm). Το πλέγμα θα πρέπει να καλύπτει το άνοιγμα του τρυβλίου οργάνων σε επίπεδο κάτω από το χείλος.



Πάνω στο πλέγμα θα πρέπει να στερεωθεί υπόστρωμα ωτοκίας. Αυτό αποτελεί μια δομή που επιτρέπει στα ψάρια να την διαπερνούν. Για παράδειγμα, κατάλληλα είναι τα τεχνητά φυτά ενυδρείου φτιαγμένα από πράσινο πλαστικό υλικό (σημείωση: θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το ενδεχόμενο προσρόφησης της χημικής ουσίας από το πλαστικό υλικό). Το πλαστικό υλικό θα πρέπει να αποπλυθεί με επαρκή ποσότητα θερμού νερού για επαρκές χρονικό διάστημα προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν πρόκειται να εκλυθούν χημικές ουσίες στο νερό δοκιμής. Όταν χρησιμοποιούνται υλικά από γυαλί θα πρέπει να διασφαλιστεί ότι τα ψάρια δεν θα τραυματιστούν ούτε θα περιορίζονται οι κινήσεις τους κατά τη διάρκεια των δυναμικών τους δράσεων.

Η απόσταση μεταξύ του τρυβλίου και των γυάλινων πλακών πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 cm για να εξασφαλιστεί ότι η ωτοκία δεν πραγματοποιείται εκτός του τρυβλίου. Τα αυγά που προκύπτουν πάνω στο δίσκο πέφτουν μέσα από το πλέγμα και μπορούν να ληφθούν ως δείγμα 45-60 λεπτά μετά την έναρξη του φωτισμού. Τα διάφανα αυγά δεν είναι κολλώδη και μπορεί εύκολα να μετρηθούν με τη χρήση εγκάρσιου φωτός. Με χρήση πέντε θηλυκών ανά δοχείο, ο αριθμός αυγών μέχρι 20 σε μια ημέρα μπορεί να θεωρηθεί χαμηλός, μέχρι 100 θεωρείται μεσαίος, και πάνω από 100 θεωρείται υψηλός αριθμός. Ο δίσκος ωτοκίας αφαιρείται, συλλέγονται τα αυγά και ο δίσκος επανεισάγεται στο δοχείο δοκιμής, είτε όσο το δυνατόν αργότερα το βράδυ ή πολύ νωρίς το πρωί. Η επανεισαγωγή του δίσκου γίνεται το αργότερο ύστερα από μία ώρα, διαφορετικά το σήμα του υποστρώματος ωτοκίας μπορεί να επαγάγει μεμονωμένο ζευγάρι και ωτοκία σε ασυνήθη χρόνο. Εάν μια κατάσταση απαιτεί μεταγενέστερη εισαγωγή του δίσκου ωτοκίας, αυτό θα πρέπει να γίνει τουλάχιστον 9 ώρες μετά την έναρξη του φωτισμού. Σ' αυτό το τελευταίο διάστημα της ημέρας δεν προκαλείται πλέον ωτοκία.

Προσάρτημα 4 Β

Υπόστρωμα αναπαραγωγής για λιποκεφαλουσ φοξινουσ

Δύο ή τρία συνδυασμένα πλαστικά/κεραμικά/γυάλινα ή από ανοξείδωτο χάλυβα πλακίδια και δίσκοι ωτοκίας τοποθετούνται σε κάθε θάλαμο δοκιμής (π.χ. 80 mm μήκος γκρίζων ημικυκλικών υδρορροών τοποθετούνται σε δίσκο με υπερυψωμένα άκρα μήκους 130 mm) (βλ. εικόνα). Κατάλληλα προετοιμασμένα πλαστικά ή κεραμικά πλακίδια έχουν αποδειχθεί ότι ενδείκνυνται ως υπόστρωμα ωτοκίας (Thorpe *et al*, 2007).

Συνιστάται τα πλακίδια να έχουν υποβληθεί σε λείανση για να βελτιωθεί η πρόσφυση. Ο δίσκος θα πρέπει επίσης να διαθέτει διαχωριστικό προστασίας ώστε να μην μπορούν τα ψάρια να έχουν πρόσβαση στα πεσμένα αυγά, εκτός εάν έχει αποδειχθεί η ικανότητα προσκόλλησης των αυγών για το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ωτοκίας.



Η βάση είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να περιλαμβάνει τα αυγά που δεν κόλλησαν στην επιφάνεια των πλακιδίων και, ως εκ τούτου, θα έπεσαν στον πυθμένα της δεξαμενής (ή αυτά τα αυγά που εναποτέθηκαν απευθείας επάνω στην επίπεδη πλαστική βάση). Όλα τα υποστρώματα ωτοκίας πρέπει να αποπλυθούν για τουλάχιστον 12 ώρες, σε νερό αραιώσης, πριν από τη χρήση.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

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.

Προσάρτημα 5 Α

Εκτίμησή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στον λιποκέφαλο όξινο για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα**Επισκόπηση**

Τα δυνητικά σημαντικά χαρακτηριστικά της φυσικής εμφάνισης των ενήλικων λιποκέφαλων φοξίνων σε δοκιμές ενδοκρινικών διαταρακτών περιλαμβάνουν χρώμα σώματος (π.χ. ανοικτό/σκούρο), μοτίβα χρωματισμού (π.χ. παρουσία ή απουσία κάθπτων λωρίδων), σχήμα σώματος (π.χ. σχήμα κεφαλής και θωρακικής περιοχής, διάταση κοιλιακής χώρας), και ειδικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (π.χ. αριθμός και μέγεθος των γαμήλιων φυματίων, μέγεθος του ραχιαίου λιπώματος και του ωσέτη).

Τα γαμήλια φυμάτια βρίσκονται στο κεφάλι (ραχιαίο λίπωμα) του αναπαραγωγικά ενεργού αρσενικού λιποκέφαλου φοξίνου, και είναι συνήθως διατεταγμένα συμμετρικά στις δύο πλευρές (Jensen et al. 2001). Οι θηλυκοί και οι νεαροί αρσενικοί μάρτυρες δεν παρουσιάζουν ανάπτυξη φυματίων (Jensen et al. 2001). Έως και οκτώ μεμονωμένα φυμάτια μπορούν να υπάρχουν γύρω από τα μάτια και μεταξύ των ρουθουινών των αρσενικών. Τα περισσότερα και μεγαλύτερα φυμάτια βρίσκονται σε δύο παράλληλες γραμμές ακριβώς κάτω από τα ρουθούνια και πάνω από το στόμα. Σε πολλά ψάρια υπάρχουν ομάδες φυματίων κάτω από την κάτω γνάθο· τα εγγύτερα στο στόμα απαντώνται γενικά ως ένα και μοναδικό ζεύγος, ενώ η ομάδα που βρίσκεται στην κοιλιακή μοίρα μπορεί να αποτελείται από έως και τέσσερα φυμάτια. Οι πραγματικοί αριθμοί των φυματίων σπάνια υπερβαίνουν τα 30 (εύρος 18-28· Jensen et al. 2001). Τα επικρατέστερα φυμάτια (από άποψη αριθμού) περιλαμβάνονται ως ενιαία, σχετικά στρογγυλή δομή, με ύψος περίπου ισοδύναμο με εκείνο της ακτίνας. Τα περισσότερα αναπαραγωγικά ενεργά αρσενικά διαθέτουν επίσης, τουλάχιστον ορισμένα, φυμάτια που είναι τόσο διευρυμένα και προεξέχοντα ώστε να μην είναι μη διακριτά ως επιμέρους δομές.

Ορισμένα είδη ενδοκρινολογικών χημικών ουσιών μπορούν να προκαλέσουν την ανώμαλη εμφάνιση ορισμένων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στο αντίθετο φύλο· για παράδειγμα, αγωνιστές των υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η 17β-μεθυλοτεστοστερόνη ή η 17β-τρενβολόνη, μπορούν να κάνουν τους θηλυκούς λιποκέφαλους φοξίνους να αναπτύξουν γαμήλια φυμάτια (Smith 1974· Ankley et al. 2001· 2003), ενώ οι αγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων ενδέχεται να μειώσουν τον αριθμό ή το μέγεθος των γαμήλιων φυματίων στα αρσενικά (Miles-Richardson et al. 1999· Harries et al. 2000).

Ακολουθεί περιγραφή του χαρακτηρισμού των γαμήλιων φυματίων σε λιποκέφαλους φοξίνους βάσει των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται από το εργαστήριο του οργανισμού για την προστασία του περιβάλλοντος των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency) στο Duluth, MN. Ειδικά προϊόντα και/ή εξοπλισμός μπορούν να αντικατασταθούν με συγκρίσιμα διαθέσιμα υλικά.

Η παρατήρηση επιτυγχάνεται καλύτερα με τη χρήση ενός φωτιζόμενου διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου με μεγέθυνση 3x. Η εξέταση των ψαριών γίνεται κατά μήκος της ράχης και προσθίως (κεφαλή προς τον εξεταστή).

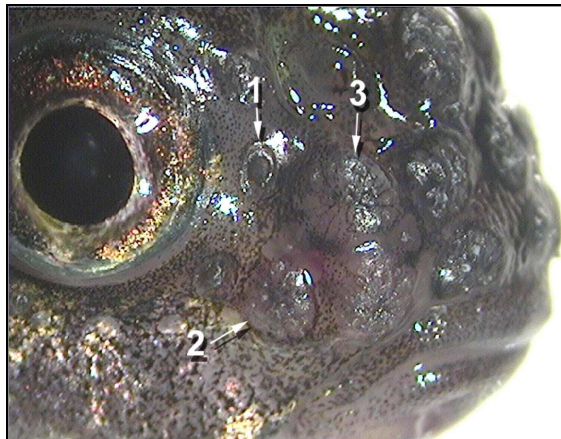
- Τοποθετήστε το ψάρι σε μικρό τρυβλίο Petri (π.χ. διαμέτρου 100 mm), με την μπροστινή πλευρά προς τα εμπρός και με την κοιλιά προς τα κάτω. Εστιάστε τον φακό ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός των φυματίων. Κυλήστε το ψάρι με ήπιο και αργό τρόπο από τη μία πλευρά στην άλλη για να εντοπίσετε τις περιοχές με τα φυμάτια. Καταμετρήστε και βαθμολογήστε τα φυμάτια.
- Επαναλάβετε την παρατήρηση στην πρόσθια κοιλιακή μοίρα τοποθετώντας το ψάρι επί της ράχης και την μπροστινή πλευρά προς τα εμπρός στο τρυβλίο Petri.
- Οι παρατηρήσεις πρέπει να ολοκληρώνονται εντός 2 λεπτών για κάθε ψάρι.

Καταμέτρηση και αξιολόγηση φυματίων

Έξι συγκεκριμένοι τομείς έχουν προσδιοριστεί για την αξιολόγηση της παρουσίας και της ανάπτυξης φυματίων στους ενήλικους λιποκέφαλους φοξίνους. Ένα πρότυπο αναπτύχθηκε για να χαρτογραφηθεί η τοποθεσία και η ποσότητα των υπαρχόντων φυματίων (βλ. τέλος του παρόντος προσαρτήματος). Ο αριθμός των φυματίων καταγράφεται και το μέγεθός τους μπορεί να ταξινομηθεί ποσοτικά ως εξής: 0- απουσία, 1-παρόν, 2-διευρυμένο και 3-προεξέχον για κάθε οργανισμό (εικ. 1).

Κλάση 0- απουσία φυματίων. Κλάση 1-παρόν: χαρακτηρίζεται κάθε φυμάτιο που έχει ένα μόνο σημείο του οποίου το ύψος είναι σχεδόν ίσο με την ακτίνα του (διάμετρος). Κλάση 2- διευρυμένο, χαρακτηρίζεται από ιστό που μοιάζει με αστερίσκο στην εμφάνιση, συνήθως με μεγάλη ακτινωτή βάση με ραβδώσεις ή αύλακες που εξέρχονται από το κέντρο. Η κορυφή των φυματίων είναι συχνά πιο οδοντωτή αλλά μπορεί να είναι ελαφρώς στρογγυλεμένη κατά καιρούς. Κλάση 3- προεξέχον, είναι συνήθως πολύ μεγάλο και στρογγυλεμένο με λιγότερο καθορισμένη δομή. Σε μερικές περιπτώσεις τα εν λόγω φυμάτια εμφανίζονται μαζί σχηματίζοντας ενιαία μάζα κατά μήκος μιας μεμονωμένης περιοχής ή ενός συνδυασμού περιοχών (Β, Γ και Δ, όπως περιγράφεται παρακάτω). Χρωματισμός και σχέδιο είναι παρόμοια με την κλάση 2, αλλά κατά περιόδους σχετικώς ασαφή. Η χρήση του εν λόγω συστήματος οδηγεί κατά κανόνα σε συνολική βαθμολογία φυματίων < 50 σε έναν συνήθη αρσενικό μάρτυρα που διαθέτει από 18 έως 20 φυμάτια (Jensen et al. 2001).

Εικόνα 1



Ο πραγματικός αριθμός των φυματίων σε ορισμένα ψάρια μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τα διαθέσιμα τετραγωνίδια του υποδείγματος (προσάρτημα Α) για κάθε περιοχή αξιολόγησης. Στην περίπτωση αυτή, επιπλέον αριθμοί κλάσεων μπορούν να σημειωθούν εντός, στα δεξιά ή στα αριστερά του τετραγωνιδίου. Το υπόδειγμα δεν χρειάζεται να εμφανίζει συμμετρία. Πρόσθετη τεχνική για τη χαρτογράφηση φυματίων που είναι κατά ζεύγη ή ενώθηκαν κάθετα κατά μήκος του οριζόντιου επιπέδου του στόματος μπορεί να γίνει σημειώνοντας τις δύο κλάσεις φυματίων στο ίδιο τετραγωνίδιο.

Περιοχές χαρτογράφησης:

Α — Φυμάτια που βρίσκονται γύρω από τον οφθαλμό. Χαρτογράφηση από τη από τη ραχιαία προς την κοιλιακή μοίρα γύρω από το πρόσθιο περίβλημα του οφθαλμού. Πολλαπλά συνήθως σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες, απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες, γενικά σε ζεύγη (ένα κοντά σε κάθε οφθαλμό) ή μεμονωμένα σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Β — Φυμάτια που εντοπίζονται ανάμεσα στα ρουθούνια, (αισθητήρια κανάλια-πόροι). Συνήθως σε ζεύγη για τους αρσενικούς μάρτυρες σε πιο υψηλά επίπεδα (2- διευρυμένα ή 3- προεξέχοντα) της ανάπτυξης. Απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες με κάποια εμφάνιση και ανάπτυξη σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Γ — Φυμάτια που βρίσκονται ακριβώς μπροστά από τα ρουθούνια, παράλληλα στο στόμα. Γενικά διευρυμένα ή προεξέχοντα σε ώριμους αρσενικούς μάρτυρες. Παρόντα ή διευρυμένα σε λιγότερο ανεπτυγμένα αρσενικά ή σε θηλυκά που έχουν υποστεί αγωγή με ανδρογόνα.

Δ — Φυμάτια που βρίσκονται παράλληλα κατά μήκος της γραμμής του στόματος. Συνήθως ταξινομημένα ως ανεπτυγμένα σε αρσενικούς μάρτυρες. Απόντα σε θηλυκούς μάρτυρες αλλά παρόντα σε θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

Ε — Φυμάτια που βρίσκονται στην κάτω γνάθο, κοντά στο στόμα, συνήθως μικρά κατά κανόνα σε ζεύγη. Ποικιλούν σε αρσενικούς μάρτυρες ή αρσενικά που έχουν υποστεί αγωγή, και θηλυκά που έχουν υποστεί αγωγή.

ΣΤ — Φυμάτια που βρίσκονται κοιλιακά του Ε. Κατά κανόνα μικρά και σε ζεύγη. Παρόντα σε αρσενικούς μάρτυρες και θηλυκά που έχουν εκτεθεί σε ανδρογόνα.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (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.

Υπόδειγμα φυματίων

Αριθμητική ταξινόμηση

ID _____

1-παρόν

Ημερομηνία _____

2-διευρυμένο

Συνολική βαθμολογία _____

3-προεξέχον

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | A | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | B | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | Γ | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 |
| | Δ | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 | X1 |

| | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|
| | E | X1 | X1 | | |
| | ΣΤ | X1 | X1 | X1 | X1 |

Προσάρτημα 5 Β

Εκτίμησή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στο ρυζόχαρτο για την ανίχνευση ορισμένων χημικών ουσιών που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα

Ακολουθεί περιγραφή της μέτρησης των θηλωδών διεργασιών (*), που είναι τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου στο ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*).

(*) Οι θηλώδεις διεργασίες εμφανίζονται συνήθως μόνο σε ενήλικα αρσενικά και απαντώνται στις ακτίνες των πτερυγίων από τη δεύτερη στην έβδομη ή όγδοη μετρώντας από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου (εικόνες 1 και 2). Ωστόσο, οι διεργασίες σπάνια εμφανίζονται στην πρώτη ακτίνα του πτερυγίου από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου. Αυτή η τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (ΤΔΛ) καλύπτει τη μέτρηση των διεργασιών στην πρώτη ακτίνα του πτερυγίου (ο αριθμός ακτίνας πτερυγίου παραπέμπει στη διάταξη από το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου στην εν λόγω ΤΔΛ).

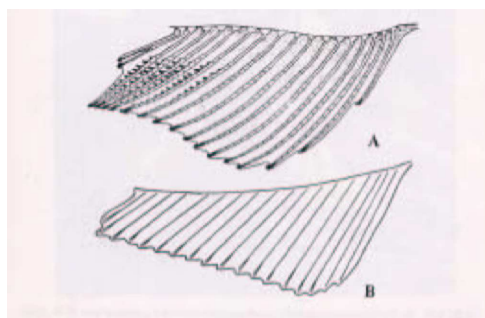
- 1) Μετά την εκτομή του ήπατος (προσάρτημα 6), το νεκρό σώμα τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα που περιέχει περίπου 10 ml ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 % (κεφαλή προς τα πάνω, ουρά προς τα κάτω). Εάν η γονάδα έχει μονιμοποιηθεί σε διάλυμα διαφορετικό από το ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 %, προβείτε με χρήση λεπίδας σε εγκάρσια τομή κατά μήκος του νεκρού σώματος μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού, προσέχοντας να μην βλάψετε τον γονοπόρο ή την ίδια τη γονάδα (εικ. 3). Τοποθετήστε την κρανιακή πλευρά του σώματος του ψαριού στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη διατήρηση της γονάδας, και την ουραία πλευρά του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 %, όπως περιγράφεται παραπάνω.
- 2) Μετά την τοποθέτηση του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 %, πιάστε την εμπρόσθια περιοχή του εδρικού πτερυγίου με λαβίδες και διπλώστε το για περίπου 30 δευτερόλεπτα για να διατηρήσετε το εδρικό πτερύγιο ανοικτό. Καθώς πιάνετε το εδρικό πτερύγιο με λαβίδες, πιάστε μερικές ακτίνες του πτερυγίου στην εμπρόσθια περιοχή με προσοχή ώστε να μην γρατζουνίσετε τις θηλώδεις διεργασίες.
- 3) Αφού έχετε κρατήσει το εδρικό πτερύγιο ανοικτό για περίπου 30 δευτερόλεπτα, αποθηκεύστε το σώμα του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 % σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη μέτρηση των θηλωδών διεργασιών (η μέτρηση θα πρέπει να διενεργείται αφού μονιμοποιηθεί για τουλάχιστον 24 ώρες).

Μέτρηση

- (1) Μετά τη μονιμοποίηση του σώματος του ψαριού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 % για τουλάχιστον 24 ώρες, πάρτε το νεκρό σώμα του ψαριού από τον κωνικό σωλήνα και σκουπίστε τη φορμαλδεύδη στο διηθητικό χαρτί (ή σε απορροφητικό χαρτί).
- (2) Τοποθετήστε το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια κόψτε προσεκτικά το εδρικό πτερύγιο με μικρό ψαλίδι ανατομής (είναι προτιμότερο να κόψετε το εδρικό πτερύγιο μαζί με μικρή ποσότητα πτερυγοφόρου).
- (3) Πιάστε την πρόσθια περιοχή του αποκομμένου εδρικού πτερυγίου με λαβίδες και τοποθετήστε το επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρα πλάκα μαζί με αρκετές σταγόνες νερού. Στη συνέχεια καλύψτε το εδρικό πτερύγιο με γυάλινο κάλυμμα. Προσέξτε να μην γρατζουνίσετε τις θηλώδεις διεργασίες όταν πιάνετε με τις λαβίδες το εδρικό πτερύγιο.
- (4) Μετρήστε τον αριθμό των συμφύσεων που εμφανίζουν θηλώδεις διεργασίες χρησιμοποιώντας βιολογικό μικροσκόπιο (όρθιο μικροσκόπιο ή ανεστραμμένο μικροσκόπιο). Οι θηλώδεις διεργασίες αναγνωρίζονται όταν ένας μικρός σχηματισμός διεργασιών είναι ορατός στην οπίσθια μοίρα των συμφύσεων. Σημειώστε τον αριθμό συμφύσεων με θηλώδεις διεργασίες σε κάθε ακτίνα του πτερυγίου στο φύλλο εργασίας (π.χ. πρώτη ακτίνα του πτερυγίου: 0, δεύτερη ακτίνα του πτερυγίου: 10, τρίτη ακτίνα του πτερυγίου: 12, κ.λπ.) και εισάγετε τον συνολικό αριθμό αυτών στο φύλλο excel για κάθε μεμονωμένο ψάρι. Εάν χρειάζεται, βγάλτε μια φωτογραφία του εδρικού πτερυγίου και μετρήστε τον αριθμό των συμφύσεων με θηλώδεις διεργασίες πάνω στη φωτογραφία.
- (5) Μετά τη μέτρηση, τοποθετήστε το εδρικό πτερύγιο στον κωνικό σωλήνα που περιγράφεται στο 1) και αποθηκεύστε το.

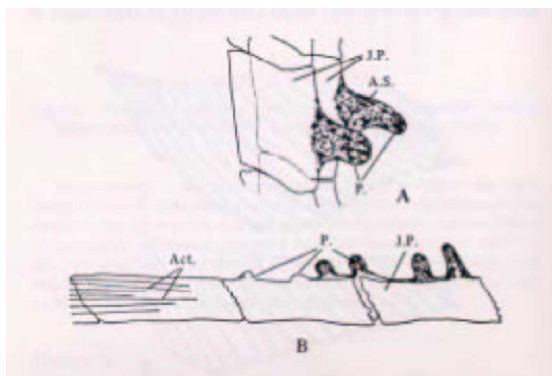
Εικόνα 1.

Διάγραμμα που απεικονίζει τη διαφορά των φύλων ως προς το σχήμα και το μέγεθος του εδρικού πτερυγίου. Α, αρσενικό· Β, θηλυκό. 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.



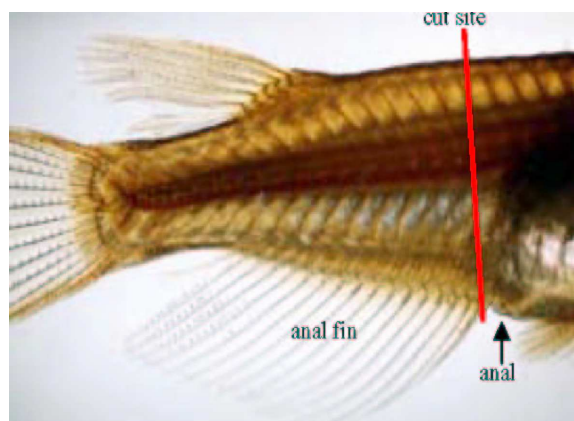
Εικόνα 2.

Α, διεργασίες πάνω σε συμφύσεις ακτίνες εδρικού πτερυγίου. J.P., σύμφυση Α.Σ., αξονικός χφόρος Ρ., διεργασία. Β, άπω άκρο της ακτίνας του πτερυγίου. Τα ακτινοτριχία (Act.) βρίσκονται στην άκρη. 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.



Εικόνα 3.

Φωτογραφία του σώματος του ψαριού που δείχνει το σημείο τομής όταν η γονάδα είναι μονιμοποιημένη σε διάλυμα μονιμοποίησης διαφορετικό του ουδέτερου ρυθμιστικού διαλύματος φορμαλδεΐδης (φορμόλη) 10%. Σε αυτή την περίπτωση, το εναπομένον σώμα θα κοπεί μεταξύ της πρόσθιας περιοχής του εδρικού πτερυγίου και του πρωκτού με λεπίδα (κόκκινη μπάρα), και η πλευρά της κεφαλής του σώματος του ψαριού τοποθετείται στο μονιμοποιητικό διάλυμα για τη γονάδα και το ουραίο τμήμα του σώματος του ψαριού θα τοποθετηθεί σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΐδης (φορμόλη) 10%.



Προσάρτημα 6

Συνιστώμενες διαδικασίες για τη συλλογή δειγμάτων για την ανάλυση λεκιθογενίνης

Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποτρέπεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων λεκιθογενίνης (VTG) των αρσενικών και των θηλυκών.

Διαδικασία 1A: Λιποκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Μετά την αναισθητοποίηση, ο ουραίος μίσχος αποκόπτεται μερικώς με λεπίδα νυστεριού και το αίμα συλλέγεται από την ουραία φλέβα/αρτηρία με τριχοειδή ηπαρινισμένο σωλήνα αιματοκρίτη. Αφού συλλεχθεί το αίμα, το πλάσμα απομονώνεται γρήγορα με φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 15 000 g (ή εναλλακτικά για 10 λεπτά σε 15 000 g στους 4° C). Εάν κριθεί επιθυμητό, ο αιματοκρίτης μπορεί να προσδιοριστεί μετά τη φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, από τον σωλήνα αιματοκρίτη αφαιρείται το πλάσμα και αποθηκεύεται σε σωλήνα φυγοκέντρου με 0,13 μονάδες απροτινίνης (έναν αναστολέα πρωτεάσης) στους - 80° C ώπου να μπορεί να καθοριστεί η λεκιθογενίνη. Ανάλογα με το μέγεθος του λιποκέφαλου φοξίνου (το οποίο εξαρτάται από το φύλο) οι όγκοι πλάσματος που μπορούν να συλλεχθούν κυμαίνονται γενικά ανάμεσα σε 5 και 60 μικρόλιτρα ανά ψάρι (Jensen *et al.* 2001).

Διαδικασία 1B: Λιποκέφαλος φοξίνος, αιμοληψία από την καρδιά

Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί επίσης να συλλεχθεί μέσω καρδιακής παρακέντησης με χρήση ηπαρινισμένης σύριγγας (1 000 μονάδες ηπαρίνης ανά ml). Το αίμα μεταφέρεται σε σωλήνες Eppendorf (που διατηρούνται σε πάγο) και στη συνέχεια φυγοκεντρείται (5 λεπτά, 7 000 g, θερμοκρασία δωματίου). Το πλάσμα θα πρέπει να μεταφερθεί σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf (σε κλάσματα εφόσον ο όγκος του πλάσματος το καθιστά εφικτό) και να καταψυχθεί άμεσα στους - 80 °C, μέχρι να αναλυθεί (Panter *et al.*, 1998).

Διαδικασία 2A: Ρυζόψαρο, εκτομή του ήπατος σε ρυζόψαρο

Αφαίρεση των υπό δοκιμή ψαριών από τον θάλαμο δοκιμής

- (1) Τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να αφαιρεθούν από τον θάλαμο δοκιμής με χρήση μικρής απόχης. Προσέξτε να μην πέσει το υπό δοκιμή ψάρι σε άλλους θαλάμους δοκιμής.
- (2) Κατ' αρχήν, τα υπό δοκιμή ψάρια θα πρέπει να αφαιρεθούν με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με τον διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερης συγκέντρωσης, μεσαίας συγκέντρωσης, υψηλότερης συγκέντρωσης και θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, όλα τα αρσενικά θα πρέπει να αφαιρεθούν από έναν θάλαμο δοκιμής προτού αφαιρεθούν τα εναπομείναντα θηλυκά.
- (3) Το φύλο κάθε υπό δοκιμή ψαριού προσδιορίζεται με βάση τα εξωτερικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου (π.χ. το σχήμα του το εδρικού περιγίου).
- (4) Τοποθετήστε το υπό δοκιμή ψάρι σε ένα δοχείο για μεταφορά και μεταφέρετε το στον σταθμό εργασίας για εκτομή του ήπατος. Ελέγξτε τις ετικέτες του θαλάμου δοκιμής και του δοχείου μεταφοράς για ακρίβεια και για να επιβεβαιώσετε ότι ο αριθμός των ψαριών που έχουν αφαιρεθεί από τον θάλαμο δοκιμής και ο αριθμός των ψαριών που απομένουν στον θάλαμο είναι ο αναμενόμενος.
- (5) Εάν το φύλο δεν μπορεί να διαπιστωθεί από την εξωτερική εμφάνιση του ψαριού, αφαιρέστε όλα τα ψάρια από τον θάλαμο δοκιμής. Σε αυτή την περίπτωση, το φύλο θα πρέπει να διαπιστωθεί με παρατήρηση της γονάδας ή των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου σε στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.

Εκτομή του ήπατος

- (1) Μεταφέρετε τα υπό δοκιμή ψάρια από το δοχείο μεταφοράς στο αναισθητικό διάλυμα με τη μικρή απόχη.
- (2) Αφού αναισθητοποιηθεί το υπό δοκιμή ψάρι, μεταφέρετε το σε χαρτί διήθησης (ή απορροφητικό χαρτί) χρησιμοποιώντας λαβίδες (κοινού τύπου). Καθώς πιάνετε το υπό δοκιμή ψάρι, τοποθετήστε τις λαβίδες στα πλαϊνά της κεφαλής για να αποφύγετε το σπάσιμο της ουράς.
- (3) Σκουπίστε το νερό από την επιφάνεια του υπό δοκιμή ψαριού πάνω στο χαρτί διήθησης (ή το απορροφητικό χαρτί).
- (4) Τοποθετήστε το ψάρι με την κοιλιά προς τα πάνω. Στη συνέχεια προβείτε σε μικρή εγκάρσια τομή στη μισή απόσταση μεταξύ της κοιλιακής μοίρας του αυχένα και της μέσης κοιλιακής χώρας χρησιμοποιώντας ψαλίδι ανατομής.

- (5) Εισάγετε το ψαλίδι ανατομής στην μικρή τομή και πραγματοποιήστε μια τομή κατά μήκος του μέσου της κοιλιακής χώρας από ένα ουραίο σημείο ως προς τον βρογχικό μανδύα μέχρι την κρανιακή μοίρα του πρωκτού. Προσέξτε να μην εισάγετε το ψαλίδι ανατομής πολύ βαθιά, έτσι ώστε να μην προκαλέσετε ζημιά στο ήπαρ και τη γονάδα.
- (6) Πραγματοποιήστε τις ακόλουθες ενέργειες στο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο.
- (7) Τοποθετήστε το υπό δοκιμή ψάρι πάνω στο απορροφητικό χαρτί (μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί γυάλινο τρυβλίο Petri ή γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα).
- (8) Απομακρύνονται τα τοιχώματα της κοιλιακής κοιλότητας με λαβίδες ακριβείας ώστε να προβάλλουν προς τα έξω τα εσωτερικά όργανα. Είναι επίσης αποδεκτό να προβάλετε προς τα έξω τα εσωτερικά όργανα αφαιρώντας τη μία πλευρά του τοιχώματος της κοιλιακής κοιλότητας εάν χρειάζεται.
- (9) Προβάλετε προς τα έξω το συνδεδεμένο κομμάτι του ήπατος και της χοληδόχου κύστης χρησιμοποιώντας άλλο ένα ζεύγος λαβίδων ακριβείας. Στη συνέχεια πιάστε τον χοληδόχο πόρο και αποκόψτε τη χοληδόχο κύστη. Προσέξτε να μην σπάσετε τη χοληδόχο κύστη.
- (10) Πιάστε τον οισοφάγο και αποκόψτε τον γαστρεντερικό σωλήνα από το συκώτι με τον ίδιο τρόπο. Προσέξτε να μην διαρρεύσει το περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα. Προβείτε σε εκτομή του ουραίου γαστρεντερικού σωλήνα από τον πρωκτό και αφαιρέστε τον σωλήνα από την κοιλιακή κοιλότητα.
- (11) Περικόψτε τη μάζα λίπους και άλλων ιστών από την περιφέρεια του ήπατος. Προσέξτε να μην γρατζουνίσετε το ήπαρ.
- (12) Πιάστε την περιοχή της ηπατικής πύλης με λαβίδες ακριβείας και αφαιρέστε το ήπαρ από την κοιλιακή κοιλότητα.
- (13) Τοποθετήστε το ήπαρ στη γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Χρησιμοποιώντας τις λαβίδες ακριβείας, αφαιρέστε τυχόν περίσσεια λίπους και ξένο ιστό (π.χ. κοιλιακή μεμβράνη), εάν χρειάζεται, από την επιφάνεια του ήπατος.
- (14) Μετρήστε το βάρος του ήπατος με ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό, χρησιμοποιώντας μικροσωλήνα 1,5 ml ως απόβαρο. Καταγράψτε την τιμή στο φύλλο εργασίας (διάβαζε: 0,1 mg). Επιβεβαιώστε τις πληροφορίες ταυτοποίησης στην ετικέτα του μικροσωλήνα.
- (15) Κλείστε το καπάκι του μικροσωλήνα που περιέχει το ήπαρ. Φυλάξτε το σε βάση ψύξης (ή βάση πάγου).
- (16) Μετά την εκτομή ενός ήπατος, καθαρίστε τα εργαλεία ανατομής ή αντικαταστήστε τα με καθαρά.
- (17) Αφαιρέστε το ήπαρ από όλα τα ψάρια που βρίσκονται στο δοχείο μεταφοράς όπως περιγράφεται παραπάνω.
- (18) Αφότου έχει πραγματοποιηθεί η εκτομή του ήπατος από όλα τα ψάρια του δοχείου μεταφοράς (δηλαδή όλων των αρσενικών και των θηλυκών ενός θαλάμου δοκιμής), τοποθετήστε όλα τα δείγματα ήπατος στη βάση σωλήνα με ετικέτα για ταυτοποίηση και φυλάξτε το σε κατάψυξη. Όταν τα ήπατα δωρίζονται για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή, τα δείγματα μεταφέρονται στον επόμενο σταθμό εργασίας σε βάση ψύξης (ή βάση πάγου).

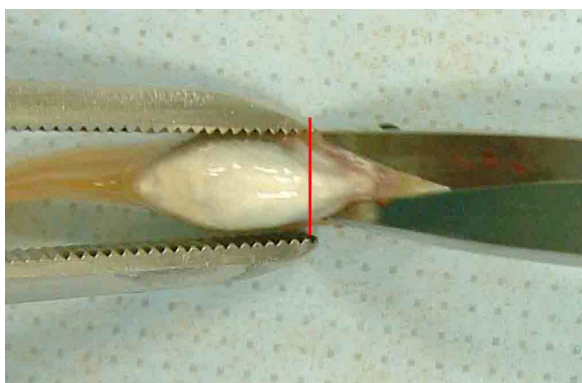
Μετά την εκτομή του ήπατος, το νεκρό σώμα του ψαριού είναι διαθέσιμο για μέτρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Δείγμα

Αποθηκεύστε τα δείγματα ήπατος που πήρατε από το υπό δοκιμή ψάρι στους ≤ -70 °C εάν δεν χρησιμοποιηθούν για προκατεργασία αμέσως μετά την εκτομή.

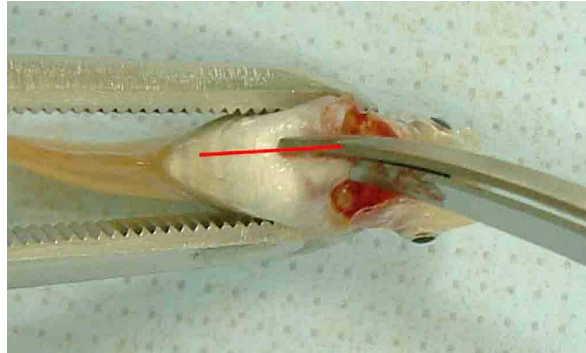
Εικόνα 1

Μία τομή πραγματοποιείται με ψαλίδι ακριβώς μπροστά από τα θωρακικά πτερύγια.



Εικόνα 2

Πραγματοποιείται τομή κατά μήκος της μεσαίας γραμμής της κοιλιακής χώρας με ψαλίδι μέχρι περίπου 2 mm από το πρόσθιο σημείο του πρωκτού.



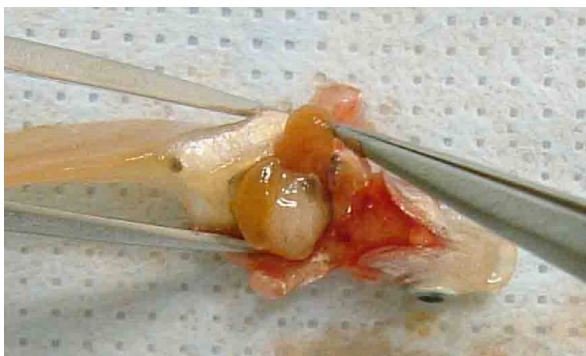
Εικόνα 3

Τα κοιλιακά τοιχώματα ανοίγονται με λαβίδες ώστε να προβληθεί το ήπαρ και τα άλλα εσωτερικά όργανα. (Εναλλακτικά, μπορείτε να καρφισώσετε τα κοιλιακά τοιχώματα στα πλάγια).



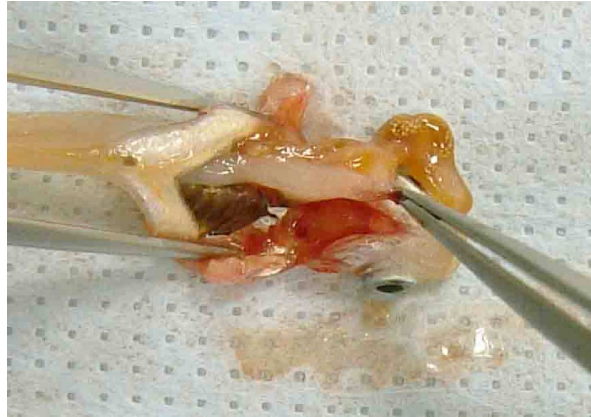
Εικόνα 4

Ακολουθεί εκτομή και αφαίρεση του ήπατος με λαβίδες.



Εικόνα 5

Τα έντερα τραβιούνται προς τα έξω με μαλακές κινήσεις με τη βοήθεια λαβίδων.



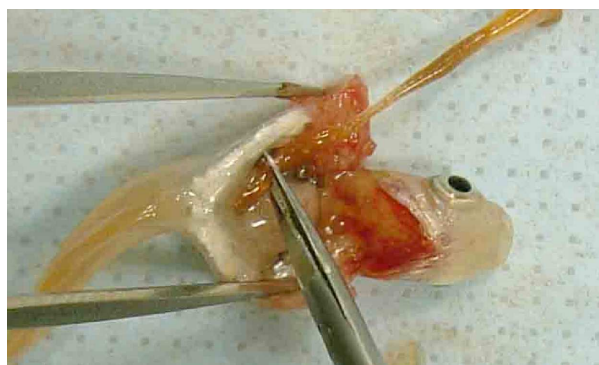
Εικόνα 6

Αμφότερα τα άκρα των εντέρων και τυχόν μεσεντερικών προσφύσεων αποκόπτονται με ψαλίδι.



Εικόνα 7 (θηλυκό)

Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη για τα θηλυκά.



Εικόνα 8

Η ολοκληρωμένη διαδικασία.**Διαδικασία 2B: Ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*), Προκατεργασία ήπατος για ανάλυση λεκιθογενίνης**

Η φιάλη με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από το κιτ ELISA αφήνεται να ψυχθεί με θρυμματισμένο πάγο (θερμοκρασία του διαλύματος: ≤ 4 °C). Αν χρησιμοποιείτε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από το σύστημα EpBio ELISA, αποψύξτε το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια παγώστε τη φιάλη με θρυμματισμένο πάγο.

Υπολογίστε τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ βάσει του βάρους του (προσθέστε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης ανά mg βάρους του ήπατος για το ομογενοποιημένο δείγμα). Για παράδειγμα, εάν το βάρος του ήπατος είναι 4,5 mg, ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για το ήπαρ είναι 225 μl. Ετοιμάστε μία λίστα με τον όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης για όλα τα ήπατα.

Προετοιμασία του ήπατος για την προκατεργασία

- (1) Πάρτε τον μικροσωλήνα 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ από την κατάψυξη ακριβώς πριν από την προκατεργασία.
- (2) Η προκατεργασία του ήπατος των αρσενικών πρέπει να εκτελείται πριν από εκείνη των θηλυκών για την αποφυγή επιμόλυνσης με λεκιθογενίνη. Επιπροσθέτως, η προκατεργασία για τις υπό δοκιμή ομάδες θα πρέπει να διεξάγεται με την ακόλουθη σειρά: μάρτυρας, μάρτυρας με τον διαλύτη (κατά περίπτωση), χαμηλότερης συγκέντρωσης, μεσαίας συγκέντρωσης, υψηλότερης συγκέντρωσης και θετικός μάρτυρας.
- (3) Ο αριθμός των μικροσωλήνων 1,5 ml που περιέχουν δείγματα ήπατος που παίρνετε από την κατάψυξη σε μια δεδομένη στιγμή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τον αριθμό εκείνων που μπορούν να φυγοκεντρηθούν τη συγκεκριμένη στιγμή.
- (4) Τακτοποιήστε του μικροσωλήνες 1,5 ml που περιέχουν τα δείγματα ήπατος σύμφωνα με τη σειρά του αριθμού δείγματος πάνω στη βάση πάγου (δεν χρειάζεται να αποψύξετε το ήπαρ).

Διαδικασία προκατεργασίας

1. Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης

- (1) Ελέγξτε τον κατάλογο για τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης που πρέπει να χρησιμοποιήσετε για το εκάστοτε δείγμα ήπατος και προσαρμόστε το μικροσιφώνιο (εύρος όγκου: 100-1 000 μl) στον κατάλληλο όγκο. Επισυνάψτε μία καθαρή μύτη στο μικροσιφώνιο.
- (2) Πάρτε το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης από τη φιάλη και προσθέστε το ρυθμιστικό διάλυμα στον μικροσωλήνα 1,5 ml που περιέχει το ήπαρ.
- (3) Προσθέστε το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σε όλους τους μικροσωλήνες 1.5 ml που περιέχουν ήπαρ, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Δεν υπάρχει λόγος αλλαγής της μύτης του μικροσιφώνιου με καινούργια. Ωστόσο, εάν η μύτη έχει επιμολυνθεί ή υπάρχει υπόνοια ότι έχει επιμολυνθεί, η μύτη θα πρέπει να αλλάξει.

2. Ομογενοποίηση του ήπατος

- (1) Συνδέστε έναν νέο ύπερο για ομογενοποίηση στον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα.
- (2) Εισάγετε τον ύπερο στον μικροσωλήνα 1,5 ml. Κρατήστε τον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα για να πιέσετε το ήπαρ ανάμεσα στην επιφάνεια του ύπερου και το εσωτερικό τοίχωμα του μικροσωλήνα 1,5 ml.
- (3) Θέστε τον ομογενοποιητή του μικροσωλήνα σε λειτουργία για 10 με 20 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, παγώστε τον μικροσωλήνα 1,5 ml με θρυμματισμένο πάγο.
- (4) Σηκώστε τον ύπερο από τον μικροσωλήνα 1,5 ml και αφήστε το σε αδράνεια για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια διενεργήστε οπτικό έλεγχο της κατάστασης του διαλύματος.
- (5) Εάν παρατηρήσετε κομμάτια ήπατος στο διάλυμα, επαναλάβετε τις διαδικασίες (3) και (4) για να προετοιμάσετε ένα ικανοποιητικό ομογενοποιημένο δείγμα ήπατος.
- (6) Παγώστε το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος σε βάση πάγου μέχρι την φυγοκέντρωση.
- (7) Αλλάζετε τον ύπερο με έναν νέο για κάθε ομογενοποιημένο δείγμα.
- (8) Ομογενοποιήστε όλα τα ήπατα με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.

3. Φυγοκέντρωση του ομογενοποιημένου αιωρήματος ήπατος

- (1) Επιβεβαιώστε τη θερμοκρασία του ψυχόμενου θαλάμου φυγοκέντρωσης στους ≤ 5 °C.
- (2) Τοποθετήστε τους μικροσωλήνες 1,5 ml που περιέχουν το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (προσαρμόστε τον ζυγό αν χρειάζεται).
- (3) Υποβάλετε σε φυγοκέντρωση το ομογενοποιημένο εναιώρημα ήπατος σε 13 000 g για 10 λεπτά στους ≤ 5 °C. Ωστόσο, εάν τα υπερκείμενα υγρά έχουν διαχωριστεί καταλλήλως, η φυγόκεντρος δύναμη και ο χρόνος μπορούν να προσαρμοστούν αναλόγως.
- (4) Μετά τη φυγοκέντρωση, ελέγξτε αν τα υπερκείμενα υγρά έχουν διαχωριστεί καταλλήλως (επιφάνεια: λιπίδια, ενδιάμεσο: υπερκείμενο υγρό, κάτω στρώση: ηπατικός ιστός). Αν ο διαχωρισμός δεν είναι ο κατάλληλος, υποβάλετε εκ νέου το αιώρημα σε φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες.
- (5) Αφαιρέστε όλα τα δείγματα από την ψυχόμενη φυγόκεντρο και τοποθετήστε τα με σειρά στη βάση πάγου σύμφωνα με τον αριθμό δείγματος. Προσέξτε να μην αναδιαλυθεί κάθε διαχωρισμένη στρώση μετά τη φυγοκέντρωση.

4. Συλλογή του υπερκείμενου υγρού

- (1) Τοποθετήστε τέσσερις μικροσωλήνες 0,5 ml για την αποθήκευση του υπερκείμενου υγρού στη βάση σωλήνων.
- (2) Συλλέξτε 30 μl από κάθε υπερκείμενο υγρό (διαχωρισμένο σαν ενδιάμεση στρώση) με το μικροσιφόνιο και μεταφέρετέ το σε έναν μικροσωλήνα 0,5 ml. Προσέξτε να μην συλλέξετε λιπίδια από την επιφάνεια ή ηπατικό ιστό από την κάτω στρώση.
- (3) Συλλέξτε το υπερκείμενο υγρό και μεταφέρετέ το σε άλλους δύο μικροσωλήνες 0,5 ml με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω.
- (4) Συλλέξτε το υπόλοιπο υπερκείμενο υγρό με το μικροσιφόνιο (αν είναι εφικτό: ≥ 100 μl). Στη συνέχεια μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό στον εναπομείναντα μικροσωλήνα 0,5 ml. Προσέξτε να μην συλλέξετε λιπίδια από την επιφάνεια ή ηπατικό ιστό από την κάτω στρώση.
- (5) Κλείστε το πώμα του μικροσωλήνα 0,5 ml και γράψτε τον όγκο του υπερκείμενου υγρού στην ετικέτα. Κατόπιν, παγώστε άμεσα τους μικροσωλήνες τοποθετώντας τους στη βάση πάγου.
- (6) Αλλάζετε τη μύτη του μικροσιφονίου με μία νέα για κάθε υπερκείμενο υγρό. Αν μια μεγάλη ποσότητα λιπιδίων κολλήσει στη μύτη, αλλάξτε την άμεσα για να αποτραπεί η επιμόλυνση του εκχυλίσματος ήπατος με λίπος.

- (7) Μεταφέρετε όλο το φυγοκεντρημένο υπερκείμενο υγρό σε τέσσερις μικροσωλήνες 0,5 ml σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.
- (8) Μετά τη μεταφορά του υπερκείμενου υγρού στους μικροσωλήνες 0,5 ml, τοποθετήστε τους όλους στη βάση σωλήνων με ετικέτα ταυτοποίησης, και μετά παγώστε τους άμεσα τοποθετώντας τους στην κατάψυξη. Αν οι συγκεντρώσεις VTG μετρηθούν αμέσως μετά την προκατεργασία, διατηρήστε έναν μικροσωλήνα 0,5 ml (που περιέχει 30 μl υπερκείμενου υγρού) σε ψύξη στη βάση σωλήνων και μεταφέρετέ τον στον σταθμό εργασίας όπου διεξάγεται η δοκιμή ELISA. Σε μια τέτοια περίπτωση, τοποθετήστε τους εναπομείναντες σωλήνες στη βάση σωλήνων και παγώστε τους στην κατάψυξη.
- (9) Μετά τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού, απορρίψτε το υπόλειμμα με ενδεδειγμένο τρόπο.

Αποθήκευση του δείγματος

Αποθηκεύστε τους μικροσωλήνες 0,5 ml που περιέχουν το υπερκείμενο υγρό του ομογενοποιημένου ήπατος στους $\leq -70^{\circ}\text{C}$ έως ότου χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή ELISA.

Διαδικασία 3Α: Ρυζόψαρο, αιμοληψία από την ουραία φλέβα/αρτηρία

Αμέσως μετά την αναισθησία, ο ουραίος μίσχος αποκόπτεται εγκαρσίως, και αφαιρείται το αίμα από την ουραία αρτηρία/φλέβα με τριχοειδή ηπαρινισμένο σωλήνα αιματοκρίτη. Ο όγκος του αίματος κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 μl ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού. Ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος απροτινίνης (6 μg/ml σε PBS) προστίθεται στον ημιτριχοειδή σωλήνα, και το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης (5 λεπτά στα 600 g). Το πλάσμα συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και διατηρείται στους -20°C έως ότου διεξαχθεί ανάλυση για λεκτινογενίνη ή άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος.

Διαδικασία 3B: Ζεβρόψαρο, αιμοληψία μέσω καρδιακής παρακέντησης

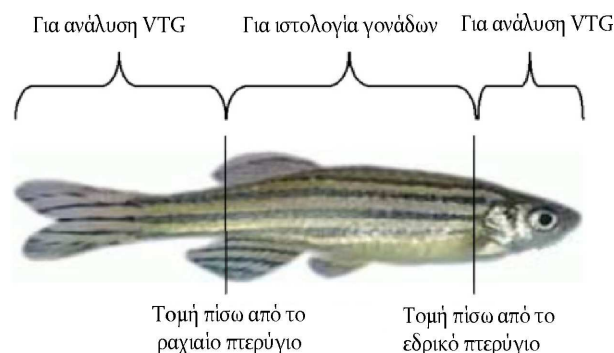
Για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος και η αποδόμηση των πρωτεϊνών, τα δείγματα συλλέγονται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με χλωριούχο νάτριο (phosphate-buffered saline, PBS) που περιέχει ηπαρίνη (1 000 μονάδες/ml) και τον αναστολέα πρωτεάσης απροτινίνη (2 TIU/ml). Ως συστατικά για το ρυθμιστικό διάλυμα συνιστώνται αμμωνιακό άλας της ηπαρίνης και λυοφιλιωμένη απροτινίνη. Για τη δειγματοληψία αίματος συνιστάται μια σύριγγα (1 ml) με προσαρμοσμένη λεπτή βελόνα (π.χ. Braun Ομπνίκαν-F). Η σύριγγα θα πρέπει να είναι προγεμισμένη με ρυθμιστικό διάλυμα (περίπου 100 μl) για να εκλουθούν πλήρως οι μικροί όγκοι αίματος από κάθε ψάρι. Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται με παρακέντηση της καρδιάς. Αρχικά, τα ψάρια θα πρέπει να αναισθητοποιηθούν με MS-222 (100 mg/l). Το κατάλληλο επίπεδο αναισθησίας επιτρέπει στον χρήστη να διακρίνει τον καρδιακό παλμό του ζεβρόψαρου. Κατά την παρακέντηση της καρδιάς ασκήστε ελαφρά πίεση στο έμβολο της σύριγγας. Οι συλλέξιμοι όγκοι αίματος κυμαίνονται ανάμεσα σε 20 - 40 μικρόλιτρα. Μετά από την καρδιακή παρακέντηση, το μείγμα αίματος/ρυθμιστικού διαλύματος εισάγεται στον δοκιμαστικό σωλήνα. Το πλάσμα διαχωρίζεται από το αίμα μέσω φυγοκέντρησης (20 λεπτά: 5 000 g) και θα πρέπει να φυλάσσεται στους -80°C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.

Διαδικασία 3Γ: Τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (ΤΔΛ): Ζεβρόψαρο, ομογενοποίηση κεφαλής & ουράς

- (1) Τα ψάρια υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής.
- (2) Το κεφάλι και η ουρά κόβονται από το ψάρι σύμφωνα με την εικόνα 1.

Σημαντική παρατήρηση: Όλα τα εργαλεία ανατομής και η πλάκα κοπής θα πρέπει να εκπλένονται και να καθαρίζονται κατάλληλα (π.χ. με 96 % αιθανόλη) ανάμεσα στους χειρισμούς του κάθε ψαριού για την αποφυγή “επιμόλυνσης λεκτινογενίνης” από τα θηλυκά άτομα ή τα αρσενικά άτομα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG προς τα αρσενικά άτομα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG.

Εικόνα 1



- (3) Το βάρος του συνενωμένου κεφαλιού και της ουράς από το κάθε ψάρι μετράται με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου.
- (4) Αφού ζυγιστούν, τα τμήματα του ψαριού τοποθετούνται σε κατάλληλους σωλήνες (π.χ. σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml) και καταψύχονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να ομογενοποιηθούν ή ομογενοποιούνται απευθείας σε πάγο με δύο πλαστικούς υπέρους. (Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι, εάν εκτελούνται σε πάγο και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ομοιογενούς μάζας). Σημαντική παρατήρηση: Οι σωλήνες θα πρέπει να αριθμούνται κατάλληλα, ώστε το κεφάλι και η ουρά από το ψάρι να μπορούν να σχετιστούν με το αντίστοιχο τμήμα του σώματος που χρησιμοποιείται για την ιστολογική εξέταση των γονάδων.
- (5) Όταν επιτευχθεί μια ομοιογενής μάζα, προστίθεται παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (*) σε ποσότητα ίση με 4 φορές το βάρος του ιστού. Συνεχίστε τη διαδικασία με τους υπέρους μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. Σημαντική σημείωση: Για κάθε ψάρι χρησιμοποιούνται καινούριοι υπέροι.
- (6) Τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι τη φυγοκέντρησή τους σε $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $50\ 000 \times g$ για 30 λεπτά.
- (7) Με τη χρήση ενός σιφωνίου μεταφέρονται 20 μl υπερκείμενου υγρού σε τουλάχιστον δύο σωλήνες, με βύθιση της μύτης του σιφωνίου κάτω από το στρώμα λίπους στην επιφάνεια και με προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού χωρίς κλάσματα λίπους ή ιζήματος.
- (8) Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση.

(*) **Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4· μείγμα αναστολέων πρωτεάσης 1 % (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl μείγματος αναστολέων πρωτεάσης.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) π.χ. από Bie & Berntsen, Δανία.
- Μείγμα αναστολέων πρωτεάσης: Από τη Sigma (για ιστό θηλαστικών) Κωδικός προϊόντος P 8340.
- Σημείωση: Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του. Κατά τη διάρκεια της χρήσης να τοποθετείται πάνω σε πάγο.

Προσάρτημα 7

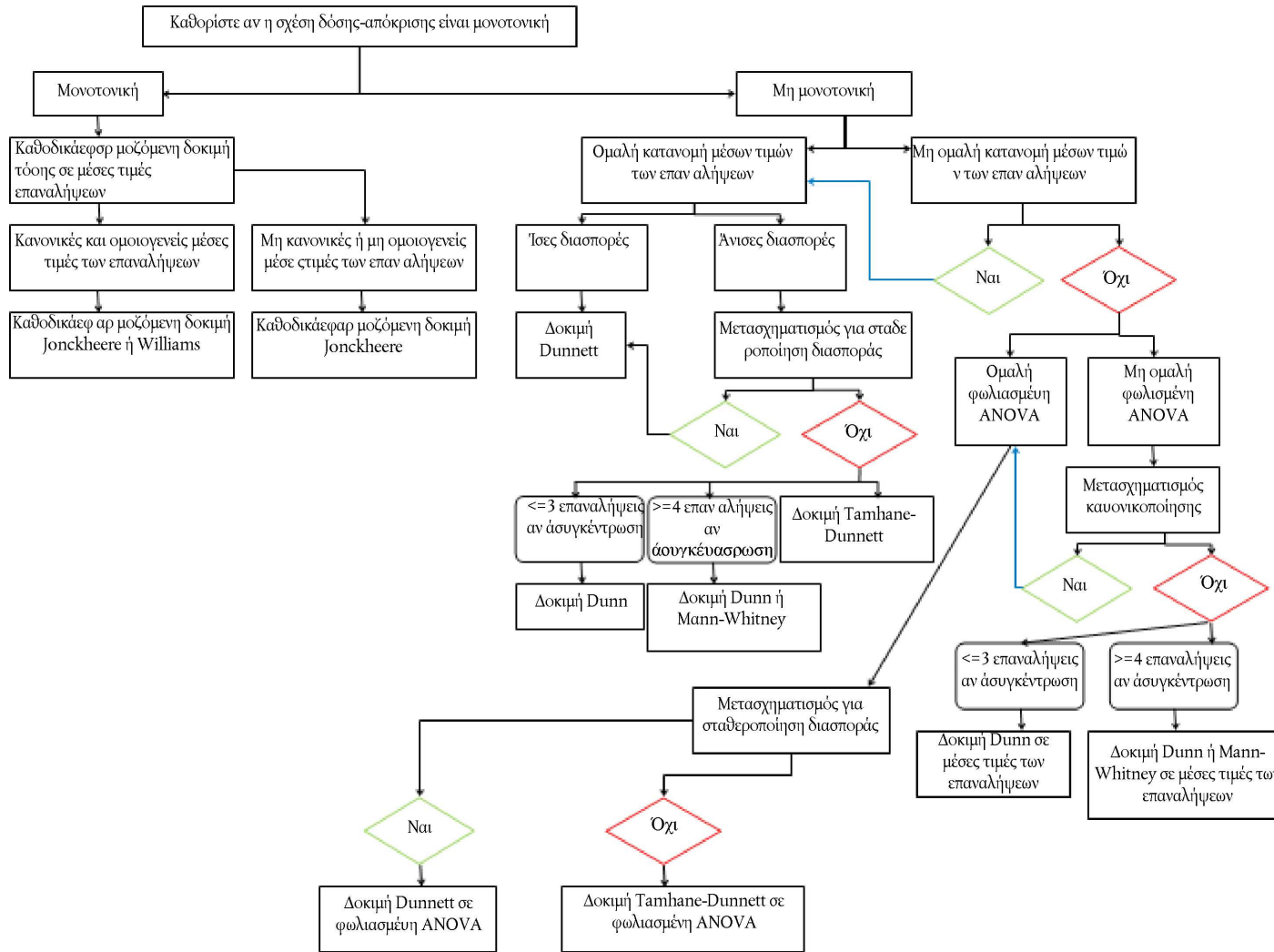
Δείγματα εμπλουτισμού λεκιδιογενίνης και πρότυπο αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών (inter-assay reference standard)

Για κάθε ημέρα που εκτελούνται δοκιμές λεκιδιογενίνης, αναλύεται ένα δείγμα εμπλουτισμού που καταρτίζεται με χρήση ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών. Η λεκιδιογενίνη που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός προτύπου αναφοράς μεταξύ διαφορετικών δοκιμών θα προέρχεται από διαφορετική παρτίδα από εκείνη που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των προτύπων βαθμονόμησης για τη δοκιμή που εκτελείται.

Το δείγμα εμπλουτισμού θα δημιουργηθεί με την προσθήκη γνωστής ποσότητας του προτύπου που χρησιμοποιείται στις δοκιμές σε δείγμα πλάσματος αρσενικού μάρτυρα. Το δείγμα θα εμπλουτιστεί ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση λεκιδιογενίνης μεταξύ 10 και 100 φορές παραπάνω από την αναμενόμενη συγκέντρωση λεκιδιογενίνης του αρσενικού μάρτυρα. Το δείγμα πλάσματος του αρσενικού μάρτυρα που εμπλουτίζεται μπορεί να προέρχεται από ένα μεμονωμένο ψάρι ή μπορεί να είναι σύνθετο, προερχόμενο από περισσότερα ψάρια.

Ένα μερικό δείγμα του μη εμπλουτισμένου πλάσματος αρσενικού μάρτυρα θα αναλυθεί σε δύο τουλάχιστον διπλές πλάκες βοθρίων. Το εμπλουτισμένο δείγμα θα αναλυθεί και αυτό σε δύο τουλάχιστον διπλές πλάκες βοθρίων. Η μέση ποσότητα λεκιδιογενίνης στα δύο μη εμπλουτισμένα δείγματα πλάσματος αρσενικών μαρτύρων θα προστεθεί στην υπολογιζόμενη ποσότητα λεκιδιογενίνης που προστίθεται στα εμπλουτισμένα δείγματα για τον καθορισμό της αναμενόμενης συγκέντρωσης. Ο λόγος της εν λόγω αναμενόμενης συγκέντρωσης προς τη μετρούμενη συγκέντρωση θα πρέπει να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα από κάθε σύνολο δοκιμών που διενεργούνται τη συγκεκριμένη ημέρα.

Διάγραμμα λήψης αποφάσεων για τη στατιστική ανάλυση



Γ.38. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΑΜΦΙΒΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 231 του ΟΟΣΑ (2009). Η ανάγκη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας δοκιμασίας για την ανίχνευση χημικών ουσιών που είναι δραστικές στο θυρεοειδικό σύστημα των σπονδυλωτών προέκυψε από ανησυχίες ότι τα περιβαλλοντικά επίπεδα χημικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στη χλωροπανίδα. Το 1998, ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα υψηλής προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών και την εκπόνηση νέων σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση μιας κατευθυντήριας γραμμής για τη διαλογή χημικών ουσιών που είναι δραστικές στο θυρεοειδικό σύστημα των σπονδυλωτών. Προτάθηκε μια βελτίωση της μελέτης τοξικότητας από του στόματος επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών σε τρωκτικά (Κεφάλαιο Β.7 του παρόντος προσαρτήματος) και η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA). Η βελτιωμένη μέθοδος δοκιμών Β.7 υποβλήθηκε σε επικύρωση και έχει εκδοθεί μια αναθεωρημένη μέθοδος δοκιμών. Η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA) υποβλήθηκε σε ένα εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης που περιλάμβανε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες, οι οποίες αποδεικνύουν τη συνάφεια και την αξιοπιστία της δοκιμασίας (1, 2). Στη συνέχεια, η επικύρωση της δοκιμασίας αξιολογήθηκε από μια ομάδα ανεξάρτητων εμπειρογνομόνων (3). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι το αποτέλεσμα της εμπειρίας που αποκτήθηκε από τις μελέτες επικύρωσης για την ανίχνευση χημικών ουσιών που επιδρούν στον θυρεοειδή, καθώς και από εργασίες που διεξήχθησαν σε άλλα κέντρα χωρών-μελών του ΟΟΣΑ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

2. Η δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων (AMA) είναι μια δοκιμασία διαλογής που έχει στόχο να προσδιορίσει εμπειρικά χημικές ουσίες οι οποίες ενδέχεται να παρέμβουν στη φυσιολογική λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς (ΥΥΘ). Η δοκιμασία AMA αντιπροσωπεύει ένα γενικευμένο μοντέλο σπονδυλωτών στον βαθμό που βασίζεται σε διατηρημένες δομές και λειτουργίες του άξονα ΥΥΘ. Πρόκειται για μια σημαντική δοκιμασία, επειδή η μεταμόρφωση των αμφιβίων προσφέρει μια καλά μελετημένη, εξαρτώμενη από τον θυρεοειδή διαδικασία που ανταποκρίνεται σε χημικές ουσίες οι οποίες είναι δραστικές εντός του άξονα ΥΥΘ. Επίσης, είναι η μοναδική υφιστάμενη δοκιμασία που ανιχνεύει τη λειτουργία του θυρεοειδούς σε ένα ζώο το οποίο βρίσκεται σε φάση μορφολογικής ανάπτυξης.
3. Ο γενικός πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει την έκθεση γυρίνων σταδίου 51 του είδους *Xenopus laevis* σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας υπο δοκιμή χημικής ουσίας και ενός νερού αραιώσης-μάρτυρα για 21 ημέρες. Χρησιμοποιούνται τέσσερις επαναλήψεις για κάθε αγωγή της δοκιμής. Η πυκνότητα των προνυμφών κατά την έναρξη της δοκιμής είναι 20 γυρίνοι ανά δεξαμενή δοκιμής για όλες τις ομάδες αγωγής. Τα τελικά σημεία βάσει παρατήρησης είναι το μήκος των οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλωάκης (SVL), το στάδιο ανάπτυξης, το υγρό βάρος, η ιστολογική εξέταση του θυρεοειδούς και οι καθημερινές παρατηρήσεις θνησιμότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδος δοκιμής

4. Το είδος *Xenopus laevis* καλλιεργείται συστηματικά σε εργαστήρια παγκοσμίως και η απόκτησή του είναι εύκολη μέσω εμπορικών προμηθευτών. Σε αυτό το είδος, μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί πρόκληση της αναπαραγωγής καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με ενέσεις ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και οι προκύπτουσες προνύμφες μπορούν να εκτρέφονται συστηματικά, σε μεγάλους αριθμούς, μέχρι τα επιλεγμένα στάδια ανάπτυξης, ώστε να είναι εφικτή η χρήση πρωτοκόλλων δοκιμής ειδικά σχεδιασμένων για συγκεκριμένα στάδια. Οι προνύμφες που χρησιμοποιούνται σε αυτήν τη δοκιμασία προτιμάται να προέρχονται από ενήλικα άτομα εσωτερικής καλλιέργειας. Εναλλακτικά, μπορούν να αποστέλλονται αυγά ή έμβρυα στο εργαστήριο όπου πραγματοποιείται η δοκιμή και, στη συνέχεια, να εγκλιματίζονται, ωστόσο αυτή δεν είναι η προτιμώμενη διαδικασία. Η αποστολή στο στάδιο της προνύμφης για χρήση στη δοκιμή δεν είναι αποδεκτή.

Εξοπλισμός και προμήθειες

5. Ο εξοπλισμός και οι προμήθειες που απαιτούνται για τη διεξαγωγή αυτής της δοκιμασίας είναι τα ακόλουθα:
 - α) Σύστημα έκθεσης (βλ. περιγραφή κατωτέρω),
 - β) Ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα (βλ. περιγραφή κατωτέρω),
 - γ) Δεξαμενές αναπαραγωγής,
 - δ) Συσκευή ελέγχου θερμοκρασίας [π.χ. θερμοαντήρες ή ψύκτες (με δυνατότητα ρύθμισης στους $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$)],

- ε) Θερμόμετρο,
- στ) Διοφθάλμιο στερεοσκοπικό μικροσκόπιο,
- ζ) Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με ανάλυση τουλάχιστον 4 megapixel και λειτουργία micro,
- η) Λογισμικό ψηφιοποίησης εικόνων,
- θ) Τρυβλίο Petri (π.χ. 100 × 15 mm) ή διαφανής πλαστικός θάλαμος συγκρίσιμου μεγέθους,
- ι) Αναλυτικός ζυγός, ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (mg),
- ια) Μετρητής διαλυμένου οξυγόνου,
- ιβ) Πεχάμετρο,
- ιγ) Μετρητής έντασης φωτός, ικανός να πραγματοποιεί μετρήσεις σε μονάδες lux,
- ιδ) Διάφορα γυάλινα είδη και εργαλεία εργαστηρίου,
- ιε) Ρυθμιζόμενα σιφώνια (10 έως 5 000 μl) ή ποικιλία σιφωνίων ισοδύναμων μεγεθών,
- ιστ) Υπό δοκιμή χημική ουσία σε επαρκείς ποσότητες για τη διεξαγωγή της μελέτης, κατά προτίμηση της ίδιας παρτίδας,
- ιζ) Αναλυτικά όργανα κατάλληλα για τη χημική ουσία που ελέγχεται ή σύμβαση παροχής υπηρεσιών ανάλυσης.

Δυνατότητα δοκιμής χημικών ουσιών

6. Η δοκιμασία AMA βασίζεται σε ένα πρωτόκολλο υδατικής έκθεσης όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία εισάγεται στους θαλάμους δοκιμής μέσω ενός συστήματος συνεχούς ροής νερού. Οι μέθοδοι συνεχούς ροής νερού, ωστόσο, θέτουν περιορισμούς όσον αφορά τον τύπο των χημικών ουσιών που μπορούν να ελεγχθούν, οι οποίοι καθορίζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Επομένως, πριν από τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου, πρέπει να λαμβάνονται βασικές πληροφορίες για τη χημική ουσία που είναι σχετικές με τον καθορισμό της δυνατότητας δοκιμής. Επίσης, θα πρέπει να συμβουλευέστε το έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μιγμάτων) (4). Χαρακτηριστικά τα οποία υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως να είναι δύσκολη η δοκιμή της χημικής ουσίας σε υδατικά συστήματα είναι, μεταξύ άλλων, τα εξής: υψηλοί συντελεστές κατανομής οκτανόλης/νερού ($\log K_{ow}$), υψηλή πτητικότητα, ευαισθησία στην υδρόλυση και ευαισθησία στη φωτόλυση κάτω από εργαστηριακές συνθήκες φωτισμού περιβάλλοντος. Ενδεχομένως να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον καθορισμό της δυνατότητας δοκιμής, οι οποίοι θα πρέπει να προσδιορίζονται κατά περίπτωση. Εάν δεν είναι δυνατή η επιτυχής δοκιμή για μια χημική ουσία με τη χρήση συστήματος δοκιμής συνεχούς ροής νερού, μπορεί να χρησιμοποιείται σύστημα στατικής ανανέωσης. Εάν κανένα από τα δύο συστήματα δεν έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για την υπό δοκιμή χημική ουσία, η ουσία αυτή, εξ ορισμού, δεν πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή με χρήση αυτού του πρωτοκόλλου.

Σύστημα έκθεσης

7. Προτιμάται σύστημα αραιωτή συνεχούς ροής νερού, όπου αυτό είναι δυνατόν, αντί ενός συστήματος στατικής ανανέωσης. Εάν οι φυσικές ή/και χημικές ιδιότητες οποιωνδήποτε υπό δοκιμή χημικών ουσιών δεν ενδείκνυνται για το σύστημα αραιωτή συνεχούς ροής νερού, μπορεί να χρησιμοποιείται εναλλακτικό σύστημα έκθεσης (π.χ., στατικής ανανέωσης). Τα εξαρτήματα του συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν εξαρτήματα που έρχονται σε επαφή με νερό κατασκευασμένα από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή/και πολυτετραφθοροαιθυλένιο. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιούνται κατάλληλα πλαστικά εάν δεν θέτουν σε κίνδυνο τη διεξαγωγή της μελέτης. Οι δεξαμενές έκθεσης θα πρέπει να είναι ενυδρεία από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, εξοπλισμένα με κατακόρυφους αγωγούς που παρέχουν, κατά προσέγγιση, όγκο δεξαμενής από 4,0 έως 10,0 l και ελάχιστο βάθος νερού από 10 έως 15 cm. Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε θέση να υποστηρίξει όλες τις συγκεντρώσεις έκθεσης και έναν μάρτυρα, με τέσσερις επαναλήψεις ανά αγωγή. Η ταχύτητα ροής σε κάθε δεξαμενή θα πρέπει να είναι σταθερή ώστε να διατηρούνται οι βιολογικές συνθήκες και η χημική έκθεση (π.χ. 25 ml/λεπτό). Οι δεξαμενές αγωγής θα πρέπει να ορίζονται τυχαία σε μια θέση στο σύστημα έκθεσης, με σκοπό τη μείωση των πιθανών επιδράσεων που οφείλονται στη θέση, συμπεριλαμβανομένων των ελαφρών διακυμάνσεων στη θερμοκρασία, στην ένταση του φωτός κ.λπ. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται λαμπτήρες φθορισμού για την παροχή μιας φωτοπερίοδου 12 ωρών φωτός: 12 ώρες σκοταδιού, με ένταση που κυμαίνεται από 600 έως 2 000 lux (lumen/m^2) στην επιφάνεια του νερού. Η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να διατηρείται στους $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, το pH να διατηρείται σε τιμή από 6,5 έως 8,5 και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) $> 3,5 \text{ mg/l}$ ($> 40\%$ της τιμής κορεσμού με αέρα) σε κάθε δεξαμενή δοκιμής. Η θερμοκρασία του νερού, το pH και το διαλυμένο οξυγόνο θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να μετράται συνεχώς σε τουλάχιστον ένα δοχείο δοκιμής. Στο προσάρτημα 1 περιγράφονται οι πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες θα πρέπει να εκτελείται το πρωτόκολλο. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση συστημάτων έκθεσης συνεχούς ροής νερού ή/και συστημάτων στατικής ανανέωσης, ανατρέξτε στο έγγραφο ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (Πρότυπος οδηγός ASTM για τη διεξαγωγή δοκιμών οξείας τοξικότητας σε υλικά δοκιμών με ψάρια, μακροασπόνδυλα και αμφίβια) (5) και σε γενικές δοκιμές υδατικής τοξικότητας.

Ποιότητα του νερού

8. Μπορεί να χρησιμοποιείται κάθε νερό που διατίθεται τοπικά (π.χ. νερό πηγής ή νερό βρύσης φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα) και επιτρέπει τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των γυρινών του είδους *X. laevis*. Επειδή η ποιότητα του τοπικού νερού μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων περιοχών, θα πρέπει να διεξάγεται ανάλυση της ποιότητας του νερού, ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιστορικά δεδομένα σχετικά με τη χρησιμότητα του νερού για την εκτροφή του *Xenopus*. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε το νερό να είναι απαλλαγμένο από χαλκό, χλώριο και χλωραμίνες, τα οποία είναι όλα τοξικά για τους βατράχους και τους γυρινούς. Συνιστάται επίσης η ανάλυση του νερού ως προς τα βασικά επίπεδα φθορίου, υπερχλωρικών ενώσεων και χλωρικών ενώσεων (υποπροϊόντα της απολύμανσης του πόσιμου νερού), καθώς όλα αυτά τα ανιόντα αποτελούν υποστρώματα του μεταφορέα ιωδίου του θυρεοειδούς αδένου και αυξημένα επίπεδα καθενός από αυτά τα ανιόντα ενδέχεται να ανατρέψουν την έκβαση της μελέτης. Η ανάλυση θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την έναρξη της δοκιμής και το νερό δοκιμής θα πρέπει κανονικά να είναι απαλλαγμένο από αυτά τα ανιόντα.

Συγκέντρωση ιωδιδίου στο νερό δοκιμής

9. Για να μπορεί ο θυρεοειδής αδένος να συνθέτει ΤΗ, πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη επαρκής ποσότητα ιωδιδίου για τις προνύμφες μέσω υδατικών και διατροφικών πόρων, σε συνδυασμό. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές που έχουν προκύψει εμπειρικά σχετικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ιωδιδίου. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ιωδιδίου ενδέχεται να επηρεάσει την ανταπόκριση του θυρεοειδικού συστήματος σε παράγοντες που επιδρούν στον θυρεοειδή και είναι γνωστό ότι διαμορφώνει τη βασική λειτουργία του θυρεοειδούς αδένου, μια πτυχή στην οποία πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς. Επομένως, θα πρέπει να αναφέρονται οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις του υδατικού ιωδιδίου από το νερό δοκιμής. Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα από τις μελέτες επικύρωσης, έχει αποδειχθεί ότι το πρωτόκολλο αποδίδει ικανοποιητικά όταν οι συγκεντρώσεις ιωδιδίου (I⁻) στο νερό δοκιμής κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 10 μg/l. Ιδανικά, η ελάχιστη συγκέντρωση ιωδιδίου στο νερό δοκιμής θα πρέπει να είναι 0,5 μg/l. Σε περίπτωση ανασύστασης του νερού δοκιμής από απιονισμένο νερό, θα πρέπει να προστίθεται ιώδιο σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,5 μg/l. Κάθε πρόσθετη συμπλήρωση του νερού δοκιμής με ιώδιο ή άλλα άλατα θα πρέπει να επισημαίνεται στην έκθεση.

Διατήρηση των ζώων

Φροντίδα και αναπαραγωγή ενήλικων ατόμων

10. Η φροντίδα και η αναπαραγωγή των ενήλικων ατόμων πραγματοποιείται σύμφωνα με τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές και, για περισσότερες λεπτομέρειες, συστήνεται στον αναγνώστη να ανατρέξει στον πρότυπο οδηγό για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας τερατογένεσης σε έμβryo βατράχου (FETAX) (6). Οι σχετικές τυποποιημένες κατευθυντήριες γραμμές παρέχουν ένα παράδειγμα κατάλληλων μεθόδων φροντίδας και αναπαραγωγής, αλλά δεν απαιτείται αυστηρή τήρησή τους. Για την πρόκληση αναπαραγωγής, χορηγείται ένθετος ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) σε ζεύγη (3-5) θηλυκών και αρσενικών ενήλικων ατόμων. Χορηγούνται με ένεση περίπου 800 IU-1 000 IU και 600 IU-800 IU hCG διαλυμένης σε αλατώδες διάλυμα 0,6-0,9 %, στα θηλυκά και αρσενικά άτομα, αντίστοιχα. Τα ζεύγη αναπαραγωγής διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές ανενόχλητα και κάτω από στατικές συνθήκες, για την προώθηση του ζευγαρώματος. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής αναπαραγωγής θα πρέπει να υπάρχει ένας ψευδο-πυθμένας από πλέγμα ανοξειδωτού χάλυβα ή πλαστικού που να επιτρέπει στις μάζες των αυγών να αποτίθενται στον πυθμένα της δεξαμενής. Τα βατράχια στα οποία η ένεση χορηγείται αργά το απόγευμα, συνήθως εναποθέτουν τα περισσότερα αυγά τους μέχρι τη μέση του πρωινού της επόμενης ημέρας. Μετά την απελευθέρωση και γονιμοποίηση επαρκούς ποσότητας αυγών, τα ενήλικα άτομα θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αναπαραγωγής.

Φροντίδα και επιλογή προνυμφών

11. Μετά την απομάκρυνση των ενήλικων ατόμων από τις δεξαμενές αναπαραγωγής, τα αυγά συλλέγονται και αξιολογούνται ως προς τη βιωσιμότητα με χρήση μιας αντιπροσωπευτικής επιμέρους ομάδας εμβρύων από όλες τις δεξαμενές αναπαραγωγής. Θα πρέπει να διατηρούνται οι καλύτερες ωοτοκίες (για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωοτοκίων συνιστώνται 2-3) με βάση τη βιωσιμότητα των εμβρύων και την παρουσία επαρκούς αριθμού (τουλάχιστον 1 500) εμβρύων. Όλοι οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη θα πρέπει να προέρχονται από μία διαδικασία ωοτοκίας (δηλ. δεν θα πρέπει να αναμιγνύονται μεταξύ τους οι ωοτοκίες). Τα έμβρυα μεταφέρονται σε ένα μεγάλο επίπεδο πιάτο ή δίσκο και όλα τα εμφανώς νεκρά ή μη φυσιολογικά αυγά (βλ. ορισμό στο (5)) απομακρύνονται με χρήση σιφωνίου ή σταγονόμετρου. Τα υγιή έμβρυα από κάθε μία από τις τρεις ωοτοκίες μεταφέρονται σε τρεις ξεχωριστές δεξαμενές εκκόλαψης. Τέσσερις ημέρες μετά την τοποθέτηση στις δεξαμενές εκκόλαψης, επιλέγεται η καλύτερη ωοτοκία, με βάση τη βιωσιμότητα και την επιτυχή εκκόλαψη, και οι προνύμφες μεταφέρονται σε κατάλληλο αριθμό δεξαμενών εκτροφής στους 22° ±1 °C. Επίσης, μερικές επιπλέον προνύμφες μεταφέρονται σε πρόσθετες δεξαμενές για να χρησιμοποιηθούν ως αντικατάσταση σε περίπτωση που σημειωθεί θνησιμότητα στις δεξαμενές εκτροφής κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας. Με τη διαδικασία αυτή διατηρείται σταθερή η πυκνότητα των οργανισμών και επομένως μειώνεται η αναπτυξιακή απόκλιση εντός της κοόρτης μίας διαδικασίας ωοτοκίας. Όλες οι δεξαμενές εκτροφής θα πρέπει να καθαρίζονται καθημερινά με σιφωνισμό. Ως προφύλαξη, προτιμώνται τα γάντια βινυλίου ή νιτριλίου από τα γάντια λάτεξ. Τυχόν θανόντα έμβρυα θα πρέπει να απομακρύνονται καθημερινά και να ορροστίθενται προνύμφες αντικατάστασης για τη διατήρηση της πυκνότητας των οργανισμών κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας. Η σίτιση θα πρέπει να διεξάγεται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα.

12. Κατά τη διάρκεια της φάσης πριν από την έκθεση, οι γυρίνοι εγκλιματίζονται στις συνθήκες που επικρατούν στη φάση της πραγματικής έκθεσης, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της θερμοκρασίας, του κύκλου φωτός/σκοταδιού και του μέσου καλλιέργειας. Επομένως, συνιστάται να χρησιμοποιείται το ίδιο νερό καλλιέργειας/αραιώσης κατά τη φάση πριν από την έκθεση και τη φάση έκθεσης. Εάν χρησιμοποιείται στατικό σύστημα καλλιέργειας για τη διατήρηση των γυρίνων κατά τη φάση πριν από την έκθεση, το μέσο καλλιέργειας θα πρέπει να αντικαθίσταται πλήρως τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα. Θα πρέπει να αποφεύγεται ο συνωστισμός, ο οποίος προκύπτει από υψηλές πυκνότητες προνυμφών κατά την περίοδο πριν από την έκθεση, καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάπτυξη των γυρίνων κατά την επακόλουθη φάση της δοκιμής. Επομένως, η πυκνότητα εκτροφής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει κατά προσέγγιση τους τέσσερις γυρίνους/λίτρο μέσου καλλιέργειας (σύστημα στατικής έκθεσης) ή τους 10 γυρίνους/λίτρο μέσου καλλιέργειας (με ταχύτητα ροής π.χ. 50 ml/λεπτό στο σύστημα πριν από την έκθεση ή στο σύστημα καλλιέργειας). Υπό τις συνθήκες αυτές, οι γυρίνοι θα πρέπει να αναπτύσσονται από τα στάδια 45/46 έως το στάδιο 51 εντός δώδεκα ημερών. Θα πρέπει να ελέγχεται καθημερινά το στάδιο ανάπτυξης αντιπροσωπευτικών γυρίνων από αυτόν τον αρχικό πληθυσμό, προκειμένου να εκτιμάται το κατάλληλο χρονικό σημείο για την έναρξη της έκθεσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση πίεσης και τραυματισμών στους γυρίνους, ιδιαίτερα κατά τη μετακίνηση, τον καθαρισμό των ενυδρείων και τον χειρισμό των προνυμφών. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι συνθήκες/δραστηριότητες που προκαλούν πίεση, όπως ο δυνατός ή/και αδιάκοπος θόρυβος, τα ελαφριά χτυπήματα στα ενυδρεία, οι κραδασμοί μέσα στα ενυδρεία, η υπερβολική δραστηριότητα στον χώρο του εργαστηρίου και οι ταχείες αλλαγές των περιβαλλοντικών μέσων (διαθεσιμότητα φωτός, θερμοκρασία, pH, διαλυμένο οξυγόνο, ταχύτητες ροής νερού κ.λπ.). Εάν οι γυρίνοι δεν αναπτυχθούν έως το στάδιο 51 εντός 17 ημερών από τη γονιμοποίηση, πιθανό αίτιο θα πρέπει να θεωρηθεί η πρόκληση υπερβολικής πίεσης.

Καλλιέργεια και σίτιση προνυμφών

13. Οι γυρίνοι σιτίζονται, για παράδειγμα, με την εμπορικά διαθέσιμη τροφή για γυρίνους που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης (βλ. επίσης προσάρτημα 1) καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου πριν από την έκθεση (μετά το στάδιο 45/46 των Nieuwkoop και Faber (NF) (8)) και καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής των 21 ημερών, ή με άλλη διατροφή με την οποία η απόδοση της δοκιμασίας μεταμόρφωσης αμφιβίων έχει αποδειχθεί ισοδύναμη. Το καθεστώς σίτισης κατά τη διάρκεια της περιόδου πριν από την έκθεση θα πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά ώστε να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των υπό ανάπτυξη γυρίνων. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να παρέχονται μικρές ποσότητες τροφής στους νεοεκκολαφθέντες γυρίνους αρκετές φορές την ημέρα (τουλάχιστον δύο φορές). Η υπερβολική παροχή τροφής θα πρέπει να αποφεύγεται, ώστε i) να διατηρείται η ποιότητα του νερού και ii) να αποτρέπεται η απόφραξη των βραγχιακών ακανθών που λειτουργούν ως φίλτρα με σωματίδια και κατάλοιπα τροφής. Σχετικά με την τροφή των γυρίνων που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης, τα σιτηρέσια θα πρέπει να αυξάνονται παράλληλα με την ανάπτυξη των γυρίνων σε περίπου 30 mg/ζώο/ημέρα λίγο πριν από την έναρξη της δοκιμής. Στις μελέτες επικύρωσης έχει αποδειχθεί ότι αυτή η εμπορικά διαθέσιμη τροφή υποστηρίζει τη σωστή αύξηση και ανάπτυξη των γυρίνων του *X. laevis*, βρίσκεται σε μορφή λεπτών σωματιδίων που παραμένουν σε κατάσταση εναιωρήματος στη στήλη ύδατος για μεγάλο χρονικό διάστημα και υπόκειται σε έκπλυση με τη ροή του νερού. Επομένως, η συνολική ημερήσια ποσότητα τροφής θα πρέπει να διαιρείται σε μικρότερες μερίδες και να παρέχεται ως σίτιση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα. Το καθεστώς σίτισης για αυτήν την τροφή περιγράφεται στον πίνακα 1. Οι ρυθμοί σίτισης θα πρέπει να καταγράφονται. Η τροφή μπορεί να παρέχεται ως ξηρά τροφή ή ως διάλυμα παρακαταθήκης που προετοιμάζεται σε νερό αραιώσης. Το εν λόγω διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να προετοιμάζεται κάθε δεύτερη ημέρα και να αποθηκεύεται στους 4 °C όταν δεν χρησιμοποιείται.

Πίνακας 1.

Καθεστώς σίτισης με εμπορικά διαθέσιμη τροφή γυρίνων που χρησιμοποιείται στις μελέτες επικύρωσης για τους γυρίνους του *X. laevis* κατά τη διάρκεια του έμβιου μέρους της δοκιμασίας AMA σε συνθήκες συνεχούς ροής νερού

| Ημέρα μελέτης | Σιτηρέσιο (mg τροφής/ζώο/ημέρα) |
|---------------|---------------------------------|
| 0-4 | 30 |
| 5-7 | 40 |
| 8-10 | 50 |
| 11-14 | 70 |
| 15-21 | 80 |

Αναλυτική χημεία

14. Πριν από τη διεξαγωγή μιας μελέτης, θα πρέπει να αξιολογείται η σταθερότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τη χρήση υφιστάμενων πληροφοριών σχετικά με τη διαλυτότητα, την αποικοδομησιμότητα και την πτητικότητα της. Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα διαλυμάτων δοκιμής από κάθε δεξαμενή επανάλιψης σε κάθε συγκέντρωση για χημική ανάλυση κατά την έναρξη της δοκιμής (ημέρα 0) και κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια της δοκιμής, για τουλάχιστον τέσσερα δείγματα. Συνιστάται επίσης να αναλύεται κάθε συγκέντρωση δοκιμής κατά την προετοιμασία του συστήματος, πριν από την έναρξη της δοκιμής, για να επαληθευτεί η απόδοση του συστήματος. Επιπλέον, συνιστάται να αναλύονται τα διαλύματα παρακαταθήκης όταν αλλάζονται, ειδικά εάν ο όγκος του διαλύματος παρακαταθήκης δεν παρέχει επαρκείς ποσότητες της χημικής ουσίας ώστε να καλύπτεται ολόκληρη η διάρκεια των περιόδων τακτικής δειγματοληψίας. Στην περίπτωση χημικών ουσιών που δεν είναι δυνατό να ανιχνευτούν σε μερικές ή όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε μια δοκιμή, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση των διαλυμάτων παρακαταθήκης και καταγραφή των ταχυτήτων ροής του συστήματος, προκειμένου να υπολογίζονται οι ονομαστικές συγκεντρώσεις.

Παροχή της χημικής ουσίας

15. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Οι υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε κλάσματα νερού δοκιμής σε συγκέντρωση που επιτρέπει την παροχή της χημικής ουσίας στην επιδιωκόμενη συγκέντρωση δοκιμής σε σύστημα συνεχούς ροής νερού. Οι χημικές ουσίες που βρίσκονται υπό μορφή υγρού σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση μεθόδων κορεσμού υγρού:υγρού. Οι χημικές ουσίες που βρίσκονται υπό μορφή στερεού σε θερμοκρασία δωματίου και οι οποίες είναι μέτρια διαλυτές στο νερό μπορούν να εισάγονται με τη χρήση κορεστών στήλης υαλοβάμβακα (7). Δίνεται προτίμηση στη χρήση ενός συστήματος δοκιμής χωρίς φορέα, ωστόσο οι διάφορες υπό δοκιμή χημικές ουσίες έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες πιθανώς να απαιτούν διαφορετικές προσεγγίσεις, όσον αφορά την προετοιμασία του νερού χημικής έκθεσης. Είναι προτιμότερο να καταβάλλεται προσπάθεια αποφυγής διαλυτών ή φορέων επειδή: i) ορισμένοι διαλύτες μπορεί οι ίδιοι να προκαλέσουν τοξικότητα ή/και δυσμενείς ή αναπάντεχες ενδοκρινολογικές αποκρίσεις, ii) οι δοκιμές των χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την υδατοδιαλυτότητά τους (όπως μπορεί συχνά να συμβεί με τη χρήση διαλυτών) μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα ανακριβείς προσδιορισμούς των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων και iii) η χρήση διαλυτών σε πιο μακροπρόθεσμες δοκιμές μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικού βαθμού σχηματισμό "βιομεμβρανών" που σχετίζονται με τη μικροβιακή δραστηριότητα. Για χημικές ουσίες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής, μπορεί να χρησιμοποιείται διαλύτης ως έσχατη λύση και θα πρέπει να συμβουλευέστε το έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μιγμάτων) (4) για τον προσδιορισμό της βέλτιστης μεθόδου. Η επιλογή του διαλύτη θα καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Οι διαλύτες που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί για δοκιμές υδατικής τοξικότητας περιλαμβάνουν την ακετόνη, την αιθανόλη, τη μεθανόλη, το διμεθυλοφορμαμίδιο και την τριαιθυλενογλυκόλη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, οι συγκεντρώσεις του διαλύτη θα πρέπει να είναι χαμηλότερες από τη χρόνια συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται καμία επίδραση (No Observed Effect Concentration -NOEC). Σύμφωνα με το έγγραφο καθοδήγησης του ΟΟΣΑ, η μέγιστη συνιστώμενη συγκέντρωση είναι 100 μl/l, ενώ μια πρόσφατη ανασκόπηση συνιστά τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων διαλύτη έως και 20 μl/l νερού αραιώσης (12). Εάν χρησιμοποιούνται διαλύτες ως φορείς, θα πρέπει να αξιολογούνται κατάλληλοι μάρτυρες με διαλύτη εκτός από τους μάρτυρες χωρίς διαλύτη (καθαρό νερό). Εάν δεν είναι δυνατή η χορήγηση μιας χημικής ουσίας μέσω του νερού, είτε λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (χαμηλή διαλυτότητα) είτε λόγω της περιορισμένης χημικής διαθεσιμότητας, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο εισαγωγής της μέσω της διατροφής. Έχουν διεξαχθεί προκαταρκτικές εργασίες σχετικά με τις εκθέσεις μέσω της διατροφής, ωστόσο αυτή η οδός έκθεσης δεν χρησιμοποιείται συχνά. Η επιλογή της μεθόδου θα πρέπει να τεκμηριώνεται και να επαληθεύεται μέσω ανάλυσης.

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

Καθορισμός της υψηλής συγκέντρωσης δοκιμής

16. Για τους σκοπούς της παρούσας δοκιμής, η υψηλή συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να ορίζεται σύμφωνα με το όριο διαλυτότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, τη μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση (ΜΑΣ) για χημικές ουσίες οξείας τοξικότητας ή ως 100 mg/l, όποια τιμή είναι χαμηλότερη.
17. Η ΜΑΣ ορίζεται ως η υψηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στη δοκιμή που έχει ως αποτέλεσμα οξεία θνησιμότητα μικρότερη από 10 %. Η χρήση αυτής της προσέγγισης προϋποθέτει την ύπαρξη εμπειρικών δεδομένων οξείας θνησιμότητας από τα οποία μπορεί να γίνει εκτίμηση της ΜΑΣ. Η εκτίμηση της ΜΑΣ μπορεί να μην είναι ακριβής και συνήθως απαιτεί τη γνώμη ενός ειδικού. Παρότι η χρήση μοντέλων παλινδρόμησης ενδέχεται να αποτελέσει την πιο ορθή τεχνικά προσέγγιση για την εκτίμηση της ΜΑΣ, είναι δυνατό να προκύψει μια χρήσιμη κατά προσέγγιση τιμή της ΜΑΣ από υφιστάμενα δεδομένα οξείας τοξικότητας με τη χρήση του 1/3 της τιμής LC₅₀ για την οξεία τοξικότητα. Ωστόσο, ενδέχεται να υπάρχει έλλειψη δεδομένων οξείας τοξικότητας για το είδος υπό δοκιμή. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα οξείας τοξικότητας για το συγκεκριμένο είδος, μπορεί να ολοκληρωθεί μια εξέταση LC₅₀ 96 ωρών με γυρίνους που είναι αντιπροσωπευτικοί (δηλ., του ίδιου σταδίου) εκείνων που βρίσκονται υπό δοκιμή στη δοκιμασία ΑΜΑ. Προαιρετικά, εάν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από άλλα υδρόβια είδη (π.χ. μελέτες LC₅₀ σε ψάρια ή άλλα είδη αμφιβίων), μπορεί κατόπιν επαγγελματικής κρίσης να γίνει εκτίμηση μιας πιθανής ΜΑΣ βάσει παρέκτασης μεταξύ ειδών.

18. Εναλλακτικά, εάν η χημική ουσία δεν είναι οξείας τοξικότητας και είναι διαλυτή σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 100 mg/l, η τιμή των 100 mg/l θα πρέπει να θεωρείται η ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής (ΑΣΔ), καθώς η συγκέντρωση αυτή γενικά θεωρείται “πρακτικά μη τοξική”.
19. Οι μέθοδοι στατικής ανανέωσης δεν αποτελούν την προτεινόμενη διαδικασία, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν οι μέθοδοι συνεχούς ροής νερού είναι ανεπαρκείς για την επίτευξη της ΜΑΣ. Εάν χρησιμοποιούνται μέθοδοι στατικής ανανέωσης, η σταθερότητα της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να τεκμηριώνεται και να παραμένει εντός των οριακών τιμών των κριτηρίων απόδοσης. Συνιστώνται περίοδοι ανανέωσης είκοσι τεσσάρων ωρών. Περίοδοι ανανέωσης που υπερβαίνουν τις 72 ώρες δεν είναι αποδεκτές. Επιπλέον, θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι ποιότητας του νερού (π.χ. διαλυμένο οξυγόνο, θερμοκρασία, pH κ.λπ.) στο τέλος κάθε περιόδου ανανέωσης, αμέσως πριν από την ανανέωση.

Εύρος συγκεντρώσεων δοκιμής

20. Απαιτούνται κατ' ελάχιστον τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής και ένας μάρτυρας καθαρού νερού (και μάρτυρας φορέα, εάν απαιτείται). Η ελάχιστη διαφορά της συγκέντρωσης δοκιμής μεταξύ της υψηλότερης και της χαμηλότερης τιμής θα πρέπει να είναι περίπου μία τάξη μεγέθους. Ο μέγιστος διαχωρισμός δόσεων είναι 0,1 και ο ελάχιστος είναι 0,33.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έναρξη και διεξαγωγή δοκιμής

Ημέρα 0

21. Η έκθεση θα πρέπει να ξεκινάει όταν ένας επαρκής αριθμός γυρίνων από τον αρχικό πληθυσμό πριν από την έκθεση έχει φτάσει στο στάδιο ανάπτυξης 51, σύμφωνα με τους Nieuwkoop και Faber (8), οι οποίοι έχουν ηλικία μικρότερη ή ίση των 17 ημερών μετά τη γονιμοποίηση. Για την επιλογή των ζώων δοκιμής, οι υγιείς γυρίνοι φυσιολογικής εμφάνισης του αρχικού πληθυσμού θα πρέπει να συνενώνονται σε ένα μοναδικό δοχείο που περιέχει κατάλληλο όγκο νερού αραίωσης. Για τον καθορισμό του σταδίου ανάπτυξης, ο κάθε γυρίνος θα πρέπει να απομακρύνεται από τη δεξαμενή συνένωσης με μια μικρή απόχλη ή σουρωτήρι και να μεταφέρεται σε έναν διαφανή θάλαμο μέτρησης (π.χ. τρυβλίο Petri των 100 mm) που περιέχει νερό αραίωσης. Για τον καθορισμό του σταδίου, προτιμάται να μην χρησιμοποιείται αναισθησία. Ωστόσο, μπορεί να πραγματοποιηθεί μεμονωμένη αναισθησία των γυρίνων με τη χρήση 100 mg/l μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (π.χ. MS-222), στην οποία έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου (pH 7,0) πριν από τον χειρισμό. Εάν χρησιμοποιηθεί αναισθησία, η μεθοδολογία σχετικά με τον κατάλληλο τρόπο χρήσης π.χ. της MS-222 για σκοπούς αναισθησίας θα πρέπει να λαμβάνεται από πεπειραμένα εργαστήρια και να αναφέρεται μαζί με τα αποτελέσματα της δοκιμής. Ο χειρισμός των ζώων κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς θα πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόκληση πίεσης λόγω του χειρισμού και να αποφεύγονται τυχόν τραυματισμοί.
22. Το στάδιο ανάπτυξης των ζώων καθορίζεται με τη χρήση διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου. Για τον περιορισμό της τελικής μεταβλητότητας του σταδίου ανάπτυξης, είναι σημαντικό ο καθορισμός του σταδίου να διεξάγεται με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Σύμφωνα με τους Nieuwkoop και Faber (8), το κύριο αναπτυξιακό σημείο αναφοράς για την επιλογή των οργανισμών του σταδίου 51 είναι η μορφολογία των οπίσθιων άκρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των οπίσθιων άκρων θα πρέπει να εξετάζονται στο μικροσκόπιο. Ενώ θα πρέπει κανείς να συμβουλευτεί τον πλήρη οδηγό των Nieuwkoop και Faber (8) για εκτενείς πληροφορίες σχετικά με τον καθορισμό σταδίου των γυρίνων, το στάδιο ανάπτυξης μπορεί να καθορίζεται με αξιοπιστία με χρήση των βασικών μορφολογικών σημείων αναφοράς. Ο ακόλουθος πίνακας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απλοποίηση και την τυποποίηση της διαδικασίας καθορισμού των σταδίων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης με την αναγνώριση των βασικών μορφολογικών σημείων αναφοράς που σχετίζονται με τα διάφορα στάδια, με την προϋπόθεση ότι η ανάπτυξη είναι φυσιολογική.

Πίνακας 2.

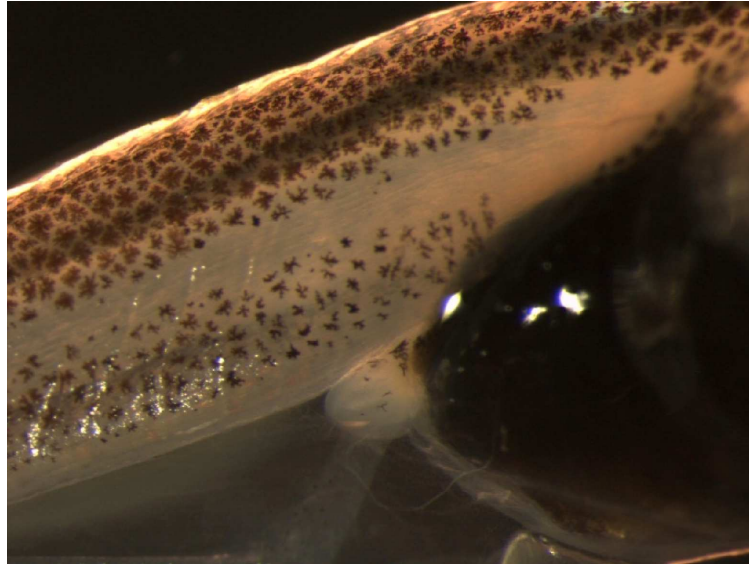
Βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς για τον καθορισμό των σταδίων με βάση τον οδηγό καθοδήγησης των Nieuwkoop και Faber.

| Βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς | Στάδιο ανάπτυξης | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 |
| Οπίσθιο άκρο | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Εμπρόσθιο άκρο | | | | | | X | X | X | X | X | | | | | | |
| Κρανιοπροσωπική δομή | | | | | | | | | | X | X | X | X | | | |
| Μορφολογία οσφρητικού νεύρου | | | | | | | | | | | X | X | X | | | |
| Μήκος ουράς | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X |

23. Για την έναρξη της δοκιμής, όλοι οι γυρίνοι θα πρέπει να βρίσκονται στο στάδιο 51. Το βασικότερο μορφολογικό σημείο αναφοράς για τον καθορισμό αυτού του σταδίου είναι η μορφολογία των οπίσθιων άκρων, η οποία απεικονίζεται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1.

Μορφολογία οπίσθιων άκρων ενός γυρίνου σταδίου 51 του *X. laevis*.



24. Εκτός από την επιλογή του σταδίου ανάπτυξης, μπορεί προαιρετικά να γίνει και επιλογή μεγέθους των πειραματόζων. Για τον σκοπό αυτό, θα πρέπει να καταμετράται την ημέρα 0 το μήκος ολόκληρου του σώματος (και όχι το μήκος SVL) ενός επιμέρους δείγματος αποτελούμενου από περίπου 20 γυρίνους σταδίου 51 κατά NF. Μετά τον υπολογισμό του μέσου μήκους ολόκληρου του σώματος για αυτήν την ομάδα ζών, μπορούν να οριστούν τα ελάχιστα και μέγιστα όρια για το μήκος ολόκληρου του σώματος των πειραματόζων, παρέχοντας ένα εύρος ± 3 mm από τη μέση τιμή (οι μέσες τιμές του μήκους ολόκληρου του σώματος κυμαίνονται μεταξύ 24,0 και 28,1 mm για γυρίνους σταδίου 51). Ωστόσο, ο προσδιορισμός του σταδίου ανάπτυξης είναι η βασική παράμετρος προκειμένου να καθορισθεί εάν κάθε ζώο δοκιμής είναι έτοιμο. Οι γυρίνοι που παρουσιάζουν εμφανώς ορατές δυσμορφίες ή τραυματισμούς θα πρέπει να αποκλείονται από τη δοκιμασία.
25. Οι γυρίνοι που πληρούν τα κριτήρια του σταδίου που περιγράφονται ανωτέρω διατηρούνται σε μια δεξαμενή με καθαρό νερό καλλιέργειας μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας καθορισμού σταδίου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία καθορισμού σταδίου, οι προνύμφες κατανέμονται τυχαία σε δεξαμενές αγωγής έκθεσης μέχρι η κάθε δεξαμενή να περιέχει 20 προνύμφες. Κατόπιν, κάθε δεξαμενή αγωγής ελέγχεται με σκοπό τον εντοπισμό ζών με μη φυσιολογική εμφάνιση (π.χ. τραυματισμοί, ασυνήθιστη συμπεριφορά κολύμβησης κ.λπ.). Οι γυρίνοι με έκδηλα μη υγιή εμφάνιση θα πρέπει να απομακρύνονται από τις δεξαμενές αγωγής και να αντικαθίστανται από νεοεπιλεγμένες προνύμφες από τη δεξαμενή συνένωσης.

Παρατηρήσεις

26. Για αναλυτικότερες πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες τερματισμού της δοκιμής και με την επεξεργασία των γυρίνων, ανατρέξτε στο έγγραφο OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (Έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για την ιστολογία του θυρεοειδούς των αμφιβίων) (9).

Μετρήσεις 7ης ημέρας

27. Την 7η ημέρα, πέντε γυρίνοι τυχαίας επιλογής ανά επανάληψη απομακρύνονται από κάθε δεξαμενή δοκιμής. Η τυχαία διαδικασία που χρησιμοποιείται θα πρέπει να παρέχει την ίδια πιθανότητα επιλογής σε κάθε οργανισμό της δοκιμής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση οποιασδήποτε μεθόδου τυχαιοποίησης, αλλά προϋποθέτει την παγίδευση κάθε γυρίνου με δίχτυ. Οι γυρίνοι που δεν επιλέγονται επιστρέφονται στη δεξαμενή προέλευσης, ενώ οι επιλεγμένοι γυρίνοι υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία σε 150 έως 200 mg/l π.χ. MS-222, όπου έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου για την επίτευξη pH 7,0. Οι υποβληθέντες σε ευθανασία γυρίνοι εκπλένονται σε νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το σωματικό τους βάρος με ακρίβεια χιλιοστόγραμμα. Για κάθε γυρίνο προσδιορίζεται το μήκος οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλωάκης και το στάδιο ανάπτυξης (με τη χρήση διοφθάλμιου στερεοσκοπικού μικροσκοπίου).

Μετρήσεις 21ης ημέρας (Τερματισμός δοκιμής)

28. Κατά τον τερματισμό της δοκιμής (21η ημέρα), οι υπόλοιποι γυρίνοι απομακρύνονται από τις δεξαμενές δοκιμής και υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία σε 150 έως 200 mg/l π.χ. MS-222, όπου έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου, όπως περιγράφεται ανωτέρω. Οι γυρίνοι εκπλένονται σε νερό και στεγνώνονται με απορροφητικό χαρτί. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το σωματικό τους βάρος με ακρίβεια χιλιοστόγραμμα. Για κάθε γυρίνο προσδιορίζεται το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το μήκος οπίσθιων άκρων.
29. Όλες οι προνύμφες τοποθετούνται σε μονιμοποιητικό υγρό του Davidson για 48 έως 72 ώρες είτε ως δείγματα ολόκληρου σώματος είτε ως δείγματα τεμαχισμένου ιστού κεφαλής που περιλαμβάνει την κάτω γνάθο για ιστολογικές εκτιμήσεις. Για την ιστοπαθολογική εξέταση, θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία συνολικά πέντε γυρίνων από κάθε δεξαμενή επανάληψης. Επειδή το μήκος των θυλακικών κυττάρων εξαρτάται από το στάδιο (10), η καταλληλότερη προσέγγιση δειγματοληψίας για τις ιστολογικές αναλύσεις είναι η χρήση ατόμων με αντιστοιχία σταδίου, όπου αυτό είναι δυνατό. Για να γίνει επιλογή ατόμων με αντιστοιχία σταδίου, θα πρέπει αρχικά να προσδιοριστεί το στάδιο όλων των προνυμφών και, στη συνέχεια, να ακολουθήσει η επιλογή και η επακόλουθη επεξεργασία για τη συλλογή και διατήρηση δεδομένων. Αυτό είναι απαραίτητο, επειδή η φυσιολογική απόκλιση στην ανάπτυξη θα οδηγήσει σε διαφορετικές κατανομές των σταδίων σε κάθε δεξαμενή επανάληψης.
30. Τα ζώα που επιλέγονται για αναλύσεις ιστοπαθολογίας (n = 5 από κάθε επανάληψη) θα πρέπει να αντιστοιχίζονται στο διάμεσο στάδιο των μάρτυρων (συνενωμένες επανλήψεις), όπου είναι δυνατό. Εάν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης με περισσότερες από πέντε προνύμφες στο επιθυμητό στάδιο, επιλέγονται τυχαία πέντε προνύμφες.
31. Εάν υπάρχουν δεξαμενές επανάληψης με λιγότερες από πέντε προνύμφες στο επιθυμητό στάδιο, θα πρέπει να πραγματοποιείται τυχαία δειγματοληψία ατόμων από το αμέσως κατώτερο ή ανώτερο στάδιο ανάπτυξης ώστε να επιτυγχάνεται το συνολικό μέγεθος δείγματος των πέντε προνυμφών ανά επανάληψη. Κατά προτίμηση, η απόφαση σχετικά με το αν η δειγματοληψία επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιηθεί από το αμέσως κατώτερο ή το αμέσως ανώτερο στάδιο ανάπτυξης θα πρέπει να λαμβάνεται βάσει μιας συνολικής αξιολόγησης της κατανομής σταδίων στον μάρτυρα και στις αγωγές με χημικές ουσίες. Δηλαδή εάν η αγωγή με τη χημική ουσία σχετίζεται με καθυστέρηση της ανάπτυξης, τότε η δειγματοληψία των επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιείται από το αμέσως κατώτερο στάδιο. Αντίστοιχα, εάν η αγωγή με τη χημική ουσία σχετίζεται με επιτάχυνση της ανάπτυξης, τότε η δειγματοληψία των επιπλέον προνυμφών θα πρέπει να πραγματοποιείται από το αμέσως ανώτερο στάδιο.
32. Σε περιπτώσεις σοβαρών αλλαγών στην ανάπτυξη των γυρίνων εξαιτίας της αγωγής με την υπό δοκιμή χημική ουσία, μπορεί να μην υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ της κατανομής σταδίων των ομάδων αγωγής με τη χημική ουσία και του εκτιμώμενου διαμέσου σταδίου ανάπτυξης του μάρτυρα. Μόνο σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαδικασία επιλογής θα πρέπει να τροποποιείται με τη χρήση ενός σταδίου που διαφέρει από το διάμεσο στάδιο του μάρτυρα, ώστε να επιτυγχάνεται δειγματοληψία με αντιστοιχία σταδίου των προνυμφών για την ιστοπαθολογική εξέταση του θυρεοειδούς. Επιπλέον, εάν τα στάδια είναι απροσδιόριστα (δηλ. ασυγχρονισμός), θα πρέπει να επιλέγονται τυχαία 5 γυρίνοι από κάθε επανάληψη για ιστολογική ανάλυση. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιείται δειγματοληψία οποιωνδήποτε προνυμφών που δεν βρίσκονται στο αντίστοιχο στάδιο ανάπτυξης με αυτό του διαμέσου σταδίου ανάπτυξης του μάρτυρα θα πρέπει να αναφέρεται.

Καθορισμός βιολογικών τελικών σημείων

33. Κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης 21 ημερών, η μέτρηση των πρωτεύοντων τελικών σημείων πραγματοποιείται την 7η ημέρα και την 21η ημέρα, ωστόσο απαιτείται καθημερινή παρακολούθηση των ζώων δοκιμής. Στον πίνακα 3 παρέχεται μια επισκόπηση των τελικών σημείων μέτρησης και των αντίστοιχων χρονικών σημείων παρατήρησης. Αναλυτικότερες πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές διαδικασίες για τη μέτρηση των κορυφαίων τελικών σημείων και τις ιστολογικές εκτιμήσεις διατίθενται στα έγγραφα καθοδήγησης του ΟΟΣΑ (9).

Πίνακας 3.

Χρονικά σημεία παρατήρησης για πρωτεύοντα τελικά σημεία στη δοκιμασία AMA.

| Κορυφαία τελικά σημεία | Καθημερινά | 7η ημέρα | 21η ημέρα |
|--------------------------------|------------|----------|-----------|
| — Θνησιμότητα | • | | |
| — Στάδιο ανάπτυξης | | • | • |
| — Μήκος οπίσθιων άκρων | | • | • |
| — Μήκος ρύγχους-κλοάκης | | • | • |
| — Υγρό σωματικό βάρος | | • | • |
| — Ιστολογία θυρεοειδούς αδένος | | | • |

Κορυφαία τελικά σημεία

34. Το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος οπίσθιων άκρων, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το υγρό βάρος αποτελούν τα κορυφαία τελικά σημεία της δοκιμασίας AMA, και το καθένα περιγράφεται εν συντομία παρακάτω. Περισσότερες τεχνικές πληροφορίες για τη συλλογή αυτών των δεδομένων διατίθενται στα αναφερόμενα έγγραφα καθοδήγησης, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών για ανάλυση μέσω υπολογιστή, οι οποίες συνιστώνται προς χρήση.

Στάδιο ανάπτυξης

35. Το στάδιο ανάπτυξης των γυρίνων του *X. laevis* προσδιορίζεται με χρήση των κριτηρίων καθορισμού σταδίου των Nieuwkoop και Faber (8). Τα δεδομένα σταδίων ανάπτυξης χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί εάν η ανάπτυξη είναι ταχύτερη, ασύγχρονη, καθυστερημένη ή ανεπηρέαστη. Η επιτάχυνση ή η καθυστέρηση της ανάπτυξης προσδιορίζεται με σύγκριση μεταξύ των διαμέσων σταδίων που επιτυγχάνονται από την ομάδα μαρτύρων και τις ομάδες που λαμβάνουν αγωγή. Η ανάπτυξη αναφέρεται ως ασύγχρονη όταν οι εξεταζόμενοι ιστοί δεν παρουσιάζουν δυσμορφία ή μη φυσιολογική εμφάνιση, αλλά ο σχετικός χρονισμός της μορφογένεσης ή της ανάπτυξης των διαφορετικών ιστών διαταράσσεται σε έναν γυρίνο.

Μήκος οπίσθιων άκρων

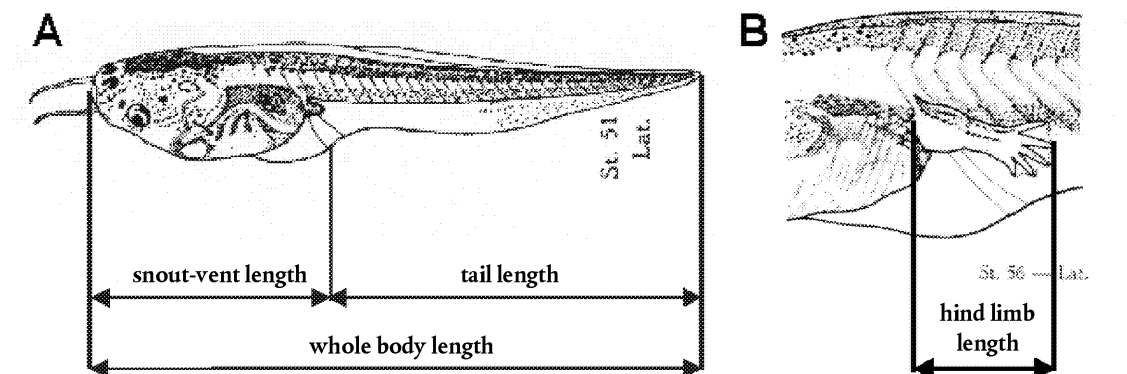
36. Η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων ελέγχονται από τις θυρεοειδικές ορμόνες, ενώ αποτελούν σημαντικά σημεία αναφοράς της ανάπτυξης τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη για τον προσδιορισμό του σταδίου ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων χρησιμοποιείται ως ποιοτικός δείκτης στον προσδιορισμό του σταδίου ανάπτυξης, αλλά εδώ λαμβάνεται υπόψη ως ποσοτικό τελικό σημείο. Επομένως, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων χρησιμοποιείται ως τελικό σημείο για τον εντοπισμό των επιδράσεων στον άξονα του θυρεοειδούς (Σχήμα 2). Για λόγους συνέπειας, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων πραγματοποιείται στο αριστερό οπίσθιο άκρο. Το μήκος των οπίσθιων άκρων αξιολογείται την 7η και την 21η ημέρα της δοκιμής. Την 7η ημέρα, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων είναι μια απλή διαδικασία, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2. Ωστόσο, η μέτρηση του μήκους των οπίσθιων άκρων την 21η ημέρα είναι πιο πολύπλοκη εξαιτίας των κάμψεων του άκρου. Επομένως, οι μετρήσεις του μήκους των οπίσθιων άκρων την 21η ημέρα θα πρέπει να ξεκινούν από το τοίχωμα του σώματος και να ακολουθούν τη μεσαία γραμμή του άκρου όταν συναντάται γωνιακή απόκλιση. Αλλαγές στο μήκος των οπίσθιων άκρων την 7η ημέρα, ακόμα και εάν δεν είναι εμφανείς την 21η ημέρα, εξακολουθούν να θεωρούνται σημαντικές σε ό,τι αφορά τη δυναμική θυρεοειδική δραστηριότητα. Οι μετρήσεις του μήκους λαμβάνονται από ψηφιακές φωτογραφίες με τη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνας, όπως περιγράφεται στο έγγραφο OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (Έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για την ιστολογία του θυρεοειδούς των αμφιβίων) (9).

Μήκος σώματος και υγρό βάρος

37. Στο πρωτόκολλο της δοκιμής περιλαμβάνονται προσδιορισμοί του μήκους ρύγχους-κλοάκης (SVL) (Σχήμα 2) και του υγρού βάρους, για να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις των υπό δοκιμή χημικών ουσιών στον ρυθμό ανάπτυξης των γυρίνων σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα, οι οποίοι είναι επίσης χρήσιμοι για τον εντοπισμό γενικευμένης τοξικότητας στην υπό δοκιμή χημική ουσία. Επειδή η απομάκρυνση του νερού από το σώμα των γυρίνων για τους προσδιορισμούς του βάρους μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες πρόκλησης πίεσης για τους γυρίνους και ενδέχεται να προκαλέσει δερματική βλάβη, οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιούνται την 7η ημέρα στους γυρίνους του επιμέρους δείγματος και κατά τον τερματισμό της δοκιμής (21η ημέρα) στους υπόλοιπους γυρίνους. Για λόγους συνέπειας, χρησιμοποιείτε την κρανιακή όψη της κλοάκης ως το ουραίο όριο της μέτρησης.
38. Το μήκος ρύγχους-κλοάκης (SVL) χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η ανάπτυξη των γυρίνων, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 2.

Σχήμα 2.

(A) Τύποι μετρήσεων του μήκους σώματος και (B) μετρήσεις του μήκους οπίσθιων άκρων στους γυρίνους του *X. laevis* (1).



Ιστολογία θυρεοειδούς αδένα

39. Παρότι το στάδιο ανάπτυξης και το μήκος οπίσθιων άκρων αποτελούν σημαντικά τελικά σημεία για την αξιολόγηση αλλαγών που σχετίζονται με την έκθεση κατά τη διαδικασία μεταμόρφωσης, η καθυστερημένη ανάπτυξη δεν μπορεί από μόνη της να θεωρείται διαγνωστικός δείκτης αντιθυρεοειδικής δράσης. Μερικές αλλαγές μπορούν να εντοπιστούν μόνο με ιστοπαθολογική ανάλυση ρουτίνας. Τα διαγνωστικά κριτήρια περιλαμβάνουν την υπερτροφία/ατροφία του θυρεοειδούς αδένα, την υπερτροφία των θυλακικών κυττάρων, την υπερπλασία των θυλακικών κυττάρων και, ως πρόσθετα ποιοτικά κριτήρια, τα εξής: περιοχή του θυλακικού αυλού, ποιότητα κολλοειδούς και ύψος/σχήμα θυλακικών κυττάρων. Θα πρέπει να αναφέρεται και ο βαθμός σοβαρότητας (4 βαθμοί). Πληροφορίες σχετικά με τη λήψη και την επεξεργασία δειγμάτων για ιστολογική ανάλυση, καθώς και για τη διεξαγωγή ιστολογικών αναλύσεων σε δείγματα ιστού διατίθενται στο έγγραφο “Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation” (Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων: Μέρος 1 — Τεχνικές κατευθύνσεις για τη μορφολογική δειγματοληψία και την ιστολογική προετοιμασία) και στο έγγραφο “Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas” (Δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων: Μέρος 2 — Προσέγγιση στην ερμηνεία μελετών, διαγνωστικών κριτηρίων, βαθμολόγησης σοβαρότητας και του άτλαντα) (9). Όταν ένα εργαστήριο πραγματοποιεί τη δοκιμασία για πρώτη φορά ή από τις πρώτες φορές, θα πρέπει να συμβουλευτείται πεπειραμένους παθολογοανατόμους για σκοπούς εκπαίδευσης προτού αναλάβει την ιστολογική ανάλυση και αξιολόγηση του θυρεοειδούς αδένα. Έκδηλες και σημαντικές αλλαγές σε κορυφαία τελικά σημεία που υποδεικνύουν επιτάχυνση ή ασυγχρονισμό της ανάπτυξης ενδέχεται να καθιστούν μη αναγκαία την εκτέλεση ιστοπαθολογικής ανάλυσης του θυρεοειδούς αδένα. Ωστόσο, η απουσία έκδηλων μορφολογικών αλλαγών ή οι ενδείξεις καθυστέρησης στην ανάπτυξη επιβάλλουν τη διεξαγωγή ιστολογικών αναλύσεων.

Θνησιμότητα

40. Όλες οι δεξαμενές δοκιμής θα πρέπει να ελέγχονται καθημερινά για νεκρούς γυρίνους και θα πρέπει να καταγράφονται οι αριθμοί για κάθε δεξαμενή. Για κάθε θνησιμότητα που παρατηρείται, θα πρέπει να καταγράφονται η ημερομηνία, η συγκέντρωση και ο αριθμός της δεξαμενής. Τα νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τη δεξαμενή δοκιμής αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά. Ποσοστά θνησιμότητας που υπερβαίνουν το 10 % ενδέχεται να υποδεικνύουν ακατάλληλες συνθήκες δοκιμής ή τοξικές επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συμπληρωματικές παρατηρήσεις

41. Περιπτώσεις μη φυσιολογικής συμπεριφοράς και μακροσκοπικών δυσμορφιών και βλαβών θα πρέπει να καταγράφονται. Για κάθε μη φυσιολογική συμπεριφορά και μακροσκοπική δυσμορφία ή βλάβη που παρατηρείται, θα πρέπει να καταγράφονται η ημερομηνία, η συγκέντρωση και ο αριθμός της δεξαμενής. Η φυσιολογική συμπεριφορά χαρακτηρίζεται από την εναιώρηση των γυρίνων στη στήλη ύδατος με την ουρά ανεβασμένη πάνω από το κεφάλι, το τακτικό και ρυθμικό χτύπημα του ουραίου περυγίου, την περιοδική ανάδυση στην επιφάνεια του νερού, το ανοιγοκλείσιμο των επικαλυμμάτων των βραγχίων και την ανταπόκριση σε ερεθίσματα. Η μη φυσιολογική συμπεριφορά μπορεί να περιλαμβάνει, για παράδειγμα, επίπλευση στην επιφάνεια, παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής, ανεστραμμένη ή ακανόνιστη κολύμβηση, έλλειψη δραστηριότητας ανάδυσης και μη ανταπόκριση σε ερεθίσματα. Επιπλέον, μεγάλες διαφορές στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των αγωγών θα πρέπει να καταγράφονται. Μακροσκοπικές δυσμορφίες και βλάβες μπορεί να περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, μορφολογικές ανωμαλίες (π.χ. παραμορφώσεις άκρων), αιμορραγικές βλάβες ή λοιμώξεις από βακτήρια ή μύκητες. Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι ποιοτικοί και θα πρέπει θεωρούνται παρόμοιοι με κλινικές ενδείξεις ασθένειας/πίεσης, καθώς και να γίνονται σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Εάν η εμφάνιση ή ο ρυθμός εμφάνισής τους είναι μεγαλύτερος στις δεξαμενές έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες, θα πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Συλλογή δεδομένων

42. Όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συλλέγονται με χρήση ηλεκτρονικών ή μη αυτόματων συστημάτων που συμμορφώνονται με τους κανόνες των ορθών εργαστηριακών πρακτικών (ΟΕΠ). Στα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- Χαρακτηρισμός της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: φυσικοχημικές ιδιότητες, πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητα,
- Χημικές πληροφορίες και δεδομένα: μέθοδος και συχνότητα προετοιμασίας των αραιώσεων. Οι πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή χημική ουσία περιλαμβάνουν τις πραγματικές και ονομαστικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, σε μερικές περιπτώσεις, της μη μητρικής χημικής ουσίας, εάν απαιτείται. Μετρήσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μπορεί να απαιτούνται τόσο για τα διαλύματα παρακαταθήκης, όσο και για τα διαλύματα δοκιμής,
- Διαλύτης (εάν είναι διαφορετικός από το νερό): αιτιολόγηση για την επιλογή του διαλύτη και χαρακτηρισμός του διαλύτη (φύση, χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση),

Συνθήκες δοκιμής:

- Αρχεία λειτουργιών: αυτά περιλαμβάνουν παρατηρήσεις που αφορούν τη λειτουργία του συστήματος δοκιμής, καθώς και το περιβάλλον υποστήριξης και την υποδομή. Στα τυπικά αρχεία περιλαμβάνονται τα εξής: θερμοκρασία περιβάλλοντος, θερμοκρασία δοκιμής, φωτοπερίοδος, κατάσταση κρίσιμων εξαρτημάτων του συστήματος έκθεσης (π.χ. αντλίες, μετρητές κύκλου, πιέσεις), ταχύτητες ροής, επίπεδα νερού, αλλαγές φιάλης διαλύματος παρακαταθήκης και αρχεία σίτισης. Στις γενικές παραμέτρους ποιότητας νερού περιλαμβάνονται τα εξής: pH, διαλυμένο οξυγόνο, αγωγιμότητα, συνολικό ιώδιο, αλκαλικότητα και σκληρότητα,
- Αποκλίσεις από τη μέθοδο δοκιμών: οι πληροφορίες αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν οποιοδήποτε στοιχείο ή λεπτομερείς περιγραφές των αποκλίσεων από τη μέθοδο δοκιμών,

Αποτελέσματα:

- Βιολογικές παρατηρήσεις και δεδομένα: αυτά περιλαμβάνουν καθημερινές παρατηρήσεις της θνησιμότητας, της κατανάλωσης τροφής, της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς κολύμβησης, του λήθαργου, της απώλειας ισορροπίας, των δυσμορφιών, των βλαβών κ.λπ. Οι παρατηρήσεις και τα δεδομένα που συλλέγονται σε προκαθορισμένα διαστήματα είναι, μεταξύ άλλων: στάδιο ανάπτυξης, μήκος οπίσθιων άκρων, μήκος ρύγχους-κλοάκης και υγρό βάρος,
- Στατιστικές τεχνικές ανάλυσης και αιτιολόγηση των χρησιμοποιούμενων τεχνικών, αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης, κατά προτίμηση σε μορφή πίνακα,
- Ιστολογικά δεδομένα: αυτά περιλαμβάνουν λεπτομερείς περιγραφές, καθώς και βαθμολογίες για τη σοβαρότητα και τη συχνότητα συγκεκριμένων παρατηρήσεων, όπως περιγράφεται στο έγγραφο καθοδήγησης ιστοπαθολογίας,
- Παρατηρήσεις ad hoc: οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν λεπτομερείς περιγραφές της μελέτης που δεν εντάσσονται στις κατηγορίες που περιγράφηκαν προηγουμένως.

Αναφορά δεδομένων

43. Το προσάρτημα 2 περιέχει φύλλα εργασίας για την καθημερινή συλλογή δεδομένων που μπορούν να χρησιμοποιούνται ως οδηγός για την καταχώριση ανεπεξέργαστων δεδομένων και για υπολογισμούς συνοπτικών στατιστικών στοιχείων. Επιπλέον, παρέχονται πίνακες αναφοράς που είναι χρήσιμοι για την ανακοίνωση συνόψεων με τα δεδομένα των τελικών σημείων. Πίνακες αναφοράς για τις ιστολογικές εκτιμήσεις περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2.

Κριτήρια απόδοσης και αποδοχή/εγκυρότητα δοκιμής

44. Γενικώς, οι μεγάλες αποκλίσεις από τη μέθοδο δοκιμών θα έχουν ως αποτέλεσμα τα δεδομένα να μην είναι αποδεκτά για ερμηνεία ή αναφορά. Για τον σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν τα ακόλουθα κριτήρια που παρατίθενται στον πίνακα 4 ως οδηγός για τον προσδιορισμό της ποιότητας της εκτελεσθείσας δοκιμής και της γενικής απόδοσης των οργανισμών-μαρτύρων.

Πίνακας 4.

Κριτήρια απόδοσης για τη δοκιμασία AMA.

| Κριτήριο | Αποδεκτά όρια |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Συγκεντρώσεις δοκιμής | Διατήρηση σε ≤ 20 % CV (μεταβλητότητα της μετρηθείσας συγκέντρωσης δοκιμής) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής 21 ημερών |
| Θνησιμότητα στους μάρτυρες | ≤ 10 % — η θνησιμότητα των μαρτύρων σε οποιαδήποτε μία επανάληψη δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 2 γυρίνους |
| Ελάχιστο διάμεσο στάδιο ανάπτυξης των μαρτύρων στο τέλος της δοκιμής | 57 |
| Κατανομή του σταδίου ανάπτυξης στην ομάδα-μάρτυρα | Η κατανομή του σταδίου ανάπτυξης μεταξύ του 10 ^{ου} και του 90 ^{ου} εκατοστημορίου δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από 4 στάδια |
| Διαλυμένο οξυγόνο | ≥ 40 % κορεσμός με αέρα (*) |

| Κριτήριο | Αποδεκτά όρια |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH | Το pH θα πρέπει να διατηρείται σε τιμή από 6,5 έως 8,5. Οι διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων/μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν την τιμή 0,5. |
| Θερμοκρασία νερού | $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ — οι διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων/μεταξύ των αγωγών δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τους 0,5 $^{\circ}\text{C}$ |
| Συγκεντρώσεις δοκιμής χωρίς έκδηλη τοξικότητα | ≥ 2 |
| Απόδοση επανάληψης | Επιτρέπεται να υπάρχουν ≤ 2 υποβαθμισμένες επαναλήψεις σε ολόκληρη τη δοκιμή |
| Ειδικές συνθήκες για τη χρήση διαλύτη | Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης ως φορέας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μάρτυρας με διαλύτη και μάρτυρας καθαρού νερού και να αναφέρονται τα αποτελέσματα Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες-μάρτυρες με διαλύτη και ομάδες-μάρτυρες νερού υφίστανται ειδική μεταχείριση. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. παρακάτω |
| Ειδικές συνθήκες για τη χρήση συστήματος στατικής ανανέωσης | Θα πρέπει να αναφέρονται αντιπροσωπευτικές χημικές αναλύσεις πριν από την ανανέωση και μετά από αυτήν Τα επίπεδα αμμωνίας θα πρέπει να μετρώνται αμέσως πριν από την ανανέωση Όλες οι παράμετροι της ποιότητας νερού που παρατίθενται στον πίνακα 1 του προσαρτήματος 1 θα πρέπει να μετρώνται αμέσως πριν από την ανανέωση Η περίοδος ανανέωσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 72 ώρες Κατάλληλο πρόγραμμα σίτισης (το 50 % του ημερήσιου σιτηρεσίου να αποτελείται από εμπορικά διαθέσιμη τροφή για γυρίνους) |

(*) Ο αερισμός του νερού μπορεί να διατηρείται μέσω συσκευής δημιουργίας φυσαλίδων. Συνιστάται η ρύθμιση των συσκευών δημιουργίας φυσαλίδων σε επίπεδα που δεν δημιουργούν αδικαιολόγητη πίεση στους γυρίνους.

Εγκυρότητα δοκιμής

45. Για να κριθεί μια δοκιμή αποδεκτή/έγκυρη, θα πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

Έγκυρο πείραμα σε μια δοκιμή με αρνητική επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς:

- (1) Για οποιαδήποτε αγωγή (συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων), η θνησιμότητα δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει το 10 %. Για οποιαδήποτε επανάληψη, η θνησιμότητα δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει τους τρεις γυρίνους, διαφορετικά η επανάληψη θεωρείται υποβαθμισμένη
- (2) Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον δύο επίπεδα αγωγής και με τις τέσσερις μη υποβαθμισμένες επαναλήψεις.
- (3) Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για ανάλυση τουλάχιστον δύο επίπεδα αγωγής χωρίς έκδηλη τοξικότητα

Έγκυρο πείραμα σε μια δοκιμή με θετική επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς:

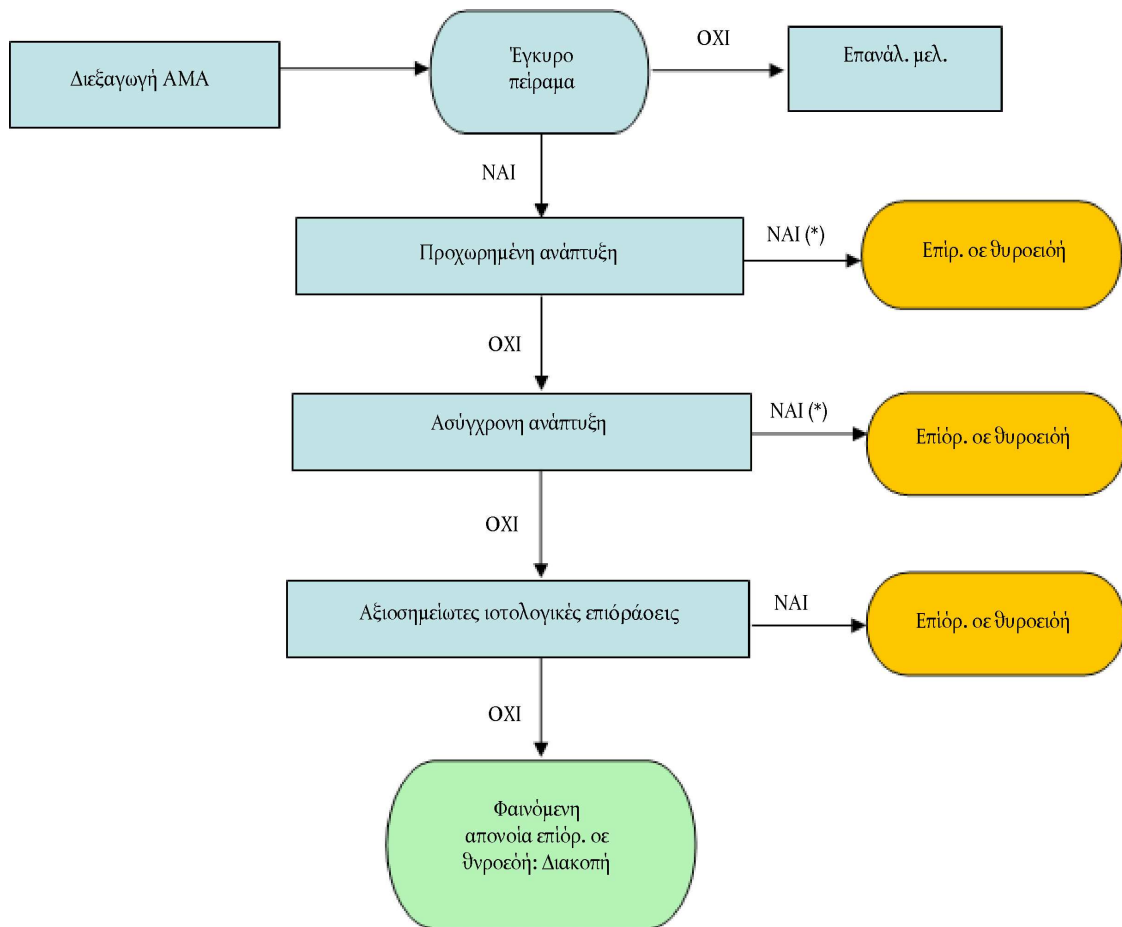
- (1) Μπορεί να προκύψει θνησιμότητα σε έως δύο γυρίνους/επανάληψη στην ομάδα-μάρτυρα

Λογική απόφασης για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας AMA

46. Η λογική της απόφασης για τη δοκιμασία AMA αναπτύχθηκε ώστε να προσφέρει μια λογική βοήθεια όσον αφορά τη διεξαγωγή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμασίας (βλ. διάγραμμα ροής στο σχήμα 3). Η λογική της απόφασης, ουσιαστικά, σταθμίζει τα τελικά σημεία με τρόπο ώστε να δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα στην προχωρημένη ανάπτυξη, την ασύγχρονη ανάπτυξη και την ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς και μικρότερη βαρύτητα στην καθυστερημένη ανάπτυξη, στο μήκος ρύγχους-κλωάκης και στο βάρος υγρού σώματος -παράμετροι που μπορεί ενδεχομένως να επηρεαστούν από τη γενική τοξικότητα.

Σχήμα 3.

Λογική απόφασης για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας AMA.



(*) Μπορεί να απαιτείται ιστολογική εξέταση από ορισμένες ρυθμιστικές αρχές παρά τις σημαντικές διαφορές στην προχωρημένη και την ασύγχρονη ανάπτυξη. Συνιστάται ο φορέας που εκτελεί αυτήν τη δοκιμή να συμβουλευέται τις αρμόδιες αρχές πριν από την εκτέλεση της δοκιμής προκειμένου να προσδιορίσει ποια τελικά σημεία απαιτούνται.

Προχωρημένη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση του σταδίου ανάπτυξης, του μήκους ρύγχους-κλωάκης (SVL) και του μήκους των οπίσθιων άκρων (HLL))

47. Οι μοναδικές γνωστές αιτίες που προκαλούν προχωρημένη ανάπτυξη είναι επιδράσεις που σχετίζονται με τον θυρεοειδή. Αυτές μπορεί να είναι επιδράσεις στον περιφερικό ιστό, όπως άμεση αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών (όπως της T4) ή επιδράσεις που μεταβάλλουν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων θυρεοειδικών ορμονών. Σε κάθε περίπτωση, αυτές οι ενδείξεις αποδεικνύουν επαρκώς ότι η χημική ουσία έχει επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς. Η προχωρημένη ανάπτυξη αξιολογείται με έναν από τους δύο ακόλουθους τρόπους. Πρώτον, το στάδιο γενικής ανάπτυξης μπορεί να αξιολογηθεί με τη χρήση της τυποποιημένης προσέγγισης που περιγράφεται από τους Nieuwkoop και Faber (8). Δεύτερον, μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών, όπως το μήκος των οπίσθιων άκρων, την 7η και την 21η ημέρα, το οποίο σχετίζεται θετικά με αγωνιστικές επιδράσεις στον υποδοχέα των θυρεοειδικών ορμονών. Εάν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές εξελίξεις στην ανάπτυξη ή στο μήκος των οπίσθιων άκρων, η δοκιμή υποδεικνύει ότι η χημική ουσία επιδρά στον θυρεοειδή.
48. Η αξιολόγηση των ζώων δοκιμής όσον αφορά την παρουσία ταχύτερης ανάπτυξης σε σχέση με τον πληθυσμό του μάρτυρα θα βασίζεται στα αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων για τα ακόλουθα τέσσερα τελικά σημεία:
- μήκος οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο ως προς το μήκος ρύγχους-κλωάκης) την 7η ημέρα της μελέτης
 - μήκος οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο ως προς το μήκος ρύγχους-κλωάκης) την 21η ημέρα της μελέτης
 - στάδιο ανάπτυξης την 7η ημέρα της μελέτης
 - στάδιο ανάπτυξης την 21η ημέρα της μελέτης.
49. Η διεξαγωγή των στατιστικών αναλύσεων για το μήκος οπίσθιων άκρων θα πρέπει να βασίζεται σε μετρήσεις του μήκους του αριστερού οπίσθιου άκρου. Για την κανονικοποίηση του μήκους οπίσθιων άκρων λαμβάνεται ο λόγος του μήκους των οπίσθιων άκρων προς το μήκος ρύγχους-κλωάκης ενός ατόμου. Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση του μέσου όρου των κανονικοποιημένων τιμών για κάθε επίπεδο αγωγής. Η επιτάχυνση της ανάπτυξης υποδεικνύεται από μια σημαντική αύξηση του μέσου μήκους οπίσθιων άκρων (κανονικοποιημένο) σε μια ομάδα αγωγής με τη χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα την 7η ημέρα της μελέτης ή/και την 21η ημέρα της μελέτης (βλ. προσάρτημα 3).
50. Οι στατιστικές αναλύσεις του σταδίου ανάπτυξης θα πρέπει να διεξάγονται με βάση τον προσδιορισμό των σταδίων ανάπτυξης σύμφωνα με τα μορφολογικά κριτήρια όπως έχουν περιγραφεί από τους Nieuwkoop και Faber (8). Επιτάχυνση της ανάπτυξης υποδεικνύεται όταν η πολλαπλή ποσοτικοποιημένη ανάλυση εντοπίζει σημαντική αύξηση στις τιμές του σταδίου ανάπτυξης σε μια ομάδα αγωγής με χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα-μάρτυρα την 7η ημέρα της μελέτης ή/και την 21η ημέρα της μελέτης.
51. Στη μέθοδο δοκιμών AMA, μια σημαντική επίδραση σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα τελικά σημεία που αναφέρονται ανωτέρω θεωρείται επαρκής για θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά την ανίχνευση ταχύτερης ανάπτυξης. Με άλλα λόγια, σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο δεν απαιτούν επιβεβαίωση από σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων σε ένα άλλο χρονικό σημείο, ούτε από σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης στο εν λόγω συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Με τη σειρά τους, σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο δεν απαιτούν επιβεβαίωση από σημαντικές επιδράσεις στο στάδιο ανάπτυξης σε ένα άλλο χρονικό σημείο, ούτε από σημαντικές επιδράσεις στο μήκος των οπίσθιων άκρων στο εν λόγω συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Ωστόσο, η βαρύτητα των ενδείξεων ταχύτερης ανάπτυξης θα ενισχύεται εάν ανιχνευτούν σημαντικές επιδράσεις για περισσότερα από ένα τελικά στοιχεία.

Ασύγχρονη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση των κριτηρίων του σταδίου ανάπτυξης)

52. Η ασύγχρονη ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από διατάραξη του σχετικού χρονισμού της μορφογένεσης ή ανάπτυξη διαφορετικών ιστών σε έναν γυρίνο. Η αδυναμία να καθοριστεί με σαφήνεια το στάδιο ανάπτυξης ενός οργανισμού μέσω της ομάδας μορφολογικών τελικών σημείων που θεωρούνται τυπικά ενός οποιουδήποτε δεδομένου σταδίου υποδεικνύει ότι οι ιστοί αναπτύσσονται ασύγχρονα κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης. Η ασύγχρονη ανάπτυξη αποτελεί έναν δείκτη θυρεοειδικής λειτουργίας. Οι μόνοι γνωστοί τρόποι δράσης που προκαλούν ασύγχρονη ανάπτυξη είναι μέσω της επίδρασης χημικών ουσιών στην περιφερική δράση των θυρεοειδικών ορμονών ή/και στον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών σε αναπτυσσόμενους ιστούς, όπως παρατηρείται με τους αναστολείς της αποϊωδίνησης.
53. Η αξιολόγηση των ζώων δοκιμής όσον αφορά την παρουσία ασύγχρονης ανάπτυξης σε σχέση με τον πληθυσμό μαρτύρων θα βασίζεται στη μακροσκοπική μορφολογική εκτίμηση των ζώων δοκιμής την 7η και την 21η ημέρα της μελέτης.
54. Η περιγραφή της φυσιολογικής ανάπτυξης του *Xenopus laevis* από τους Nieuwkoop και Faber (8) παρέχει το πλαίσιο για την αναγνώριση της διαδοχικής σειράς των σταδίων φυσιολογικής ανακατασκευής των ιστών. Ο όρος "ασύγχρονη ανάπτυξη" αναφέρεται ειδικά στις αποκλίσεις που εμφανίζονται στη μακροσκοπική μορφολογική ανάπτυξη των

γυρίων, οι οποίες αποτρέπουν τον σαφή προσδιορισμό ενός σταδίου ανάπτυξης σύμφωνα με τα κριτήρια των Nieuwkoop και Faber (8) επειδή τα βασικά μορφολογικά σημεία αναφοράς εμφανίζουν χαρακτηριστικά διαφορετικών σταδίων.

55. Όπως γίνεται αντιληπτό από τον όρο “ασύγχρονη ανάπτυξη”, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι περιπτώσεις όπου εμφανίζονται αποκλίσεις κατά την εξέλιξη της ανακατασκευής συγκεκριμένων ιστών σε σχέση με την εξέλιξη της ανακατασκευής άλλων ιστών. Ορισμένοι κλασικοί φαινότυποι περιλαμβάνουν την καθυστέρηση ή την απουσία εμφάνισης των εμπρόσθιων άκρων παρά τη φυσιολογική ή προχωρημένη ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων και των ουραίων ιστών, ή την πρόωμη αναρρόφηση των βραγχίων σε σχέση με το στάδιο μορφογένεσης των οπίσθιων άκρων και αναρρόφησης της ουράς. Ένα ζώο θα καταγράφεται ως ζώο που παρουσιάζει ασύγχρονη ανάπτυξη, εάν δεν μπορεί να ταξινομηθεί σε κανένα στάδιο επειδή δεν πληροί την πλειοψηφία των αναπτυξιακών κριτηρίων αναφοράς για ένα συγκεκριμένο στάδιο κατά Nieuwkoop και Faber (8), ή εάν εμφανίζει ακραία καθυστέρηση ή επιτάχυνση σε ένα ή περισσότερα βασικά χαρακτηριστικά (π.χ. πλήρης αναρρόφηση της ουράς αλλά μη εμφάνιση εμπρόσθιων άκρων). Η εκτίμηση αυτή είναι ποιοτική και θα πρέπει να εξετάζει την πλήρη ομάδα των χαρακτηριστικών αναφοράς που παρατίθενται από τους Nieuwkoop και Faber (8). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να καταγράφεται το στάδιο ανάπτυξης των διαφόρων χαρακτηριστικών αναφοράς για τα υπό παρατήρηση ζώα. Τα ζώα που καταγράφονται ως ζώα που εμφανίζουν ασύγχρονη ανάπτυξη δεν ταξινομούνται σε ένα στάδιο ανάπτυξης κατά Nieuwkoop και Faber (8).
56. Συνεπώς, ένα κεντρικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό περιπτώσεων μη φυσιολογικής μορφολογικής ανάπτυξης ως “ασύγχρονης ανάπτυξης” είναι η διατάραξη του σχετικού χρονισμού της ανακατασκευής των ιστών και της μορφογένεσης των ιστών, ενώ η μορφολογία των επηρεασμένων ιστών δεν είναι έκδηλα μη φυσιολογική. Ένα παράδειγμα για να γίνει κατανοητή αυτή η ερμηνεία των μακροσκοπικών μορφολογικών ανωμαλιών είναι ότι η καθυστερημένη μορφογένεση των οπίσθιων άκρων σε σχέση με την ανάπτυξη άλλων ιστών θα πληροί το κριτήριο της “ασύγχρονης ανάπτυξης”, ενώ περιπτώσεις στις οποίες παρουσιάζεται απουσία των οπίσθιων άκρων, μη φυσιολογικός αριθμός δακτύλων (π.χ. εκτοδακτυλία, πολυδακτυλία) ή άλλες έκδηλες δυσμορφίες άκρων δεν θα πρέπει να θεωρούνται περιπτώσεις “ασύγχρονης ανάπτυξης”.
57. Στο πλαίσιο αυτό, τα κύρια μορφολογικά σημεία αναφοράς που θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς τη συντονισμένη εξέλιξή τους κατά τη μεταμόρφωση θα πρέπει να συμπεριλαμβάνουν τη μορφογένεση των οπίσθιων άκρων, τη μορφογένεση των εμπρόσθιων άκρων, την εμφάνιση των εμπρόσθιων άκρων, το στάδιο αναρρόφησης της ουράς (ιδιαίτερα την αναρρόφηση του ουραίου πτερυγίου) και τη μορφολογία κεφαλής (π.χ. μέγεθος βραγχίων και στάδιο αναρρόφησης βραγχίων, μορφολογία κάτω γνάθου, προεκβολή του χόνδρου του Meckel).
58. Ανάλογα με τον τρόπο της χημικής δράσης, μπορεί να προκύψουν διαφορετικοί μακροσκοπικοί μορφολογικοί φαινότυποι. Ορισμένοι κλασικοί φαινότυποι περιλαμβάνουν την καθυστέρηση ή την απουσία εμφάνισης των εμπρόσθιων άκρων παρά τη φυσιολογική ή προχωρημένη ανάπτυξη των οπίσθιων άκρων και των ουραίων ιστών, την πρόωμη αναρρόφηση των βραγχίων σε σχέση με τα οπίσθια άκρα και την ανακατασκευή της ουράς.

Ιστοπαθολογία

59. Εάν η χημική ουσία δεν προκαλεί έκδηλη τοξικότητα και δεν επιταχύνει την ανάπτυξη, ούτε προκαλεί ασύγχρονη ανάπτυξη, η ιστοπαθολογία των θυρεοειδικών αδένων αξιολογείται με τη χρήση του κατάλληλου εγγράφου καθοδήγησης (9). Η αναπτυξιακή καθυστέρηση, απουσία τοξικότητας, αποτελεί ισχυρό δείκτη αντιθυρεοειδικής δράσης, ωστόσο η ανάλυση του σταδίου ανάπτυξης είναι λιγότερο ευαίσθητη και μικρότερης διαγνωστικής αξίας σε σχέση με την ιστοπαθολογική ανάλυση του θυρεοειδούς αδένου. Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση η διεξαγωγή ιστοπαθολογικών αναλύσεων των θυρεοειδών αδένων είναι απαραίτητη. Επιδράσεις στην ιστολογία του θυρεοειδούς αδένου έχουν καταδειχθεί απουσία επιδράσεων στην ανάπτυξη. Εάν προκύψουν αλλαγές στην ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς, η χημική ουσία θεωρείται ότι έχει επίδραση στον θυρεοειδή. Εάν δεν παρατηρηθούν καθυστερήσεις στην ανάπτυξη ή ιστολογικές βλάβες στους θυρεοειδείς αδένες, η χημική ουσία θεωρείται ότι δεν έχει επίδραση στον θυρεοειδή. Το σκεπτικό για αυτήν την απόφαση είναι ότι ο θυρεοειδής αδένος βρίσκεται υπό την επίδραση της TSH και κάθε χημική ουσία η οποία μεταβάλλει την κυκλοφορούσα θυρεοειδική ορμόνη αρκετά ώστε να μεταβάλλει την έκκριση της TSH θα έχει ως αποτέλεσμα ιστοπαθολογικές αλλαγές στους θυρεοειδείς αδένες. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι και μηχανισμοί δράσης που μπορούν να μεταβάλλουν την κυκλοφορούσα θυρεοειδική ορμόνη. Επομένως, ενώ το επίπεδο της θυρεοειδικής ορμόνης είναι ενδεικτικό μιας επίδρασης που σχετίζεται με τον θυρεοειδή, δεν επαρκεί για να προσδιοριστεί ποιος τρόπος ή μηχανισμός δράσης σχετίζεται με την απόκριση.
60. Επειδή αυτό το τελικό σημείο δεν είναι δυνατό να αναλυθεί με τις βασικές στατιστικές προσεγγίσεις, ο προσδιορισμός μιας επίδρασης που σχετίζεται με την έκθεση σε μια χημική ουσία θα πρέπει να γίνεται βάσει της εμπειρογνωμοσύνης ενός παθολογοανατόμου.

Καθυστερημένη ανάπτυξη (που προσδιορίζεται με τη χρήση του σταδίου ανάπτυξης, του μήκους οπίσθιων άκρων (HLL), του σωματικού βάρους (BW) και του μήκους ρύγχους-κλωάκης (SVL))

61. Καθυστερημένη ανάπτυξη μπορεί να προκύψει μέσω αντιθυρεοειδικών μηχανισμών και έμμεσης τοξικότητας. Μικρές καθυστερήσεις στην ανάπτυξη σε συνδυασμό με έκδηλες ενδείξεις τοξικότητας είναι πιθανόν να υποδεικνύουν μη συγκεκριμένη τοξική επίδραση. Η αξιολόγηση της μη θυρεοειδικής τοξικότητας αποτελεί σημαντικό παράγοντα της

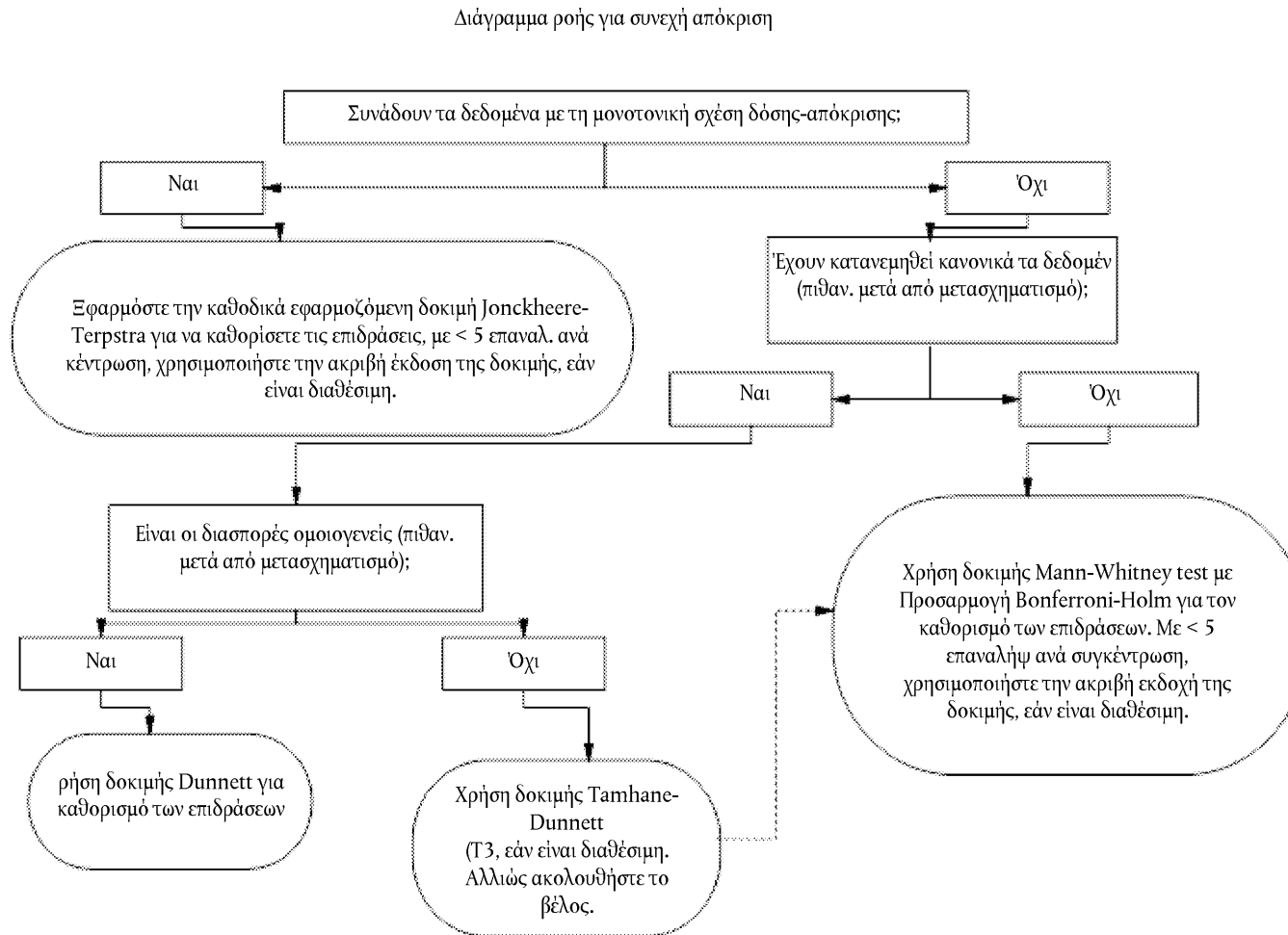
δοκιμής για τη μείωση της πιθανότητας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Η υπερβολική θνησιμότητα αποτελεί προφανή ένδειξη της παρουσίας και άλλων τοξικών μηχανισμών. Παρομοίως, μικρές μειώσεις στην ανάπτυξη, όπως προσδιορίζονται από το υγρό βάρος ή/και το μήκος ρύγχους-κλωάκης, επίσης υποδηλώνουν μη θυρεοειδική τοξικότητα. Εμφανείς αυξήσεις στην ανάπτυξη παρατηρούνται συχνά με χημικές ουσίες που επηρεάζουν αρνητικά τη φυσιολογική ανάπτυξη. Κατά συνέπεια, η παρουσία μεγαλύτερων ζώων δεν αποτελεί απαραίτητως ένδειξη μη θυρεοειδικής τοξικότητας. Η ανάπτυξη, ωστόσο, δεν θα πρέπει ποτέ να είναι το αποκλειστικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της θυρεοειδικής τοξικότητας. Αντίθετα, για τον προσδιορισμό της λειτουργίας του θυρεοειδούς θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ανάπτυξη, σε συνδυασμό με το στάδιο ανάπτυξης και την ιστοπαθολογία του θυρεοειδούς. Θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιούνται και άλλα τελικά σημεία για τον προσδιορισμό έκδηλης τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του οιδήματος, των αιμορραγικών βλαβών, του λήθαργου, της μειωμένης κατανάλωσης τροφής, της ασταθούς/τροποποιημένης συμπεριφοράς κολύμβησης κ.λπ. Εάν σε όλες τις συγκεντρώσεις της δοκιμής παρουσιάζονται ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας, θα πρέπει να γίνεται επαναξιολόγηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής προτού προσδιοριστεί εάν η χημική ουσία ασκεί δυνητικά επίδραση στον θυρεοειδή ή όχι.

62. Στατιστικά σημαντικές καθυστερήσεις στην ανάπτυξη, απουσία άλλων ενδείξεων έκδηλης τοξικότητας, υποδεικνύουν ότι η χημική ουσία επιδρά στον θυρεοειδή (ανταγωνιστικά). Απουσία ισχυρών στατιστικών στοιχείων, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να ενισχυθεί με τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης του θυρεοειδούς.

Στατιστικές αναλύσεις

63. Για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων θα πρέπει, κατά προτίμηση, να ακολουθούνται οι διαδικασίες που περιγράφονται στο έγγραφο *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικολογικής τοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (11). Για όλα τα συνεχή ποσοτικά τελικά σημεία (μήκος οπίσθιων άκρων, μήκος ρύγχους-κλωάκης, υγρό βάρος) που είναι συμβατά με μια μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να εφαρμόζεται καθοδικά η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra προκειμένου να καθοριστεί μια σημαντική επίδραση της αγωγής.
64. Για συνεχή τελικά σημεία που δεν είναι συμβατά με μια μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, τα δεδομένα θα πρέπει να αξιολογούνται ως προς την κανονικότητα (κατά προτίμηση με τη χρήση της δοκιμασίας Shapiro-Wilk ή Anderson-Darling) και την ομοιογένεια της διασποράς (κατά προτίμηση με τη χρήση της δοκιμασίας Levene). Και οι δύο δοκιμασίες εφαρμόζονται στα κατάλοιπα της ανάλυσης ANOVA. Η γνώμη ενός ειδικού μπορεί να αντικαταστήσει αυτές τις επίσημες δοκιμασίες όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια της διασποράς, ωστόσο προτιμάται η διεξαγωγή επίσημων δοκιμασιών. Στις περιπτώσεις όπου εντοπίζεται μη κανονικότητα ή ανομοιογένεια της διασποράς, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας μετασχηματισμός κανονικοποίησης για τη σταθεροποίηση της διασποράς. Εάν τα δεδομένα (πιθανώς μετά τον μετασχηματισμό) κατανέμονται κανονικά με ομοιογενή διασπορά, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής πραγματοποιείται με τη δοκιμασία Dunnett. Εάν τα δεδομένα (πιθανώς μετά τον μετασχηματισμό) κατανέμονται κανονικά με ετερογενή διασπορά, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής πραγματοποιείται με τη δοκιμασία Tamhane-Dunnett ή T3 ή με τη δοκιμασία Mann-Whitney-Wilcoxon U. Στις περιπτώσεις όπου δεν εντοπίζεται μετασχηματισμός κανονικοποίησης, ο καθορισμός σημαντικής επίδρασης της αγωγής γίνεται με τη δοκιμασία Mann-Whitney-Wilcoxon U με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Η δοκιμασία Dunnett εφαρμόζεται ανεξάρτητα από κάθε δοκιμασία F ANOVA, ενώ η δοκιμασία Mann-Whitney εφαρμόζεται ανεξάρτητα από κάθε συνολική δοκιμασία Kruskal-Wallis.
65. Σημαντική θνησιμότητα δεν αναμένεται, ωστόσο θα πρέπει να αξιολογείται με τη δοκιμασία Cochran-Armitage εφαρμοζόμενη καθοδικά όταν τα δεδομένα συμφωνούν με μονοτονικότητα της σχέσης δόσης-απόκρισης, ή σε άλλη περίπτωση με τη δοκιμασία Fisher's Exact με διόρθωση τιμών κατά Bonferroni-Holm.
66. Μια σημαντική επίδραση της αγωγής για το στάδιο ανάπτυξης καθορίζεται από την εφαρμογή καθοδικά της δοκιμασίας Jonckheere-Terpstra στις διάμεσες τιμές επανάλιψεων. Εναλλακτικά και κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η πολλαπλή ποσοτική δοκιμασία Jonckheere μεταξύ του 20^{ου} και του 80^{ου} εκατοστημορίου για τον καθορισμό της επίδρασης, επειδή λαμβάνονται υπόψη αλλαγές στο προφίλ κατανομής.
67. Η κατάλληλη μονάδα ανάλυσης είναι η επανάληψη, οπότε τα δεδομένα αποτελούνται από τις διάμεσες τιμές των επανάλιψεων εάν χρησιμοποιείται η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra ή Mann-Whitney U, ή από τις μέσες τιμές των επανάλιψεων εάν χρησιμοποιείται η δοκιμασία Dunnett. Η μονοτονικότητα της σχέσης δόσης-απόκρισης μπορεί να αξιολογείται οπτικά από τις μέσες ή διάμεσες τιμές της επανάλιψης και της αγωγής ή από επίσημες δοκιμασίες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (11). Με λιγότερες από πέντε επανάλιψεις ανά αγωγή ή μάρτυρα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ακριβείς παραλλαγές μετάθεσης των δοκιμασιών Jonckheere-Terpstra και Mann-Whitney, εάν διατίθενται. Η στατιστική σημαντικότητα όλων των δοκιμασιών που υποδεικνύονται εξετάζεται σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.
68. Στο σχήμα 4 παρατίθεται ένα διάγραμμα ροής για τη διεξαγωγή στατιστικών δοκιμασιών σε συνεχή δεδομένα.

Διάγραμμα ροής στατιστικών προσεγγίσεων για συνεχή δεδομένα απόκρισης.



Ειδικά θέματα για την ανάλυση δεδομένων*Χρήση υποβαθμισμένων επιπέδων αγωγής*

69. Ορισμένοι παράγοντες λαμβάνονται υπόψη προκειμένου να καθοριστεί εάν μια επανάληψη ή μια ολόκληρη αγωγή παρουσιάζει έκδηλη τοξικότητα και θα πρέπει να εξαιρεθεί από την ανάλυση. Η έκδηλη τοξικότητα ορίζεται ως > 2 θνησιμότητες σε οποιαδήποτε επανάληψη που μπορούν να εξεξηγηθούν μόνο από την παρουσία τοξικότητας και όχι λόγω τεχνικού σφάλματος. Άλλες ενδείξεις έκδηλης τοξικότητας περιλαμβάνουν την αιμορραγία, μη φυσιολογικές συμπεριφορές, μη φυσιολογικούς τρόπους κολύμβησης, ανορεξία και άλλες κλινικές ενδείξεις ασθένειας. Για υποθανατηφόρες ενδείξεις τοξικότητας, ενδέχεται να είναι απαραίτητες ποιοτικές αξιολογήσεις, οι οποίες θα πρέπει πάντα να πραγματοποιούνται σε συνάρτηση με την ομάδα-μάρτυρα καθαρού νερού.

Μάρτυρες με διαλύτη

70. Το ενδεχόμενο χρήσης διαλύτη θα πρέπει να εξετάζεται μόνο ως έσχατη λύση, αφού έχει εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης όλων των άλλων επιλογών χορήγησης χημικών ουσιών. Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν μάρτυρα καθαρού νερού. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να αξιολογούνται οι πιθανές επιδράσεις του διαλύτη. Αυτό πραγματοποιείται μέσω στατιστικής σύγκρισης της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη και της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού. Τα πιο σχετικά τελικά σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε αυτήν την ανάλυση είναι το στάδιο ανάπτυξης, το μήκος ρύγχους-κλοάκης και το υγρό βάρος, επειδή αυτά μπορούν να επηρεαστούν μέσω μη θυρεοειδικών τοξικοτήτων. Εάν εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές για αυτά τα τελικά σημεία μεταξύ της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού και της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη, θα πρέπει να καθοριστούν τα τελικά σημεία της μελέτης για τις μετρήσεις της απόκρισης με τη χρήση του μάρτυρα καθαρού νερού. Εάν δεν εντοπιστεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας-μάρτυρα καθαρού νερού και της ομάδας-μάρτυρα με διαλύτη για όλες τις μετρηθείσες μεταβλητές απόκρισης, θα πρέπει να καθοριστούν τα τελικά σημεία της μελέτης για τις μετρήσεις της απόκρισης με τη χρήση συνενωμένων μαρτύρων νερού αραιώσης και μαρτύρων με διαλύτη.

Ομάδες αγωγής στις οποίες επιτυγχάνεται στάδιο ανάπτυξης 60 και άνω

71. Μετά το στάδιο 60, οι γυρίνοι εμφανίζουν μείωση μεγέθους και βάρους εξαιτίας αναρρόφησης ιστού και μείωσης της απόλυτης περιεκτικότητας σε νερό. Συνεπώς, οι μετρήσεις του υγρού βάρους και του μήκους ρύγχους-κλοάκης δεν είναι κατάλληλες για εφαρμογή σε στατιστικές αναλύσεις για διαφορές στους ρυθμούς ανάπτυξης. Επομένως, το υγρό βάρος και τα δεδομένα μήκους από οργανισμούς $>$ σταδίου 60 κατά NF θα πρέπει να αποκλείονται και δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις των μέσων τιμών επαναλήψεων ή των διάμεσων τιμών επαναλήψεων. Για την ανάλυση αυτών των παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις.
72. Η μία προσέγγιση είναι να λαμβάνονται υπόψη μόνο οι γυρίνοι σταδίων ανάπτυξης κατώτερων ή ίσων με το στάδιο 60 για τις στατιστικές αναλύσεις του υγρού βάρους ή/και του μήκους ρύγχους-κλοάκης. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται ότι παρέχει επαρκώς έγκυρες πληροφορίες σχετικά με τη σοβαρότητα των δυνητικών επιδράσεων στην ανάπτυξη, με την προϋπόθεση ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των ζώων δοκιμής απομακρύνεται από τις αναλύσεις ($\leq 20\%$). Εάν ένας αυξημένος αριθμός γυρίνων παρουσιάζει ανάπτυξη πέρα από το στάδιο 60 ($\geq 20\%$) σε μία ή περισσότερες ονομαστικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να εφαρμόζεται ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή διασποράς σε όλους τους γυρίνους ώστε να εκτιμώνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη εξαιτίας της αγωγής με χημικές ουσίες, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη και την επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων. Στο προσάρτημα 3 παρέχεται καθοδήγηση για την ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων, βάρους και μήκους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Ap. 77. Παρίσι.
- (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. Ap. 76. Παρίσι
- (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. Ap. 92. Παρίσι
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Ap. 23. Παρίσι

- (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), Φιλαδέλφεια, 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. και Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, σελ. 539-551
 - (8) Nieuwkoop, P.D. και Faber, J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, Νέα Υόρκη
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Ap. 82. Παρίσι
 - (10) Dodd, M.H.I. και Dodd, J.M. (1976) *Physiology of Amphibia*. Lofts, B. (εκδ.), Academic Press, Νέα Υόρκη, σελ. 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, Ap. 54. Παρίσι
 - (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, σελ.69–92.
-

Προσάρτημα 1

Πίνακας 1

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμασία μεταμόρφωσης αμφιβίων 21 ημερών

| | | |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Ζώο δοκιμής | Προνύμφες του <i>Xenopus laevis</i> | |
| Αρχικό προνυμφικό στάδιο | Στάδιο 51 κατά Nieuwkoop και Faber | |
| Περίοδος έκθεσης | 21 ημέρες | |
| Κριτήρια επιλογής προνυμφών | Στάδιο ανάπτυξης και συνολικό μήκος (προαιρετικά) | |
| Συγκεντρώσεις δοκιμής | Τουλάχιστον 3 συγκεντρώσεις που καλύπτουν περίπου μία τάξη μεγέθους | |
| Πρόγραμμα έκθεσης | Συνεχής ροή νερού (προτιμάται) ή/και στατική ανανέωση | |
| Ταχύτητα ροής συστήματος δοκιμής | 25 ml/λεπτό (πλήρης αντικατάσταση του όγκου περίπου κάθε 2,7 ώρες) | |
| Πρωτεύοντα τελικά σημεία / Ημέρες προσδιορισμού | Θνησιμότητα | Καθημερινά |
| | Στάδιο ανάπτυξης | Ημ. 7 και 21 |
| | Μήκος οπίσθιων άκρων | Ημ. 7 και 21 |
| | Μήκος ρύγχους-κλοάκης | Ημ. 7 και 21 |
| | Υγρό σωματικό βάρος | Ημ. 7 και 21 |
| | Ιστολογία θυρεοειδούς | Ημ. 21 |
| Νερό αραίωσης / Εργαστηριακός μάρτυρας | Αποχλωρωμένο νερό βρύσης (φιλτραρισμένο με άνθρακα) ή η ισοδύναμη εργαστηριακή πηγή | |
| Πυκνότητα προνυμφών | 20 προνύμφες / δοχείο δοκιμής (5 / λίτρο) | |
| Διάλυμα δοκιμής / Δοχείο δοκιμής | 4-10 l (10-15 cm νερό τουλάχιστον) / Δοχείο δοκιμής από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα (π.χ. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm) | |
| Επανάληψη | 4 δοχεία δοκιμής επανάληψης / συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρα | |
| Αποδεκτό ποσοστό θνησιμότητας στους μάρτυρες | ≤ 10 % ανά δοχείο δοκιμής επανάληψης | |
| Μονιμοποίηση θυρεοειδούς | Αριθμός μονιμοποιημένων | Όλοι οι γυρίνοι (αρχικά αξιολογούνται 5/επανάληψη) |
| | Περιοχή | Κεφαλή ή ολόκληρο το σώμα |
| | Υγρό μονιμοποίησης | Μονιμοποιητικό υγρό του Davidson |

| | | |
|--------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Σίτιση | Τροφή | Sera Micron [®] ή ισοδύναμη |
| | Ποσότητα / Συχνότητα | Για το καθεστώς σίτισης με τη χρήση τροφής Sera Micron [®] , βλ. πίνακα 1 |
| Φωτισμός | Φωτοπερίοδος | 12 ώρες φως: 12 ώρες σκοτάδι |
| | Ένταση | 600 έως 2 000 lux (μέτρηση στην επιφάνεια του νερού) |
| Θερμοκρασία νερού | | 22° ± 1 °C |
| pH | | 6,5-8,5 |
| Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) | | > 3,5 mg/l (> 40 % κορεσμός με αέρα) |
| Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας για χημική ανάλυση | | Μία φορά / εβδομάδα (4 δείγματα / δοκιμή) |

Προσάρτημα 2

Πίνακές αναφοράς για ανεπεξέργαστα δεδομένα και συνοπτικά δεδομένα

Πίνακας 1

Γενικές πληροφορίες για την υπό δοκιμή χημική ουσία

| Πληροφορίες για τη χημική ουσία | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------|
| Εισαγάγετε την υπό δοκιμή χημική ουσία, τις μονάδες συγκέντρωσης και τις αγωγές | | |
| Υπό δοκιμή χημική ουσία: | | |
| Μονάδες συγκέντρωσης: | | |
| Αγωγή 1 | | |
| Αγωγή 2 | | |
| Αγωγή 3 | | |
| Αγωγή 4 | | |
| | | |
| Ημερομηνία (ημέρα 0): | | Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε) |
| Ημερομηνία (ημέρα 7): | | Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε) |
| Ημερομηνία (ημέρα 21): | | Εισαγάγετε ημερομηνία (μμ/ηη/εε) |

Πίνακας 2

Φύλλα συλλογής ανεπεξέργαστων δεδομένων για την 7η και 21η ημέρα

ΗΜΕΡΑ X

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ 00/00/00

| | Συγκέντρωση | Αριθμός αγωγής | Αριθμός επανάληψης | Αριθμός ατόμου | Αναγνωριστικό ατόμου | Στάδιο ανάπτυξης | Μήκος SVL (mm) | Μήκος οπίσθιων άκρων (mm) | Υγρό βάρος ολόκληρου του οργανισμού (mg) |
|-------|-------------|----------------|--------------------|----------------|----------------------|------------------|----------------|---------------------------|------------------------------------------|
| ΣΕΙΡΑ | ΑΓΩΓ | ΑΡ. ΑΓΩΓ | ΕΠΑΝΑ | ΑΤΟΜ | ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ | ΣΤΑΔΙΟ | ΜΗΚ. ΣΩΜ. | HLL | ΒΑΡΟΣ |
| 1 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 2 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 3 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 4 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 5 | 0,00 | 1 | | | | | | | |

| | Συγκέν- τρωση | Αριθμός αγωγής | Αριθμός επανάλη- ψης | Αριθμός ατόμου | Αναγνωρι- στικό ατό- μου | Στάδιο ανάπτυξης | Μήκος SVL (mm) | Μήκος οπί- σθιων άκρων (mm) | Υγρό βά- ρος ολό- κληρου του οργα- νισμού (mg) |
|-------|------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ΣΕΙΡΑ | ΑΓΩΓ | ΑΡ. ΑΓΩΓ | ΕΠΑΝΑ | ΑΤΟΜ | ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ | ΣΤΑΔΙΟ | ΜΗΚ. ΣΩΜ. | HLL | ΒΑΡΟΣ |
| 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 | | | | | | | |

| | Συγκέν- τρωση | Αριθμός αγωγής | Αριθμός επανάλη- ψης | Αριθμός ατόμου | Αναγνωρι- στικό ατό- μου | Στάδιο ανάπτυξης | Μήκος SVL (mm) | Μήκος οπί- σθιων άκρων (mm) | Υγρό βά- ρος ολό- κληρου του οργα- νισμού (mg) |
|-------|------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ΣΕΙΡΑ | ΑΓΩΓ | ΑΡ. ΑΓΩΓ | ΕΠΑΝΑ | ΑΤΟΜ | ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ | ΣΤΑΔΙΟ | ΜΗΚ. ΣΩΜ. | HLL | ΒΑΡΟΣ |
| 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 | | | | | | | |

| | Συγκέν- τρωση | Αριθμός αγωγής | Αριθμός επανάλη- ψης | Αριθμός ατόμου | Αναγνωρι- στικό ατό- μου | Στάδιο ανάπτυξης | Μήκος SVL (mm) | Μήκος οπί- σθιων άκρων (mm) | Υγρό βά- ρος ολό- κληρου του οργα- νισμού (mg) |
|-------|------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ΣΕΙΡΑ | ΑΓΩΓ | ΑΡ. ΑΓΩΓ | ΕΠΑΝΑ | ΑΤΟΜ | ΑΝΑΓΝ. ΑΤΟΜ | ΣΤΑΔΙΟ | ΜΗΚ. ΣΩΜ. | HLL | ΒΑΡΟΣ |
| 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 | | | | | | | |

Πίνακας 3

Υπολογισμένα συνοπτικά στοιχεία για δεδομένα τελικών σημείων από την 7η και την 21η ημέρα

| ΑΓΩΓ | ΕΠΑΝΑ | Στάδιο ανάπτυξης | | | SVL (mm) | | Μήκος οπίσθιων άκρων (mm) | | Βάρος (mg) | |
|------|-------|------------------|---------|-----|----------|-----------|---------------------------|-----------|------------|-----------|
| | | ΕΛΑΧ | ΔΙΑΜΕΣΟ | ΜΕΓ | ΜΕΣΟ | ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ | ΜΕΣΟ | ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ | ΜΕΣΟ | ΤΥΠ ΑΠΟΚΛ |
| 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! |

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 2.

Πίνακας 4

Δεδομένα καθημερινής θνησιμότητας

| Ημέρα δοκιμής | Ημερομηνία | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 00/00/00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αριθμός επαναλήψεων | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Αριθμός αγωγών | | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | |

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 1.

Χημική ονομασία:

Αρ. Cas:

| Ημέρα δοκιμής | Ημερομηνία | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Σημείωση: Οι υπολογισμοί κελιών σχετίζονται με τις καταχωρίσεις των δεδομένων στον πίνακα 1.

Πίνακας 7

Πίνακες αναφοράς ιστοπαθολογίας για βασικά κριτήρια

Ημερομηνία:

Χημική ουσία:

Παθολογοανατόμος:

| Αναγνωριστικό ζώου - επανάληψη 1 | Αναγνωριστικό ζώου - επανάληψη 2 | Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα | Ατροφία θυρεοειδούς αδένα | Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων | Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Σύνολο: | | | | | |

| Αναγνωριστικό ζώου - επανάληψη 1 | Αναγνωριστικό ζώου - επανάληψη 2 | Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα | Ατροφία θυρεοειδούς αδένα | Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων | Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Σύνολο: | | | | | |

| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 1 | Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 2 | Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα | Ατροφία θυρεοειδούς αδένα | Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων | Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Σύνολο: | | | | | |

| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 1 | Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 2 | Υπερτροφία θυρεοειδούς αδένα | Ατροφία θυρεοειδούς αδένα | Υπερτροφία θυλακικών κυττάρων | Υπερπλασία θυλακικών κυττάρων |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Σύνολο: | | | | | |

Πίνακας 8

Πρόσθετα κριτήρια ιστοπαθολογίας

Ημερομηνία:

Χημική ουσία:

Παθολογοανατόμος:

| | | Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού | Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού |
|---------------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα — επανάληψη 1 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα — επανάληψη 2 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Σύνολο: | | | |

| | | Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού | Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού |
|-------------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 1 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 2 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Σύνολο: | | | |

| | | Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού | Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού |
|-------------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 1 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 2 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Σύνολο: | | | |

| | | Αύξηση περιοχής θυλακικού αυλού | Μείωση περιοχής θυλακικού αυλού |
|-------------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 1 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου — επανάληψη 2 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Σύνολο: | | | |

Πίνακας 9

Λεπτομερείς περιγραφές ιστοπαθολογικών ευρημάτων

Ημερομηνία:

Χημική ουσία:

Παθολογοανατόμος:

Λεπτομερής περιγραφή

| | | |
|---------------------------------------------|--|--|
| Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα - επανάληψη 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό ζώου μάρτυρα - επανάληψη 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανάληψη 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

| | | |
|-------------------------------------------|--|--|
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανδληψη 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανδληψη 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανδληψη 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| Αναγνωριστικό δόσης ζώου - επανδληψη 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Πρότυπο συνοπτικού πίνακα αναφοράς για την ημέρα × (7η ή 21η) της δοκιμασίας AMA

| Τελικό σημείο | Επανά- ληψη | Μάρτυρας | | | | Δόση 1 | | | | | Δόση 2 | | | | | Δόση 3 | | | | |
|---------------------------------------------|----------------|--------------|----|----|---|--------------|----|----|---|--------|--------------|----|----|---|--------|--------------|----|----|---|--------|
| | | Μέση τιμή | SD | CV | N | Μέση τιμή | SD | CV | N | Τιμή p | Μέση τιμή | SD | CV | N | Τιμή p | Μέση τιμή | SD | CV | N | Τιμή p |
| Μήκος οπί- σθιων άκρων (mm) | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Μέση τιμή: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Μήκος ρύγ- χους-κλωάκης (mm) | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Μέση τιμή: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Υγρό βάρος (mg) | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Μέση τιμή: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Πίνακας 11

Πρότυπο συνοπτικού πίνακα αναφοράς για τα δεδομένα σταδίου ανάπτυξης της ημέρας × (7η ή 21η) της δοκιμασίας AMA

| | Επανά- ληψη | Μάρτυρας | | | | Δόση 1 | | | | | Δόση 2 | | | | | Δόση 3 | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------|------|-----|---|-----------------|------|-----|---|--------|-----------------|------|-----|---|--------|-----------------|------|-----|-----------------|--------|
| | | Διάμεση τιμή | Ελάχ | Μέγ | N | Διάμεση τιμή | Ελάχ | Μέγ | N | Τιμή p | Διάμεση τιμή | Ελάχ | Μέγ | N | Τιμή p | Διάμεση τιμή | Ελάχ | Μέγ | Διάμεση τιμή | Τιμή p |
| Στάδιο ανά- πτυξης | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Μέση τιμή: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Προσάρτημα 3

Εναλλακτική ανάλυση βάρους και μήκους στην περίπτωση ανάπτυξης προχωρημένου Σταδίου σε ποσοστό άνω του 20 % των γυρίνων σε μια ή περισσότερες συγκεντρώσεις

Εάν ένας αυξημένος αριθμός γυρίνων παρουσιάζει ανάπτυξη πέρα από το στάδιο 60 (≥ 20 %) σε μία ή περισσότερες ονομαστικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να εφαρμόζεται ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή διασποράς σε όλους τους γυρίνους ώστε να εκτιμώνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη εξαιτίας της αγωγής με χημικές ουσίες, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη και την επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων.

Η πρόταση συνιστά να χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα αλλά να λαμβάνεται υπόψη η επίδραση της ανάπτυξης προχωρημένων σταδίων. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με φωλιασμένη (εγκλωβισμένη) δομή. Καθορίστε LateStage = 'Yes' (Προχωρημένο στάδιο=Ναι) για ένα ζώο, εάν βρίσκεται στο στάδιο ανάπτυξης 61 ή άνω. Διαφορετικά, καθορίστε LateStage = 'No' (Προχωρημένο στάδιο=Όχι). Στη συνέχεια, μπορεί να εφαρμοστεί ανάλυση ANOVA δύο παραγόντων με τη συκέντρωση και το προχωρημένο στάδιο, και να γίνει η αλληλεπίδρασή τους, όπου το Rep(Conc) (Επαν. (Συγκ.)) θα είναι ένας τυχαίος παράγοντας και το Tadpole(Rep) (Γυρίνος (Επαν.)) θα είναι μια άλλη τυχαία επίδραση. Με αυτόν τον τρόπο, το rep (επανάληψη) εξακολουθεί να λαμβάνεται υπόψη ως μονάδα ανάλυσης και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι ουσιαστικά ίδια με τη σταθμισμένη ανάλυση της μέσης τιμής $rep * latestage$ (επανάληψη*προχωρημένο στάδιο), σταθμισμένης ως προς τον αριθμό των ζώων ανά μέση τιμή. Εάν τα δεδομένα παραβιάζουν τις απαιτήσεις κανονικότητας ή ομοιογένειας της διασποράς της ανάλυσης ANOVA, μπορεί να πραγματοποιηθεί κανονικοποιημένος μετασχηματισμός κατάταξης για την απομάκρυνση αυτού του περιορισμού.

Επιπλέον των τυπικών δοκιμασιών F της ANOVA για τον έλεγχο των επιδράσεων των Conc (Συγκέντρωση), LateStage (Προχωρημένο στάδιο) και των αλληλεπιδράσεων αυτών, η δοκιμασία F αλληλεπίδρασης μπορεί να "διαχωριστεί" σε δύο επιπρόσθετες δοκιμασίες F της ANOVA, μία για τις μέσες αποκρίσεις σε όλες τις συγκεντρώσεις για LateStage = 'No' (Προχωρημένο στάδιο=Όχι) και μία άλλη για τις μέσες αποκρίσεις σε όλες τις συγκεντρώσεις για LateStage = 'Yes' (Προχωρημένο στάδιο=Ναι). Περαιτέρω συγκρίσεις για τις μέσες τιμές των αγωγών έναντι του μάρτυρα διεξάγονται εντός κάθε επιπέδου του LateStage (Προχωρημένο στάδιο). Μπορεί να εφαρμοστεί μια ανάλυση τύπου τάσεων με τη χρήση κατάλληλων αντιθέσεων ή μπορούν να πραγματοποιηθούν απλές συγκρίσεις με ζεύγη εάν υπάρχουν ενδείξεις μη μονοτονικής σχέσης δόσης-απόκρισης εντός ενός επιπέδου της μεταβλητής LateStage (Προχωρημένο στάδιο). Διόρθωση κατά Bonferroni-Holm στις τιμές p πραγματοποιείται μόνο εάν η αντίστοιχη τομή F δεν είναι σημαντική. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με το SAS και, πιθανόν, με άλλα στατιστικά πακέτα λογισμικού. Μπορεί να προκύψουν επιπλοκές όταν δεν υπάρχουν ζώα προχωρημένης ανάπτυξης σε μερικές συγκεντρώσεις, ωστόσο οι περιπτώσεις αυτές μπορούν να αντιμετωπιστούν με απλό τρόπο.

*Προσάρτημα 4***Ορισμοί**

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα

Υπό δοκιμή χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών

Γ.39. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΟΛΛΕΜΒΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 232 του ΟΟΣΑ (2009). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι σχεδιασμένη για την εκτίμηση των επιδράσεων χημικών ουσιών στην αναπαραγωγική απόδοση των κολλεμβόλων στο έδαφος. Βασίζεται σε υφιστάμενες διαδικασίες (1) (2). Το *Folsomia candida* που αναπαράγεται με παρθενογένεση και το *Folsomia fimetaria* που αναπαράγεται σεξουαλικά είναι δύο από τα πιο προσιτά είδη κολλεμβόλων και είναι καλλιεργήσιμα και διαθέσιμα στην αγορά. Όταν χρειάζεται να γίνει εκτίμηση ειδικών οικοτόπων στους οποίους δεν διαβιώνουν αυτά τα δύο είδη, η διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα είδη κολλεμβόλων, εάν πληρούν τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής.
2. Τα κολλέμβολα που διαβιούν στο έδαφος είναι κατάλληλα είδη από οικολογικής άποψης για οικοτοξικολογικές δοκιμές. Τα κολλέμβολα είναι εξάποδα με λεπτό εξωσκελετό που παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα από τον αέρα και το νερό, τα οποία αντιπροσωπεύουν είδη αρθροπόδων με διαφορετική οδό και διαφορετικό ρυθμό έκθεσης σε σύγκριση με τους γαιοσκώληκες και τους λευκοσκώληκες.
3. Σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα, οι πυκνότητες πληθυσμών των κολλεμβόλων συχνά φθάνουν την τιμή 10^5 m^{-2} στο έδαφος και στην απορριμματική στιβάδα (3) (4). Το μέγεθος των ενήλικων ατόμων, κατά κανόνα, κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 5 mm, ενώ η συνεισφορά τους στην ολική ζωική βιομάζα του εδάφους και στον ρυθμό αναπνοής βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα που εκτιμώνται μεταξύ 1 % και 5 % (5). Επομένως, ο σημαντικότερος ρόλος τους ενδεχομένως είναι η δυναμική ρύθμιση διαδικασιών μέσω της θηρευτικής τους δράσης σε μικροοργανισμούς και στη μικροχλωρίδα. Τα κολλέμβολα αποτελούν θηράματα για ένα ευρύ φάσμα ενδόγειων και επίγειων ασπόνδυλων, όπως ακάρεα, χιλιόποδα, αράχνες, εδαφικά κολεόπτερα της οικογένειας Carabidae και κανθάρους της οικογένειας Staphylinidae. Τα κολλέμβολα συνεισφέρουν στις διαδικασίες αποσύνθεσης σε όξινα εδάφη, όπου ενδέχεται να είναι τα σημαντικότερα ασπόνδυλα εδάφους εκτός από τους λευκοσκώληκες, καθώς, κατά κανόνα, στα εδάφη αυτά δεν υπάρχουν γαιοσκώληκες και διπλόποδα.
4. Το είδος *F. fimetaria* απαντάται σε ολόκληρο τον κόσμο και αποτελεί κοινό είδος σε αρκετούς τύπους εδαφών, από αμμώδη έως αργιλόδη εδάφη και από εδάφη τύπου muil (ενδοχούμος) έως εδάφη τύπου moir (εκτοχούμος). Πρόκειται για ένα κολλέμβολο χωρίς μάτια και χωρίς χρωματισμό. Έχει καταγραφεί σε καλλιεργούμενα εδάφη σε όλη την Ευρώπη (6). Είναι παμφάγο και στην τροφή του συμπεριλαμβάνονται υφές των νηματωειδών μυκήτων, βακτήρια, πρωτόζωα και νεκρή ύλη. Μέσω της βοσκής, αλληλεπιδρά με λοιμώξεις προκαλούμενες από φυτοπαθογόνους μύκητες (7) και μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη μυκόρριζας, όπως είναι γνωστό ότι ισχύει για το *F. candida*. Όπως συμβαίνει στα περισσότερα είδη κολλεμβόλων, αναπαράγεται σεξουαλικά, ενώ απαιτείται η μόνιμη παρουσία των αρσενικών για τη γονιμοποίηση των αυγών.
5. Το είδος *F. candida* επίσης απαντάται σε ολόκληρο τον κόσμο. Παρότι δεν είναι κοινό είδος στα περισσότερα φυσικά εδάφη, υπάρχει συχνά σε πολύ μεγάλους αριθμούς σε τοποθεσίες πλούσιες σε χούμο. Πρόκειται για ένα κολλέμβολο χωρίς μάτια και χωρίς χρωματισμό. Διαθέτει καλά αναπτυγμένο όργανο αναπλήθησης (furca) και δραστήρια κίνηση τρεξίματος και εάν δεχθεί ενόχληση αναπηδά με ευκολία. Ο οικολογικός ρόλος του είδους *F. candida* είναι παρόμοιος με αυτόν του είδους *F. fimetaria*, αλλά οι οικοτόποι του είναι εδάφη πιο πλούσια σε οργανικές ενώσεις. Αναπαράγεται με παρθενογένεση. Ο αριθμός των αρσενικών ειδών μπορεί να είναι μικρότερος από 1 στα χιλία.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

6. Ενήλικα (*F. fimetaria*) ή νεαρά (*F. candida*) άτομα κολλεμβόλων συγχρονισμένης ανάπτυξης εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει αναμιχθεί σε τροποποιημένο τεχνητό έδαφος (8) με περιεκτικότητα σε οργανική ύλη της τάξης του 5 % (ή σε εναλλακτικό έδαφος). Το σενάριο της δοκιμής μπορεί να χωριστεί σε δύο βήματα:
 - Δοκιμή καθορισμού εύρους, σε περίπτωση που δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα, κατά την οποία η θνησιμότητα και η αναπαραγωγή αποτελούν τα κύρια τελικά σημεία που εκτιμώνται μετά από 2 εβδομάδες για το *F. fimetaria* και 3 εβδομάδες για το *F. candida*.
 - Οριστική δοκιμή αναπαραγωγής, κατά την οποία εκτιμάται ο συνολικός αριθμός των νεαρών ατόμων που προήλθαν από μητρικά ζώα, καθώς και η επιβίωση των μητρικών ζώων. Η διάρκεια αυτής της οριστικής δοκιμής είναι 3 εβδομάδες για το *F. fimetaria* ή 4 εβδομάδες για το *F. candida*.

Η τοξική επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη θνησιμότητα και την αναπαραγωγική απόδοση των ενήλικων ατόμων εκφράζεται ως LC_x και EC_x με προσαρμογή των δεδομένων σε ένα κατάλληλο μοντέλο μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση που θα προκαλούσε x % θνησιμότητα ή μείωση στην αναπαραγωγική απόδοση, αντίστοιχα, ή εναλλακτικά ως τιμή NOEC (συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις)/LOEC (κατώτατη συγκέντρωση παρατηρούμενων επιδράσεων) (9).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Οι φυσικές ιδιότητες, η υδατοδιαλυτότητα, η τιμή $\log K_{ow}$, ο συντελεστής κατανομής νερού στο έδαφος και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι γνωστά. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, όπως ο ρυθμός φωτόλυσης και υδρόλυσης και η βιοτική αποδόμηση, είναι επιθυμητές. Η χημική ταυτοποίηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σύμφωνα με την ονοματολογία IUPAC, ο αριθμός CAS, ο αριθμός φορτίου, ο αριθμός παρτίδας, ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα θα πρέπει να τεκμηριώνονται όταν είναι διαθέσιμα.
8. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιείται για χημικές ουσίες διαλυτές ή αδιάλυτες στο νερό. Ωστόσο, ο τρόπος εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα διαφέρει ανάλογα. Η μέθοδος δοκιμών δεν εφαρμόζεται σε πηκτικές χημικές ουσίες, δηλ. χημικές ουσίες για τις οποίες η σταθερά του Henry ή ο συντελεστής κατανομής αέρα/νερού έχει τιμή μεγαλύτερη από ένα, ή χημικές ουσίες για τις οποίες η τάση ατμών υπερβαίνει την τιμή 0,0133 Pa στους 25 °C.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

9. Για να θεωρείται έγκυρο ένα αποτέλεσμα της δοκιμής, θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στους μη κατεργασμένους μάρτυρες:
 - Η μέση θνησιμότητα των ενήλικων ατόμων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % στο τέλος της δοκιμής,
 - Ο μέσος αριθμός των νεαρών ατόμων ανά δοχείο θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 100 στο τέλος της δοκιμής,
 - Ο υπολογισμένος συντελεστής μεταβλητότητας για τον αριθμό των νεαρών ατόμων θα πρέπει να είναι μικρότερος από 30 % στο τέλος της οριστικής δοκιμής.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

10. Μια χημική ουσία αναφοράς θα πρέπει να ελέγχεται στη συγκέντρωση EC_{50} για τον επιλεγμένο τύπο εδάφους της δοκιμής είτε σε τακτικά διαστήματα είτε πιθανώς στο πλαίσιο κάθε εκτέλεσης της δοκιμής, προκειμένου να επιβεβαιώνεται ότι η απόκριση των οργανισμών της δοκιμής στο σύστημα δοκιμής βρίσκεται εντός του φυσιολογικού επιπέδου. Μια κατάλληλη χημική ουσία αναφοράς είναι το βορικό οξύ, το οποίο αναμένεται να μειώνει την αναπαραγωγή κατά 50 % (10) (11) σε περίπου 100 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους και για τα δύο είδη.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Δοχεία και εξοπλισμός δοκιμής

11. Περιέκτες με χωρητικότητα 30 g υγρού εδάφους αποτελούν κατάλληλα δοχεία δοκιμής. Το υλικό θα πρέπει να είναι γυαλί ή αδρανές πλαστικό (μη τοξικό). Ωστόσο, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών περιεκτών εάν η έκθεση της χημικής ουσίας είναι μειωμένη εξαιτίας της ρόφησης. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να διαθέτουν μια επιφάνεια εγκάρσιας διατομής που επιτρέπει πραγματικό βάθος εδάφους εντός του δοχείου δοκιμής 2-4 cm. Τα δοχεία θα πρέπει να διαθέτουν καπάκια (π.χ. γυάλινα ή πολυαιθυλενίου) σχεδιασμένα να μειώνουν την εξάτμιση νερού και ταυτόχρονα να επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Ο περιέκτης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον μερικώς διαφανής για να επιτρέπεται η διαπερατότητα από το φως.
12. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και ειδικότερα τα εξής:
 - θάλαμος ξηράσεως,
 - στερεοσκοπικό μικροσκόπιο,
 - πεχάμετρο και λουξόμετρο,
 - κατάλληλοι ζυγοί ακριβείας,
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της θερμοκρασίας,
 - κατάλληλος εξοπλισμός για τον έλεγχο της υγρασίας του αέρα (δεν απαιτείται εάν τα δοχεία έκθεσης είναι καλυμμένα με καπάκια),
 - επωαστήρας ή μικρό δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας,
 - λαβίδα ή συσκευή ροής αέρα χαμηλής αναρρόφησης.

Προετοιμασία του εδάφους δοκιμής

13. Χρησιμοποιείται τροποποιημένο τεχνητό έδαφος (8) με περιεκτικότητα σε οργανική ύλη της τάξης του 5 %. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, επειδή το τεχνητό έδαφος δεν προσομοιάζει στα φυσικά εδάφη. Η συνιστώμενη σύνθεση του τεχνητού εδάφους είναι η εξής (βάσει ξηρών βαρών, όπου το υλικό έχει αποξηρανθεί στους 105 °C για την επίτευξη σταθερού βάρους):
- 5 % τύρφης σφάγνων, αερόξηρης και λεπτοαλεσμένης (μέγεθος σωματιδίων 2 ± 1 mm είναι αποδεκτό),
 - 20 % καολιντικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολίνη, κατά προτίμηση, άνω του 30 %),
 - περίπου 74 % αερόξηρης βιομηχανικής άμμου (ανάλογα με την ποσότητα CaCO_3 που απαιτείται), όπου επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μικρά πάνω από 50 %. Η ακριβής ποσότητα της άμμου εξαρτάται από την ποσότητα του CaCO_3 (βλ. παρακάτω), μαζί θα πρέπει να ισούνται με 75 %,
 - 1,0 % ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3 , κονιοποιημένο, αναλυτικής καθαρότητας) για την επίτευξη pH $6,0 \pm 0,5$. Η ποσότητα του ανθρακικού ασβεστίου που πρέπει να προστεθεί ενδέχεται να εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα/ φύση της τύρφης (βλ. σημείωση 1).

Σημείωση 1: Η ποσότητα του απαιτούμενου CaCO_3 θα εξαρτάται από τα συστατικά του υπεδάφους και θα πρέπει να προσδιορίζεται με μέτρηση του pH επιμέρους δειγμάτων υγρού εδάφους που έχουν υποστεί προεπιώαση αμέσως πριν από τη δοκιμή.

Σημείωση 2: Συνιστάται η μέτρηση του pH και προαιρετικά της αναλογίας C/N, της ικανότητας ανταλλαγής κατιόντων (CEC) και της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ύλη, για να είναι δυνατή η κανονικοποίηση σε μεταγενέστερο στάδιο και για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Σημείωση 3: Εάν απαιτείται, π.χ. για συγκεκριμένους σκοπούς δοκιμής, φυσικά εδάφη που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται επίσης ως υπόστρωμα δοκιμής ή/και καλλιέργειας. Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον βάσει της προέλευσης (τόπος συλλογής), του pH, της υφής (κατανομή μεγέθους σωματιδίων), της CEC και της περιεκτικότητας σε οργανική ύλη, και θα πρέπει είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση. Για φυσικό έδαφος, συνιστάται να αποδεικνύεται ότι είναι κατάλληλο για τη δοκιμή και ότι πληροί τα κριτήρια εγκυρότητας της δοκιμής πριν από τη χρήση του σε μια οριστική δοκιμή.

14. Τα ξηρά συστατικά του εδάφους αναμιγνύονται επιμελώς (π.χ. σε εργαστηριακό αναμεικτη μεγάλης κλίμακας). Η μέγιστη υδατοχωρητικότητα (WHC) του τεχνητού εδάφους προσδιορίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο προσάρτημα 5. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του εδάφους δοκιμής θα πρέπει να βελτιστοποιείται για την επίτευξη μιας χαλαρής πορώδους δομής εδάφους που επιτρέπει την είσοδο των κολλεμβόλων εντός των πόρων. Αυτή συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60 % της μέγιστης WHC.
15. Το ξηρό τεχνητό έδαφος υγραίνεται εκ των προτέρων με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας αποιονισμένου νερού ώστε να επιτυγχάνεται περίπου το ήμισυ της τελικής περιεκτικότητας σε νερό 2-7 ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, για την εξισορρόπηση/σταθεροποίηση της οξύτητας. Για τον προσδιορισμό του pH, χρησιμοποιείται μείγμα εδάφους και διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M ή χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) 0,01 M, σε αναλογία 1:5 (σύμφωνα με το προσάρτημα 6). Εάν το έδαφος είναι περισσότερο όξινο από το απαιτούμενο εύρος, μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας CaCO_3 . Εάν το έδαφος είναι πολύ αλκαλικό, μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη ενός ανόργανου οξέος που δεν είναι επιβλαβές για τα κολλέμβολα.
16. Το έδαφος, που έχει προηγουμένως υγρανθεί, χωρίζεται σε μέρη αντίστοιχα με τον αριθμό των συγκεντρώσεων της δοκιμής (και των χημικών ουσιών αναφοράς, κατά περίπτωση) και των μαρτύρων που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Οι υπό δοκιμή χημικές ουσίες προστίθενται και η περιεκτικότητα σε νερό ρυθμίζεται σύμφωνα με την παράγραφο 24.

Επιλογή και προετοιμασία των ζώων δοκιμής

17. Το *F. candida* που αναπαράγεται με παρθενογένεση αποτελεί το συνιστώμενο είδος, επειδή στις κυκλικές δοκιμές επικύρωσης της μεθόδου δοκιμών (11) το είδος αυτό ικανοποιούσε τα κριτήρια εγκυρότητας για επιβίωση πιο συχνά από το *F. fimetaria*. Εάν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικό είδος, θα πρέπει να πληροί τα κριτήρια εγκυρότητας που περιγράφονται στην παράγραφο 9. Κατά την έναρξη της δοκιμής, τα ζώα θα πρέπει να τρέφονται καλά και να είναι ηλικίας μεταξύ 23 και 26 ημερών για το *F. fimetaria* και μεταξύ 9 και 12 ημερών για το *F. candida*. Για κάθε επανάληψη, ο αριθμός των ατόμων του *F. fimetaria* θα πρέπει να είναι 10 αρσενικά και 10 θηλυκά, και για το *F. candida* θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 θηλυκά (βλ. προσάρτημα 2 και προσάρτημα 3). Ζώα συγχρονισμένης ανάπτυξης επιλέγονται τυχαία από τα τρυβλία και γίνεται έλεγχος της υγείας και της σωματικής τους κατάστασης για κάθε παρτίδα που προστίθεται στην επανάληψη. Κάθε ομάδα των 10/20 ατόμων προστίθεται σε τυχαία επιλεγμένο περιέκτη δοκιμής και επιλέγονται τα θηλυκά μεγάλου μεγέθους του *F. fimetaria* για να διασφαλιστεί η ορθή διάκρισή τους από τα αρσενικά του *F. fimetaria*.

Παρασκευή των συγκεντρώσεων δοκιμής

18. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τέσσερις μέθοδοι εφαρμογής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας: 1) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με το νερό ως φορέα, 2) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με έναν οργανικό διαλύτη ως φορέα, 3) ανάμιξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος με άμμο ως φορέα ή 4) εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας και τον σκοπό της δοκιμής. Σε γενικές γραμμές, συνιστάται η μέθοδος ανάμιξης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στο έδαφος. Ωστόσο, ενδέχεται να απαιτούνται διαδικασίες εφαρμογής που συνάδουν με την πρακτική χρήση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. ψεκασμός υγρής σύνδεσης ή χρήση ειδικών συνδέσεων φυτοφαρμάκων, όπως κοκκία ή σποροαπολυμαντικά). Το έδαφος υφίσταται κατεργασία πριν από την προσθήκη των κολλεμβόλων, εκτός από την περίπτωση όπου η υπό δοκιμή χημική ουσία προστίθεται στην επιφάνεια του εδάφους, κατά την οποία τα κολλέμβολα θα πρέπει να εισέλθουν στο έδαφος πριν από την κατεργασία του εδάφους.

Υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

19. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αποιονισμένο νερό, σε ποσότητα που επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις μίας συγκέντρωσης δοκιμής. Κάθε διάλυμα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας αναμειγνύεται επιμελώς με μία παρτίδα εδάφους που έχει υγρανθεί προηγουμένως, προτού εισαχθεί μέσα στο δοχείο δοκιμής.

Μη υδατοδιαλυτή υπό δοκιμή χημική ουσία

20. Για χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, η υπό δοκιμή χημική ουσία μπορεί να διαλυθεί στον μικρότερο δυνατό όγκο ενός κατάλληλου διαλύτη (π.χ. ακετόνη), διασφαλίζοντας πάντα τη σωστή ανάμιξη της χημικής ουσίας στο έδαφος και αναμειγνύοντάς την με το απαιτούμενο μέρος χαλαζιακής άμμου. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο πηκτικοί διαλύτες. Όταν χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης, όλες οι συγκεντρώσεις δοκιμής και ένας πρόσθετος αρνητικός μάρτυρας του διαλύτη θα πρέπει να περιέχουν την ίδια ελάχιστη ποσότητα του διαλύτη. Οι περιέκτες της εφαρμογής θα πρέπει να μένουν χωρίς καπάκι για ορισμένο χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμίζεται ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, διασφαλίζοντας, ωστόσο, την αποφυγή διάχυσης της τοξικής χημικής ουσίας κατά το διάστημα αυτό.

Υπό δοκιμή χημική ουσία ασθενώς διαλυτή στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες

21. Για χημικές ουσίες που είναι ασθενώς διαλυτές στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, γίνεται ανάμιξη χαλαζιακής άμμου, η οποία θα πρέπει να αποτελεί μέρος της ολικής άμμου που προστίθεται στο έδαφος, με την ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης δοκιμής. Αυτό το μείγμα χαλαζιακής άμμου και υπό δοκιμή χημικής ουσίας προστίθεται στο έδαφος που έχει προηγουμένως υγρανθεί και αναμειγνύεται πλήρως μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποιονισμένου νερού για να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε υγρασία. Το τελικό μείγμα κατανέμεται μεταξύ των δοχείων δοκιμής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε συγκέντρωση δοκιμής και προετοιμάζεται επίσης ένας κατάλληλος μάρτυρας.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους

22. Όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι ένα φυτοφάρμακο, ενδεχομένως να είναι σκόπιμη η εφαρμογή της επάνω στην επιφάνεια του εδάφους με ψεκασμό. Το έδαφος υφίσταται κατεργασία μετά την προσθήκη των κολλεμβόλων. Οι περιέκτες δοκιμής αρχικά πληρώνονται με το υγρό υπεδαφος, στη συνέχεια προστίθενται τα ζώα και μετά ζυγίζονται οι περιέκτες δοκιμής. Προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν άμεση έκθεση των ζώων στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσω άμεσης επαφής, η εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας γίνεται τουλάχιστον μισή ώρα μετά την εισαγωγή των κολλεμβόλων. Η υπό δοκιμή χημική ουσία θα πρέπει να εφαρμόζεται στην επιφάνεια του εδάφους όσο το δυνατόν πιο ομοιογενώς, με τη χρήση κατάλληλης συσκευής ψεκασμού εργαστηριακής κλίμακας για την προσομοίωση του ψεκασμού στο χωράφι. Η εφαρμογή θα πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία με διακυμάνσεις της τάξης του ± 2 °C, ενώ εάν πρόκειται για υδατικά διαλύματα, γαλακτώματα ή παρασκευάσματα διασποράς, ο ρυθμός εφαρμογής νερού θα πρέπει να συμφωνεί με τις συστάσεις εκτίμησης κινδύνου. Ο ρυθμός θα πρέπει να επαληθεύεται με τη χρήση κατάλληλης τεχνικής βαθμονόμησης. Ειδικές συνδέσεις, όπως κοκκία ή σποροαπολυμαντικά, μπορούν να εφαρμόζονται με τρόπο ο οποίος συνάδει με τη γεωργική χρήση. Η προσθήκη της τροφής πραγματοποιείται μετά τον ψεκασμό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες δοκιμής

23. Η μέση θερμοκρασία δοκιμής θα πρέπει να είναι 20 ± 1 °C με εύρος θερμοκρασίας 20 ± 2 °C. Η δοκιμή διεξάγεται υπό ελεγχόμενους κύκλους φωτός-σκοταδιού (κατά προτίμηση, 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) με φωτεινή ισχύ 400 έως 800 lux στην περιοχή των δοχείων δοκιμής.

24. Προκειμένου να ελέγχεται η υγρασία του εδάφους, τα δοχεία ζυγίζονται στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της δοκιμής. Μια μείωση βάρους > 2 % αναπληρώνεται με την προσθήκη απιονισμένου νερού. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η απώλεια νερού μπορεί να περιοριστεί εάν διατηρείται υψηλή υγρασία αέρα (> 80 %) στον επωαστήρα της δοκιμής.
25. Το pH θα πρέπει να μετράται στην αρχή και στο τέλος τόσο της δοκιμής καθορισμού εύρους όσο και της οριστικής δοκιμής. Μετρήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται και σε ένα πρόσθετο δείγμα μάρτυρα, καθώς και σε ένα πρόσθετο δείγμα από τα δείγματα εδάφους που έχουν υποστεί κατεργασία (όλες οι συγκεντρώσεις), τα οποία θα έχουν παρασκευαστεί και διατηρηθεί με τον ίδιο τρόπο όπως οι καλλιέργειες δοκιμής, αλλά χωρίς την προσθήκη κολλεμβόλων.

Διαδικασία δοκιμής και μετρήσεις

26. Για κάθε συγκέντρωση δοκιμής, μια ποσότητα του εδάφους δοκιμής που αντιστοιχεί σε 30 g υγρού βάρους τοποθετείται μέσα στο δοχείο δοκιμής. Παρασκευάζονται επίσης μάρτυρες νερού, χωρίς την υπό δοκιμή χημική ουσία. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να εκτελεστεί μία σειρά μάρτυρα που περιέχει μόνο τον φορέα, επιπλέον της σειράς δοκιμής. Η συγκέντρωση του διαλύτη ή του προσθέτου διασποράς θα πρέπει να είναι ίδια με την αντίστοιχη στα δοχεία δοκιμής που περιέχουν την υπό δοκιμή χημική ουσία.
27. Κάθε κολλέμβολο μεταφέρεται προσεκτικά σε δοχείο δοκιμής (τυχαία κατανομή στα δοχεία δοκιμής) και τοποθετείται στην επιφάνεια του εδάφους. Για την αποτελεσματική μεταφορά των ζώων, μπορεί να χρησιμοποιείται συσκευή ροής αέρα χαμηλής αναρρόφησης. Ο αριθμός των επαναλήψεων για τις συγκεντρώσεις δοκιμής και τους μάρτυρες εξαρτάται από τον σχεδιασμό της δοκιμής που χρησιμοποιείται. Τα δοχεία δοκιμής τοποθετούνται τυχαία στον επωαστήρα της δοκιμής και οι θέσεις αυτές αλλάζουν τυχαία εβδομαδιαίως.
28. Για τη δοκιμή του *F. fimetaria*, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται είκοσι ενήλικα άτομα, 10 αρσενικά και 10 θηλυκά, ηλικίας 23 έως 26 ημερών σε κάθε δοχείο δοκιμής. Την 21η ημέρα, τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος και καταμετρώνται. Για το *F. fimetaria*, γίνεται διάκριση του φύλου από το μέγεθος στη συγχρονισμένη παρτίδα ζώων που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή. Τα θηλυκά άτομα είναι σαφώς μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα αρσενικά (βλ. προσάρτημα 3)
29. Για τη δοκιμή του *F. candida*, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δέκα νεαρά άτομα ηλικίας 9 έως 12 ημερών σε κάθε δοχείο δοκιμής. Την 28η ημέρα, τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος και καταμετρώνται.
30. Ως κατάλληλη πηγή τροφής, προστίθεται σε κάθε περιέκτη στην αρχή της δοκιμής και μετά από περίπου 2 εβδομάδες επαρκής ποσότητα, π.χ. 2-10 mg, κοκκοποιημένης ξηρής ζύμης αρτοποιίας, που διατίθεται στην αγορά για οικιακή χρήση.
31. Στο τέλος της δοκιμής, γίνεται εκτίμηση της θνησιμότητας και της αναπαραγωγής. Μετά από 3 εβδομάδες (*F. fimetaria*) ή 4 εβδομάδες (*F. candida*), τα κολλέμβολα εκχυλίζονται από το έδαφος δοκιμής (βλ. προσάρτημα 4) και καταμετρώνται (12). Ένα κολλέμβολο καταγράφεται ως νεκρό, εάν δεν υπάρχει στο εκχύλισμα. Η μέθοδος εκχύλισης και καταμέτρησης θα πρέπει να επικυρώνεται. Η εγκυρότητα προϋποθέτει αποδοτικότητα εκχύλισης των νεαρών ατόμων μεγαλύτερη από 95 %, π.χ. με την προσθήκη γνωστού αριθμού στο έδαφος.
32. Μια πρακτική σύνοψη και ένα χρονοδιάγραμμα της διαδικασίας δοκιμής περιγράφονται στο προσάρτημα 2.

Σχεδιασμός της δοκιμής

Δοκιμή καθορισμού εύρους

33. Όταν είναι αναγκαίο, εκτελείται μια δοκιμή καθορισμού εύρους, για παράδειγμα πέντε συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας της τάξεως του 0,1, 1,0, 10, 100 και 1 000 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους και δύο επαναλήψεις για κάθε αγωγή και μάρτυρα. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη θνησιμότητα ή την αναπαραγωγή των κολλεμβόλων, από δοκιμές με παρόμοιες χημικές ουσίες ή από τη βιβλιογραφία, μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για να αποφασιστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή καθορισμού εύρους.
34. Η διάρκεια της δοκιμής καθορισμού εύρους είναι δύο εβδομάδες για το *F. fimetaria* και 3 εβδομάδες για το *F. candida* ώστε να διασφαλίζεται ότι έχει παραχθεί μία σειρά νεαρών ατόμων. Στο τέλος της δοκιμής, γίνεται εκτίμηση της θνησιμότητας και της αναπαραγωγής των κολλεμβόλων. Θα πρέπει να καταγράφονται ο αριθμός των ενήλικων ατόμων και η εμφάνιση νεαρών ατόμων.

Οριστική δοκιμή

35. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης EC_x (π.χ. EC_{10} , EC_{50}), θα πρέπει να ελέγχονται δώδεκα συγκεντρώσεις. Συνιστάται η χρήση τουλάχιστον δύο επαναλήψεων για κάθε αγωγή με τη συγκέντρωση δοκιμής και έξι επαναλήψεις μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης ενδέχεται να διαφέρει ανάλογα με τη σχέση δόσης-απόκρισης.
36. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC), θα πρέπει να ελέγχονται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις σε γεωμετρική σειρά. Συνιστάται η χρήση τεσσάρων επαναλήψεων για κάθε αγωγή με τη συγκέντρωση δοκιμής και οκτώ μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1,8.
37. Με μια συνδυασμένη προσέγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC) όσο και της συγκέντρωσης EC_x . Για την εν λόγω συνδυασμένη προσέγγιση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ συγκεντρώσεις αγωγής σε γεωμετρική σειρά. Συνιστάται η χρήση τεσσάρων επαναλήψεων για κάθε αγωγή και οκτώ μαρτύρων. Ο παράγοντας κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1,8.
38. Εάν δεν παρατηρηθεί καμία επίδραση στην υψηλότερη συγκέντρωση με τη δοκιμή καθορισμού εύρους (δηλ. 1 000 mg/kg), μπορεί να διεξαχθεί η δοκιμή αναπαραγωγής ως οριακή δοκιμή, με τη χρήση μιας συγκέντρωσης δοκιμής των 1 000 mg/kg και του μάρτυρα. Μια οριακή δοκιμή θα προσφέρει την ευκαιρία να αποδειχθεί ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην οριακή συγκέντρωση. Για το έδαφος που έχει υποστεί κατεργασία και για τον μάρτυρα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οκτώ επαναλήψεις.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

39. Η αναπαραγωγική απόδοση είναι το κύριο τελικό σημείο (π.χ. ο αριθμός των νεαρών ατόμων που παράγονται ανά δοχείο δοκιμής). Η στατιστική ανάλυση, π.χ. διαδικασίες ANOVA, συγκρίνει τις αγωγές μέσω της δοκιμασίας t του Student, της δοκιμασίας Dunnett ή της δοκιμασίας William. Υπολογίζονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95 % για τις μέσες τιμές των μεμονωμένων αγωγών.
40. Ο αριθμός των επιβιωσάντων ενήλικων ατόμων στην ομάδα των μαρτύρων που δεν υποβλήθηκε σε κατεργασία αποτελεί σημαντικό κριτήριο εγκυρότητας και θα πρέπει να τεκμηριώνεται. Όπως και στη δοκιμή καθορισμού εύρους, όλες οι άλλες επιβλαβείς ενδείξεις θα πρέπει να αναφέρονται και στην τελική έκθεση.

 LC_x και EC_x

41. Οι τιμές EC_x , συμπεριλαμβανομένων των αντίστοιχων κατώτατων και ανώτατων ορίων εμπιστοσύνης 95 % για την παράμετρο, υπολογίζονται με χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων (π.χ. λογιστική κατανομή ή συνάρτηση Weibull, σταθμισμένη μέθοδος Spearman-Kärber ή απλή παρεμβολή). Λαμβάνεται μια τιμή EC_x με εισαγωγή μιας τιμής που αντιστοιχεί στο x % της μέσης τιμής του μάρτυρα στην εξίσωση που προκύπτει. Για να υπολογιστεί η τιμή EC_{50} ή οποιαδήποτε άλλη τιμή EC_x , το πλήρες σύνολο δεδομένων θα πρέπει να υποβάλλεται σε ανάλυση παλινδρόμησης. Η τιμή LC_{50} συνήθως υπολογίζεται με ανάλυση πιθανοτήτων ή παρόμοια ανάλυση που λαμβάνει υπόψη τα δεδομένα θνησιμότητας που ακολουθούν διωνυμική κατανομή.

NOEC/LOEC

42. Εάν μια στατιστική ανάλυση αποσκοπεί στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC)/της κατώτατης συγκέντρωσης παρατηρούμενης επίδρασης (LOEC), απαιτούνται στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο (το κάθε δοχείο θεωρείται επανάληψη). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι σύμφωνα με το έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (Τρέχουσες προσεγγίσεις στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων οικοτοξικότητας: Οδηγός εφαρμογής) (9). Σε γενικές γραμμές, οι δυσμενείς επιδράσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα διερευνώνται με χρήση της μονόπλευρης δοκιμασίας υποθέσεων με $p \leq 0,05$.
43. Η κανονική κατανομή και η ομοιογένεια της διασποράς μπορούν να ελέγχονται με τη χρήση κατάλληλης στατιστικής δοκιμασίας, π.χ. δοκιμασία Shapiro-Wilk και δοκιμασία Levene, αντίστοιχα ($p \leq 0,05$). Μπορεί να διεξαχθεί μονόδρομη ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και επακόλουθες δοκιμασίες πολλαπλών συγκρίσεων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές συγκρίσεις (π.χ. δοκιμασία Dunnett) ή καθοδικά εφαρμοζόμενες δοκιμασίες τάσεων (π.χ. δοκιμασία Williams) για να υπολογιστεί εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των μαρτύρων και των διαφόρων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (επιλογή της συνιστώμενης δοκιμής σύμφωνα με το Έγγραφο 54 του ΟΟΣΑ (9)). Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι (π.χ. δοκιμασία Bonferroni-U σύμφωνα με τον Holm ή δοκιμασία τάσεων Jonckheere-Terpstra) για να προσδιοριστούν οι τιμές NOEC και LOEC.

Οριακή δοκιμή

44. Εάν έχει διεξαχθεί οριακή δοκιμή (σύγκριση του μάρτυρα και μίας αγωγής μόνο) και πληρούνται οι προϋποθέσεις των διαδικασιών παραμετρικής δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογένεια), οι μετρικές αποκρίσεις μπορούν να αξιολογούνται με τη δοκιμασία Student (δοκιμασία t). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς (δοκιμασία t του Welch) ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Mann-Whitney-U.
45. Για τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των μαρτύρων (μάρτυρας και μάρτυρας με διαλύτη), οι επαναλήψεις κάθε μάρτυρα μπορούν να ελέγχονται με τον τρόπο που περιγράφεται για την οριακή δοκιμή. Εάν με τις δοκιμασίες αυτές δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές, μπορεί να γίνει συνένωση όλων των επαναλήψεων του μάρτυρα και του μάρτυρα με διαλύτη. Διαφορετικά, όλες οι αγωγές θα πρέπει να συγκρίνονται με τον μάρτυρα με διαλύτη.

Έκθεση δοκιμής

46. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

- ταυτότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αριθμός φορτίου, αριθμός παρτίδας, αριθμός CAS, καθαρότητα,
- φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. $\log K_{ow}$, υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, σταθερά του Henry (H) και, κατά προτίμηση, πληροφορίες για την πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος), εάν διατίθενται,
- θα πρέπει να προσδιορίζεται η σύνθεση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και τα πρόσθετα, εάν δεν ελέγχεται η καθαρή μορφή της χημικής ουσίας,

Οργανισμοί δοκιμής

- ταυτότητα των ειδών και του προμηθευτή των οργανισμών δοκιμής, περιγραφή των συνθηκών αναπαραγωγής και ηλικιακό εύρος των οργανισμών δοκιμής,

Συνθήκες δοκιμής

- περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού και της διαδικασίας,
- λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία του εδάφους δοκιμής, λεπτομερείς προδιαγραφές στην περίπτωση που χρησιμοποιείται φυσικό έδαφος (προέλευση, ιστορικό, κατανομή μεγέθους σωματιδίων, pH, περιεκτικότητα σε οργανική ύλη),
- υδατοχωρητικότητα του εδάφους,
- περιγραφή της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος,
- συνθήκες δοκιμής: ένταση φωτός, διάρκεια κύκλων φωτός-σκοταδιού, θερμοκρασία,
- περιγραφή του καθεστώτος σίτισης, τύπος και ποσότητα τροφής που χρησιμοποιείται στη δοκιμή, ημερομηνίες σίτισης,
- pH και περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής (μάρτυρας και κάθε αγωγή),
- λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου εκχύλισης και της αποδοτικότητας εκχύλισης,

Αποτελέσματα δοκιμής

- αριθμός των νεαρών ατόμων που προσδιορίστηκε σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής,
- αριθμός των ενήλικων ατόμων και ποσοστό θνησιμότητάς τους (%) σε κάθε δοχείο δοκιμής στο τέλος της δοκιμής,
- περιγραφή των εμφανώς φυσιολογικών ή παθολογικών συμπτωμάτων ή των διακριτών αλλαγών συμπεριφοράς,
- αποτελέσματα που ελήφθησαν με την υπό δοκιμή χημική ουσία αναφοράς,
- τιμές NOEC/LOEC, τιμή LC_x για τη θνησιμότητα και τιμή EC_x για την αναπαραγωγή (κυρίως τιμές LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} και EC_{10}) με διαστήματα εμπιστοσύνης 95 %. Μια γραφική παράσταση του προσαρμοσμένου μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό, καθώς και η εξίσωση της συνάρτησης και οι παράμετροί του (βλ. (9)),

- κάθε πληροφορία και παρατήρηση που είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων,
- ισχύς της πραγματικής δοκιμής, εάν διεξάγεται δοκιμασία υπόθεσης (9),
- αποκλίσεις από τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών και τυχόν ασυνήθιστα συμβάντα κατά τη διάρκεια της δοκιμής,
- εγκυρότητα της δοκιμής,
- ελάχιστη ανιχνεύσιμη διαφορά, όταν γίνεται εκτίμηση της τιμής NOEC.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (13) Wiles JA και Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (έκδ. H Løkke και CAM Van Gestel), σελ. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (14) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. Αρ. 11267. Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης, Γενεύη
- (15) Burges A και Raw F (εκδ.) (1967) Soil Biology. Academic Press. Λονδίνο
- (16) Petersen H και Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (17) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (18) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. σελ. 330 (ISBN 0-19-854084-1)
- (19) 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 (εκδ.), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Βέλγιο), 30 Αυγούστου-2 Σεπτεμβρίου 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, σελ. 261-268
- (20) Κεφάλαιο Γ.36 του παρόντος προσαρτήματος, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*.
- (21) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Αριθμός 54, ENV/JM/MONO(2006)18, ΟΟΣΑ Παρίσι
- (22) Scott-Fordsmand JJ και Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Αρ. 986. Miljøstyrelsen σελ. 61 Danish Ministry for the Environment.
- (23) 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 Αρ. 1256, σελ. 66.
- (24) Krogh PH, Johansen K και Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205.
- (25) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. *Norsk Entomologisk Forening*.
- (26) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., εκδ.). Butterworths, Λονδίνο, σελ. 412-416
- (27) 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.

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για την παρούσα μέθοδο δοκιμών ισχύουν οι παρακάτω ορισμοί (σε αυτήν τη δοκιμή όλες οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρουσιάζεται επίδραση εκφράζονται ως μάζα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ανά ξηρή μάζα του εδάφους δοκιμής):

Χημική ουσία είναι μια ουσία ή ένα μείγμα.

NOEC (no observed effect concentration) είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση. Σε αυτήν τη δοκιμή, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη NOEC δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα.

LOEC (lowest observed effect concentration) είναι η κατώτατη συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($p < 0,05$) εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα.

EC_x (Effect concentration for x % effect) είναι η συγκέντρωση που προκαλεί το x % μιας επίδρασης σε οργανισμούς δοκιμής εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης κατά τη σύγκριση με τον μάρτυρα. Για παράδειγμα, μια τιμή EC₅₀ είναι μια συγκέντρωση που εκτιμάται ότι προκαλεί επίδραση σε ένα τελικό σημείο μιας δοκιμής στο 50 % ενός εκτιθέμενου πληθυσμού κατά τη διάρκεια μιας καθορισμένης περιόδου έκθεσης.

Υπό δοκιμή χημική ουσία είναι κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

ΚΥΡΙΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΚΟΛΛΕΜΒΟΛΩΝ

Τα βήματα της δοκιμής μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

| Χρόνος (ημέρα) | Ενέργεια |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - 23 έως - 26 | Προετοιμασία συγχρονισμένης καλλιέργειας <i>F. fimetaria</i> |
| - 14 | Προετοιμασία τεχνητού εδάφους (ανάμειξη των ξηρών συστατικών) Έλεγχος pH του τεχνητού εδάφους και ανάλογη προσαρμογή Μέτρηση μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους |
| - 9 έως - 12 | Προετοιμασία συγχρονισμένης καλλιέργειας <i>F. candida</i> |
| - 2 έως - 7 | Ύγρανση του εδάφους |
| - 1 | Κατανομή νεαρών ατόμων σε παρτίδες Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης και εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν απαιτείται διαλύτης |
| 0 | Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης και εφαρμογή της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν απαιτείται χημική ουσία σε στερεά μορφή, υδατοδιαλυτή χημική ουσία ή εφαρμογή της χημικής ουσίας στην επιφάνεια του εδάφους. Μέτρηση pH εδάφους και ζύγισμα των περιεκτών. Προσθήκη τροφής. Εισαγωγή κολλεμβόλων. |
| 14 | Δοκιμή καθορισμού εύρους για το <i>F. fimetaria</i> : Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους Οριστικές δοκιμές: Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία, αναπλήρωση νερού και προσθήκη 2-10 mg ζύμης |
| 21 | Οριστική δοκιμή για το <i>F. fimetaria</i> : Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους Δοκιμή καθορισμού εύρους για το <i>F. candida</i> : Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους |
| 28 | Οριστική δοκιμή για το <i>F. candida</i> : Τερματισμός δοκιμής, εκχύλιση ζώων, μέτρηση pH και απώλειας νερού (βάρους) του εδάφους |

Προσάρτημα 3

Καθοδήγησή για τον τρόπο εκτροφής και τον συγχρονισμό των *f. Fimetaria* και *f. Candida*

Ο χρόνος και οι διάρκειες που παρέχονται σε αυτήν την καθοδήγηση θα πρέπει να ελέγχονται για κάθε συγκεκριμένο στέλεχος κολλεμβόλων ώστε να διασφαλίζεται ότι ο χρονισμός θα παρέχει τη δυνατότητα για επαρκώς συγχρονισμένα νεαρά άτομα. Στην ουσία, η συχνότητα της ωστοκίας μετά τη μεταφορά των ενήλικων ατόμων σε ανανεωμένο υπόστρωμα, και η εκκόλαψη των αυγών καθορίζουν την κατάλληλη ημέρα για τη συλλογή των αυγών, καθώς και για τη συλλογή των συγχρονισμένων νεαρών ατόμων.

Συνιστάται να διατηρείται μια μόνιμη αρχική καλλιέργεια που θα αποτελείται από π.χ. 50 περιέκτες/τρυβλία Petri. Η αρχική καλλιέργεια θα πρέπει να διατηρείται σε καλή κατάσταση σίτισης μέσω εβδομαδιαίας σίτισης, παροχής νερού και απομάκρυνσης της παλιάς τροφής και των ψόφιων ατόμων. Ο μικρός αριθμός κολλεμβόλων στο υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή λόγω αυξημένης ανάπτυξης μυκήτων. Εάν η αρχική καλλιέργεια χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την παραγωγή αυγών, η καλλιέργεια ενδέχεται να υποστεί κόπωση. Ενδείξεις κόπωσης είναι νεκρά ενήλικα άτομα και εμφάνιση μούχλας στο υπόστρωμα. Τα εναπομένοντα αυγά από την παραγωγή των συγχρονισμένων ζώων μπορούν να χρησιμοποιούνται για την ανανέωση της καλλιέργειας.

Σε μια συγχρονισμένη καλλιέργεια του *F. fimetaria*, τα αρσενικά διακρίνονται από τα θηλυκά κυρίως από το μέγεθος. Τα αρσενικά είναι σαφώς μικρότερα σε μέγεθος από τα θηλυκά, ενώ η ταχύτητα βόδισης των αρσενικών είναι μεγαλύτερη από αυτή των θηλυκών. Η ορθή επιλογή του φύλου απαιτεί λίγη εξάσκηση και μπορεί να επιβεβαιωθεί με εξέταση της γεννητικής περιοχής στο μικροσκόπιο (13).

1. Τρόπος εκτροφής**1.α. Προετοιμασία του υποστρώματος καλλιέργειας**

Το υπόστρωμα καλλιέργειας αποτελείται από γύψο (θειικό ασβέστιο) με ενεργό άνθρακα. Αυτό προσφέρει ένα υγρό υπόστρωμα, ενώ ο σκοπός του άνθρακα είναι να απορροφά τα απόβλητα αέρια και τα απεκρίματα (14) (15). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μορφές άνθρακα για να είναι πιο εύκολη η παρατήρηση των κολλεμβόλων. Για παράδειγμα, για τα *F. candida* και *F. fimetaria* χρησιμοποιείται άνθρακας σε σκόνη (παράγεται ένας μαύρος/γκρι γύψος):

Συστατικά υποστρώματος:

- 20 ml ενεργού άνθρακα
- 200 ml απεσταγμένου νερού
- 200 ml γύψου

ή

- 50 g κονιοποιημένου ενεργού άνθρακα
- 260-300 ml απεσταγμένου νερού
- 400 g γύψου.

Το μείγμα του υποστρώματος πρέπει να παραμείνει σε ηρεμία ώστε να πήξει πριν από τη χρήση.

1.β. Αναπαραγωγή

Τα κολλέμβολα διατηρούνται σε περιέκτες, όπως τρυβλία Petri (90 mm × 13 mm), των οποίων ο πυθμένας είναι καλυμμένος με μια στρώση πάχους 0,5 cm από υπόστρωμα γύψου / άνθρακα. Καλλιεργούνται στους 20 ± 1 °C σε κύκλο φωτός-σκοταδιού των 12-12 ωρών (400-800 Lux). Οι περιέκτες διατηρούνται συνεχώς υγροί διασφαλίζοντας ότι η σχετική υγρασία του αέρα εντός των περιεκτών είναι 100 %. Αυτό μπορεί να διασφαλιστεί με την παρουσία ελεύθερου νερού εντός του πορώδους γύψου, αλλά πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία υμενώδους ύδατος στην επιφάνεια του γύψου. Η απώλεια νερού μπορεί να αποφευχθεί με την παροχή υγρού αέρα περιβάλλοντος. Τυχόν νεκρά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τους περιέκτες, όπως θα πρέπει να γίνεται και για τυχόν μouxλιασμένη τροφή. Για την ενίσχυση της παραγωγής αυγών, τα ενήλικα ζώα πρέπει να μεταφέρονται σε τρυβλία Petri με φρέσκο υπόστρωμα γύψου/άνθρακα.

1.γ. Πηγή τροφής

Ως αποκλειστική πηγή τροφής τόσο για το *F. candida* όσο και για το *F. fimetaria* χρησιμοποιείται κοκκοποιημένη ξηρή ζύμη αρτοποιίας. Φρέσκια τροφή παρέχεται μία ή δύο φορές την εβδομάδα ώστε να μην μουχλιάζει. Τοποθετείται απευθείας επάνω στον γύψο σε μια μικρή στοίβα. Η μάζα της προστιθέμενης ζύμης αρτοποιίας θα πρέπει να προσαρμόζεται στο μέγεθος του πληθυσμού των κολλεμβόλων, αλλά ως γενικός κανόνας επαρκεί ποσότητα 2-15 mg.

2. Συγχρονισμός

Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται με συγχρονισμένα ζώα για τη λήψη ομοιογενών ζώων δοκιμής του ίδιου σταδίου και μεγέθους. Επιπλέον, ο συγχρονισμός επιτρέπει να γίνεται διάκριση μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ατόμων του *F. fimetaria* από την ηλικία των 3 εβδομάδων και άνω, με βάση τον σεξουαλικό διμορφισμό, δηλ. διαφορές στο μέγεθος. Η ακόλουθη διαδικασία αποτελεί μια πρόταση για τον τρόπο λήψης συγχρονισμένων ζώων (τα πρακτικά βήματα είναι προαιρετικά).

2.α. Συγχρονισμός.

- Προετοιμάστε περιέκτες με μια στρώση πάχους 0,5 cm από υπόστρωμα γύψου/άνθρακα.
- Για την ωτοκία, μεταφέρετε στους περιέκτες 150-200 ενήλικα άτομα *F. fimetaria* και 50-100 ενήλικα άτομα *F. candida* από τους 15-20 καλύτερους περιέκτες της αρχικής καλλιέργειας με υπόστρωμα ηλικίας 4-8 εβδομάδων και χορηγήστε 15 mg ζύμης αρτοποιίας ως τροφή. Αποφεύγετε τη μεταφορά νεαρών ατόμων μαζί με τα ενήλικα άτομα, καθώς η παρουσία των νεαρών ατόμων ενδέχεται να αναστείλει την παραγωγή αυγών.
- Διατηρείτε την καλλιέργεια στους 20 ± 1 °C (η μέση θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 20 °C) και σε κύκλο φωτός-σκοταδιού των 12-12 ωρών (400-800 Lux). Διασφαλίζετε τη διαθεσιμότητα φρέσκιας τροφής και τον κορεσμό του αέρα με νερό. Η έλλειψη τροφής μπορεί να οδηγήσει στην αφόδευση των ζώων επάνω στα αυγά, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μυκήτων στα αυγά, ή το *F. candida* μπορεί να φάει τα ίδια του τα αυγά. Μετά από 10 ημέρες, τα αυγά συλλέγονται προσεκτικά με μια βελόνα και σπάτουλα και μεταφέρονται σε "χαρτί αυγών" (μικρά κομμάτια διηθητικού χαρτιού που έχουν εμβυθιστεί σε πολτό γύψου/άνθρακα), το οποίο τοποθετείται μέσα σε έναν περιέκτη με φρέσκο υπόστρωμα γύψου/άνθρακα. Στο υπόστρωμα προστίθενται μερικοί κόκκοι ζύμης για την προσέλκυση των νεαρών τώμων ώστε να απομακρυνθούν από το χαρτί αυγών. Είναι σημαντικό το χαρτί αυγών και το υπόστρωμα να είναι υγρά, διαφορετικά τα αυγά θα αφυδατωθούν. Εναλλακτικά, τα ενήλικα άτομα μπορούν να απομακρύνονται από τα κουτιά της καλλιέργειας συγχρονισμού αφού παράξουν αυγά για 2 ή 3 ημέρες.
- Μετά από τρεις ημέρες, τα περισσότερα από τα αυγά που βρίσκονται επάνω στο χαρτί αυγών θα έχουν εκκολαφθεί και ενδεχομένως να υπάρχουν μερικά νεαρά άτομα κάτω από το χαρτί αυγών.
- Για να είναι τα νεαρά άτομα ίδιας ηλικίας, το χαρτί αυγών με τα αυγά που δεν έχουν εκκολαφθεί απομακρύνεται από το τρυβλίο Petri με μια λαβίδα. Τα νεαρά άτομα, τα οποία είναι πλέον 0-3 ημερών, παραμένουν στο τρυβλίο και τρέφονται με ζύμη αρτοποιίας. Τα μη εκκολαφθέντα αυγά απορρίπτονται.
- Τα αυγά και τα εκκολαφθέντα νεαρά άτομα καλλιεργούνται όπως και τα ενήλικα άτομα. Συγκεκριμένα για το *F. fimetaria*, θα πρέπει να λαμβάνονται τα ακόλουθα μέτρα: διασφάλιση επαρκούς ποσότητας φρέσκιας τροφής, απομάκρυνση παλιάς μουχλιασμένης τροφής, μετά από 1 εβδομάδα τα νεαρά άτομα κατανέμονται σε καινούρια τρυβλία Petri με την προϋπόθεση ότι η πυκνότητα είναι πάνω από 200.

2.β. Χειρισμός των κολλεμβόλων κατά την έναρξη της δοκιμής

- Συλλέγονται τα *F. candida* 9-12 ημερών ή τα *F. fimetaria* 23-26 ημερών, π.χ. με αναρρόφηση, τα οποία απελευθερώνονται σε έναν μικρό περιέκτη με υγρό υπόστρωμα γύψου/άνθρακα και ελέγχεται η φυσική τους κατάσταση κάτω από ένα διοφθάλμιο μικροσκόπιο (τα τραυματισμένα ζώα και τα ζώα που φέρουν βλάβες απορρίπτονται). Όλα τα βήματα θα πρέπει να εκτελούνται ενώ τα κολλέμβολα παραμένουν σε υγρή ατμόσφαιρα για την αποφυγή καταπόνησης από ξηρασία, π.χ. με τη χρήση υγραμένων επιφανειών κ.λπ.
- Γυρνάτε τον περιέκτη ανάποδα και χτυπάτε τον απαλά για να μεταφερθούν τα κολλέμβολα στο έδαφος. Θα πρέπει να εξουδετερώνεται ο στατικός ηλεκτρισμός, διαφορετικά τα ζώα μπορεί απλώς να πετάξουν στον αέρα ή να κολλήσουν στα πλευρικά τοιχώματα του περιέκτη δοκιμής και να αποξηρανθούν. Για την εξουδετέρωση, μπορεί να χρησιμοποιείται ένας ιονιστής ή ένα βρεγμένο πανί κάτω από τον περιέκτη.
- Η τροφή θα πρέπει να κατανέμεται σε ολόκληρη την επιφάνεια του εδάφους και όχι σε μία μόνο στοίβα.

- Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της περιόδου δοκιμής θα πρέπει να αποφεύγετε να χτυπάτε ή να διαταράσσετε με άλλον φυσικό τρόπο τους περιέκτες δοκιμής, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει τη συμπίεση του εδάφους και να παρεμποδίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των κολλεμβόλων.

3. Εναλλακτικά είδη κολλεμβόλων

Μπορούν να επιλεγούν και άλλα είδη κολλεμβόλων για έλεγχο σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο δοκιμών, όπως τα είδη *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Πριν από τη χρήση εναλλακτικών ειδών, θα πρέπει να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις εκ των προτέρων:

- Θα πρέπει να ταυτοποιούνται με αδιαμφισβήτητο τρόπο,
- Θα πρέπει να αιτιολογείται η επιλογή του είδους,
- Θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι η αναπαραγωγική βιολογία περιλαμβάνεται στη φάση δοκιμής ώστε να αποτελεί δυνητικό στόχο κατά τη διάρκεια της έκθεσης,
- Θα πρέπει να είναι γνωστός ο κύκλος ζωής: ηλικία κατά την ωρίμανση, διάρκεια ανάπτυξης των αυγών και στάδια που υπόκεινται σε έκθεση,
- Θα πρέπει να παρέχονται οι βέλτιστες συνθήκες για ανάπτυξη και αναπαραγωγή μέσω του υποστρώματος δοκιμής και της παροχής τροφής,
- Η μεταβλητότητα θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή για τον ακριβή και αξιόπιστο υπολογισμό της τοξικότητας.

Προσάρτημα 4

Εκχύλιση και καταμέτρησή των ζώων

1. Μπορούν να χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι εκχύλισης.

- 1.α. Πρώτη μέθοδος: Μπορεί να χρησιμοποιείται ένας εκχυλιστής κλίσης με ελεγχόμενη θερμοκρασία που βασίζεται στις αρχές του MacFadyen (1). Η θερμότητα προέρχεται από ένα θερμαντικό στοιχείο στο επάνω μέρος του κουτιού εκχύλισης (ρυθμίζεται μέσω ενός θερμίστορ που είναι τοποθετημένο στην επιφάνεια του δείγματος εδάφους). Η θερμοκρασία στο υγρό ψύξης που περιβάλλει το δοχείο συλλογής ρυθμίζεται μέσω ενός θερμίστορ που βρίσκεται στην επιφάνεια του κουτιού συλλογής (κάτω από το βασικό έδαφος). Τα θερμίστορ είναι συνδεδεμένα σε μια μονάδα ελέγχου με δυνατότητα προγραμματισμού που ανεβάζει τη θερμοκρασία ανάλογα με το χρονοδιάγραμμα που έχει προγραμματιστεί εκ των προτέρων. Τα ζώα συλλέγονται στο ψυχόμενο κουτί συλλογής (2 °C) που περιέχει μια στρώση γύψου/άνθρακα στον πυθμένα. Η εκχύλιση ξεκινάει στους 25 °C και η θερμοκρασία αυξάνεται αυτόματα κάθε 12 ώρες κατά 5 °C και διαρκεί συνολικά 48 ώρες. Μετά από 12 ώρες στους 40 °C, η εκχύλιση ολοκληρώνεται.
- 1.β. Δεύτερη μέθοδος: Μετά την πειραματική περίοδο επώασης, ο αριθμός των νεαρών κολλεμβόλων που υπάρχουν εκτιμάται μέσω της επίπλευσης. Για τον σκοπό αυτό, η δοκιμή διεξάγεται στα δοχεία με όγκο περίπου 250 ml. Στο τέλος της δοκιμής, προστίθενται περίπου 200 ml απεσταγμένου νερού. Το έδαφος αναδεύεται απαλά με ένα λεπτό πινέλο για να επιπλεύσουν τα κολλέμβολα στην επιφάνεια του νερού. Μπορεί να προστεθεί στο νερό μια μικρή ποσότητα μαύρης χρωστικής Kentmere, περίπου 0,5 ml, για την αύξηση της αντίθεσης μεταξύ του νερού και των λευκών κολλεμβόλων ώστε να διευκολυνθεί η καταμέτρηση. Η χρωστική δεν είναι τοξική για τα κολλέμβολα.

2. Καταμέτρηση:

Οι καταμετρήσεις των αριθμών μπορούν να διεξάγονται με το μάτι ή με ένα κοινό μικροσκόπιο με τη χρήση ενός πλέγματος που τοποθετείται επάνω από το δοχείο επίπλευσης ή με φωτογράφιση της επιφάνειας κάθε δοχείου, ακολουθούμενη από την καταμέτρηση των κολλεμβόλων στις μεγεθυμένες εικόνες ή σε διαφάνειες προβολής. Οι καταμετρήσεις μπορούν επίσης να διεξάγονται με τη χρήση τεχνικών επεξεργασίας ψηφιακών εικόνων (12). Όλες οι τεχνικές θα πρέπει να επικυρώνονται.

Προσάρτημα 5

Προσδιορισμός τη μέγιστης υδατοχωρητικότητας του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό της μέγιστης υδατοχωρητικότητας (WHC) του εδάφους έχει αποδειχθεί κατάλληλη. Περιγράφεται στο προσάρτημα Γ του προτύπου ISO DIS 11268-2 (Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction) (Ποιότητα εδάφους — Επιδράσεις ρυπαντικών ουσιών στους γαιοσκώληκες (*Eisenia fetida*). Μέρος 2: Προσδιορισμός επιδράσεων στην αναπαραγωγή).

Συλλέγετε μια καθορισμένη ποσότητα (π.χ. 5 g) του υπεδάφους δοκιμής χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη συσκευή δειγματοληψίας (κοχλιωτός σωλήνας κ.λπ). Καλύπτετε το κάτω μέρος του σωλήνα με ένα βρεγμένο κομμάτι διηθητικού χαρτιού και, στη συνέχεια, τοποθετείτε τον σε μια βάση στο υδατόλουτρο. Ο σωλήνας θα πρέπει να βυθίζεται σταδιακά μέχρι η στάθμη του νερού να ανέβει επάνω ως την επιφάνεια του εδάφους. Στη συνέχεια, θα πρέπει να παραμένει μέσα στο νερό για περίπου τρεις ώρες. Επειδή δεν μπορεί να συγκρατηθεί όλο το νερό που έχει απορροφηθεί από το τριχοειδές του εδάφους, το δείγμα εδάφους θα πρέπει να αποστραγγίζεται για περίοδο δύο ωρών με τοποθέτηση του σωλήνα σε ένα στρώμα από πολύ υγρή, λεπτοαλεσμένη χαλαζιακή άμμο που βρίσκεται μέσα σε ένα καλυμμένο δοχείο (για την αποφυγή της ξήρανσης). Κατόπιν, το δείγμα θα πρέπει να ζυγίζεται, ξηραμένο στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Η υδατοχωρητικότητα (WHC) θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{WHC (σε \% ξηρής μάζας)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Όπου:

S = υπόστρωμα κορεσμένο με νερό + μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού

T = απόβαρο (μάζα σωλήνα + μάζα διηθητικού χαρτιού)

D = ξηρή μάζα υποστρώματος

Προσάρτημα 6

Προσδιορισμός του pH του εδάφους

Η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό του pH ενός εδάφους βασίζεται στην περιγραφή που παρέχεται από το πρότυπο ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (Ποιότητα εδάφους — Προσδιορισμός του pH).

Μια καθορισμένη ποσότητα εδάφους ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 12 ώρες. Κατόπιν, παρασκευάζεται ένα εναιώρημα του εδάφους (που περιέχει τουλάχιστον 5 gr εδάφους) έτσι ώστε ο όγκος του να αυξηθεί κατά πέντε φορές χρησιμοποιώντας είτε διάλυμα χλωριούχου καλίου (KCl) 1 M αναλυτικής καθαρότητας είτε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) 0,01 M αναλυτικής καθαρότητας. Στη συνέχεια, το εναιώρημα ανακινείται επιμελώς για πέντε λεπτά και μετά αφήνεται να καθιζάνει για τουλάχιστον 2 ώρες, αλλά όχι για περισσότερο από 24 ώρες. Το pH της υγρής φάσης μετριέται, στη συνέχεια, με χρήση ενός πεχάμετρου που έχει βαθμονομηθεί πριν από κάθε μέτρηση με τη χρήση κατάλληλης σειράς ρυθμιστικών διαλυμάτων (π.χ. pH 4,0 και 7,0).

Γ.40. ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΚΥΚΛΟ ΖΩΗΣ ΧΕΙΡΟΝΟΜΙΔΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ Ή ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 233 του ΟΟΣΑ (2010). Σκοπός της είναι η εκτίμηση των επιδράσεων της ισόβιας έκθεσης σε χημικές ουσίες των δίπτερων γλυκών υδάτων του είδους *Chironomus* sp., με πλήρη κάλυψη της 1^{ης} γενιάς (πατρική γενιά -γενιά P) και του πρώτου μέρους της 2^{ης} γενιάς (πρώτη θυγατρική γενιά -γενιά F1). Αποτελεί μια επέκταση των υφιστάμενων μεθόδων δοκιμών Γ.28 (1) ή Γ.27 (15), με χρήση σεναρίου έκθεσης με εμβολιασμένο νερό ή με εμβολιασμένο ίζημα, αντίστοιχα. Στη μέθοδο λαμβάνονται υπόψη τα υπάρχοντα πρωτόκολλα δοκιμών τοξικότητας για τα είδη *Chironomus riparius* και *Chironomus dilutus* (πρώην *C. tentans* (2)) που έχουν καταρτιστεί στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) και έχουν στη συνέχεια υποβληθεί σε κυκλική δοκιμή (1) (7) (10) (11) (12). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη χειρονομίδων για τα οποία υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση, π.χ. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Η πλήρης διάρκεια της έκθεσης είναι περίπου 44 ημέρες για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και περίπου 100 ημέρες για το *C. dilutus*.
2. Σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών περιγράφονται και τα δύο σενάρια έκθεσης σε νερό και σε ίζημα. Η επιλογή ενός κατάλληλου σεναρίου έκθεσης εξαρτάται από την επιδιωκόμενη εφαρμογή της δοκιμής. Το σενάριο της έκθεσης στο νερό, με εμβολιασμό της στήλης ύδατος, σκοπό έχει να προσομοιώσει ένα περιστατικό μετακίνησης ψευαστικού νέφους φυτοφαρμάκων και καλύπτει το αρχικό μέγιστο της συγκέντρωσης στα επιφανειακά ύδατα. Ο εμβολιασμός του νερού εξυπηρετεί, επίσης, και άλλους τύπους έκθεσης (συμπεριλαμβανομένων των χημικών διαρροών), αλλά όχι τις διαδικασίες συσώρευσης εντός του ιζήματος, των οποίων η διάρκεια υπερβαίνει τη διάρκεια της δοκιμής. Σε αυτήν την περίπτωση, καθώς και όταν η απορροή είναι η κύρια οδός εισόδου των φυτοφαρμάκων στις υδάτινες μάζες, ενδεχομένως να είναι καταλληλότερος ένας σχεδιασμός με εμβολιασμένο ίζημα. Εάν υπάρχουν άλλα ενδιαφέροντα σενάρια έκθεσης, ο σχεδιασμός της δοκιμής μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα. Για παράδειγμα, εάν η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ της υδάτινης φάσης και του στρώματος ιζήματος δεν αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος και η προσρόφηση στο ίζημα πρέπει να ελαχιστοποιηθεί, μπορεί να εξεταστεί η περίπτωση χρήσης ενός βοηθητικού τεχνητού ιζήματος (π.χ. χαλαζιακή άμμος).
3. Οι χημικές ουσίες για τις οποίες απαιτείται έλεγχος σε οργανισμούς που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να παραμένουν στο ίζημα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι οργανισμοί που διαβιούν σε ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται μέσω διάφορων οδών. Η σχετική σημασία της κάθε οδού έκθεσης, καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για να συμβάλει στη συνολική τοξική επίδραση, εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας. Για χημικές ουσίες ισχυρής προσρόφησης ή για χημικές ουσίες που συνδέονται με ιζήματα με ομοιοπολικούς δεσμούς, η πρόσληψη μολυσμένων τροφών μπορεί να είναι μια σημαντική οδός έκθεσης. Προκειμένου να μην υποτιμάται η τοξικότητα των εξαιρετικά λιπόφιλων χημικών ουσιών, μπορεί να εξετάζεται η προσθήκη της τροφής στο ίζημα πριν από την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (βλ. παράγραφο 31). Επομένως, είναι δυνατόν να συμπεριλαμβάνονται όλες οι οδοί έκθεσης και όλα τα στάδια ζωής.
4. Τα μετρούμενα τελικά σημεία είναι ο συνολικός αριθμός εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), ο ρυθμός ανάπτυξης (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), η αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών ενήλικων ατόμων (για την πατρική και την πρώτη θυγατρική γενιά), ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό (μόνο για την πατρική γενιά) και η γονιμότητα των αλυσίδων αυγών (μόνο για την πατρική γενιά).
5. Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση μορφοποιημένου ιζήματος, το οποίο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυσικά ιζήματα:
 - η πειραματική μεταβλητότητα μειώνεται, επειδή σχηματίζει μια αναπαραγόμενη “τυποποιημένη μήτρα” και εκλείπει η ανάγκη εξεύρεσης αμόλυντου και καθαρού ιζήματος,
 - οι δοκιμές μπορούν να αρχίζουν ανά πάσα στιγμή, χωρίς να αντιμετωπίζουν εποχιακή μεταβλητότητα του ιζήματος δοκιμής και δεν απαιτείται προκατεργασία του ιζήματος για την απομάκρυνση της αυτόχθονης πανίδας,
 - το κόστος είναι μειωμένο σε σύγκριση με τη συλλογή επαρκών ποσοτήτων ιζημάτων από το ύπαιθρο που απαιτούνται για δοκιμές ρουτίνας,
 - το μορφοποιημένο ίζημα καθιστά δυνατές τις συγκρίσεις τοξικότητας μεταξύ μελετών και την ανάλογη κατάταξη των χημικών ουσιών (3).
6. Οι χρησιμοποιούμενοι ορισμοί παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

7. Προνύμφες χειρονομίδων πρώτου σταδίου εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε σύστημα ιζήματος-νερού. Η δοκιμή αρχίζει με την τοποθέτηση προνυμφών πρώτου σταδίου (πατρική γενιά) σε ποτήρια ζέσεως που περιέχουν εμβολιασμένο ιζημα ή εναλλακτικά η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται μέσα στο νερό μετά την προσθήκη των προνυμφών. Αξιολογείται η εμφάνιση των χειρονομίδων, ο χρόνος μέχρι την εμφάνιση και η αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων. Τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα μεταφέρονται σε κλωβούς αναπαραγωγής προς διευκόλυνση της δημιουργία σμήνους, του ζευγαρώματος και της ωοτοκίας. Αξιολογείται ο αριθμός των αλυσίδων αυγών και η γονιμότητά τους. Από αυτές τις αλυσίδες αυγών, λαμβάνονται προνύμφες πρώτου σταδίου της πρώτης θυγατρικής γενιάς. Αυτές οι προνύμφες τοποθετούνται σε προσφάτως παρασκευασμένα ποτήρια ζέσεως (διαδικασία εμβολιασμού όπως και για την πατρική γενιά) για να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα της πρώτης θυγατρικής γενιάς μέσω μιας εκτίμησης της εμφάνισής τους, του χρόνου μέχρι την εμφάνιση και της αναλογίας φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων (μια σχηματική παρουσίαση της δοκιμής κύκλου ζωής παρέχεται στο προσάρτημα 5). Όλα τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση είτε ενός μοντέλου παλινδρόμησης, ώστε να εκτιμηθεί η συκέντρωση η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει X % μείωση του σχετικού τελικού σημείου, είτε δοκιμασιών υπόθεσης για τον προσδιορισμό της συκέντρωσης στην οποία δεν παρατηρείται επίδραση (NOEC). Στη δεύτερη περίπτωση, απαιτείται σύγκριση μεταξύ των αποκρίσεων αγωγής και των κατάλληλων αποκρίσεων μαρτύρων, με τη χρήση στατιστικών δοκιμασιών. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στο σενάριο με εμβολιασμένο νερό, στην περίπτωση χημικών ουσιών ταχείας αποικοδόμησης, τα μεταγενέστερα στάδια ζωής της κάθε γενιάς (π.χ. φάση χρυσαλίδος) ενδεχομένως να εκτίθενται σε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο συκέντρωσης στο υπερκείμενο νερό από ότι οι προνύμφες πρώτου σταδίου. Εάν αυτό αποτελεί ανησυχία και απαιτείται συγκρίσιμο επίπεδο έκθεσης για κάθε στάδιο ζωής, μπορούν να εξεταστούν οι ακόλουθες τροποποιήσεις της μεθόδου δοκιμών:

- παράλληλες εκτελέσεις με εμβολιασμό σε διαφορετικά στάδια ζωής ή
- επαναλαμβανόμενος εμβολιασμός (ή ανανέωση υπερκείμενου νερού) του συστήματος δοκιμής και στις δύο φάσεις της δοκιμής (πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά), όπου τα διαστήματα μεταξύ εμβολιασμών (ανανεώσεων) θα πρέπει να προσαρμόζονται στα χαρακτηριστικά της πορείας που ακολουθεί η υπό δοκιμή χημική ουσία.

Οι εν λόγω τροποποιήσεις είναι εφικτές μόνο στο σενάριο με εμβολιασμένο νερό και όχι στο σενάριο με εμβολιασμένο ιζημα.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

8. Θα πρέπει να είναι γνωστά η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών και το $\log K_{ow}$ της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, η μετρούμενη ή υπολογιζόμενη κατανομή της στο ιζημα και η σταθερότητά της στο νερό και το ιζημα. Θα πρέπει να διατίθεται μια αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ιζημα, με γνωστή και δημοσιευμένη ακρίβεια (accuracy) και όριο ανίχνευσης. Στις χρήσιμες πληροφορίες συγκαταλέγονται ο συντακτικός τύπος και η καθαρότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Χρήσιμο στοιχείο είναι επίσης η χημική πορεία της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. διασπορά, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση κ.λπ.). Περαιτέρω καθοδήγηση για τις δοκιμές χημικών ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στο σημείο (16).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για να διασφαλίζεται ότι η ευαισθησία του εργαστηριακού πληθυσμού δεν έχει αλλάξει, μπορούν να ελέγχονται περιοδικά χημικές ουσίες αναφοράς. Όπως και με τις δαφνίδες, θα επαρκούσε η εκτέλεση μιας δοκιμής οξείας τοξικότητας 48 ωρών (ακολουθώντας το σημείο 17). Ωστόσο, μέχρι να υπάρχει διαθέσιμη μια επικυρωμένη κατευθυντήρια γραμμή για την οξεία τοξικότητα, μπορεί να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μιας δοκιμασίας χρόνιας τοξικότητας σύμφωνα με το κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος προσαρτήματος. Μερικές από τις τοξικές ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε κυκλικές δοκιμές και μελέτες επικύρωσης είναι το λινδάνιο, η τριφλουραλίνη, η πενταχλωροφαινόλη, το χλωριούχο κάδμιο και το χλωριούχο κάλιο (1) (3) (6) (7) (18).

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Για να θεωρηθεί έγκυρη η δοκιμή, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:
- το μέσο ποσοστό εμφάνισης στην αγωγή-μάρτυρα θα πρέπει να ανέρχεται σε τουλάχιστον 70 % στο τέλος της περιόδου έκθεσης και για τις δύο γενιές (1) (7),
 - για τα *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, το 85 % του συνόλου των εμφανιζόμενων ενήλικων χειρονόμων από την αγωγή-μάρτυρα και στις δύο γενιές θα πρέπει να προκύπτει μεταξύ της 12ης και 23ης ημέρας μετά την εισαγωγή των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία. Για το *C. dilutus*, είναι αποδεκτή μια περίοδος 20 έως 65 ημερών,

- η μέση αναλογία φύλλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών ενήλικων ατόμων (ως κλάσμα θηλυκών ή αρσενικών) στην αγωγή-μάρτυρα και στις δύο γενιές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,4, αλλά να μην υπερβαίνει την τιμή 0,6,
- για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, ο αριθμός των αλυσίδων αυγών στους μάρτυρες της πατρικής γενιάς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,6 ανά θηλυκό που προστίθεται στον κλωβό αναπαραγωγής,
- το κλάσμα των γόνιμων αλυσίδων αυγών σε κάθε κλωβό αναπαραγωγής των μαρτύρων της πατρικής γενιάς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,6,
- στο τέλος της περιόδου έκθεσης και για τις δύο γενιές, θα πρέπει να μετρώνται το pH και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε κάθε δοχείο. Η συγκέντρωση οξυγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα (ASV (!)) και το pH του υπερκείμενου νερού να είναι της τάξης του 6-9 σε όλα τα δοχεία δοκιμής,
- η θερμοκρασία του νερού δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από $\pm 1,0$ °C.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Δοχεία δοκιμής και κλωβοί αναπαραγωγής

11. Οι προνύμφες εκτίθενται σε ποτήρια ζέσεως των 600 ml με διάμετρο περίπου 8,5 cm (βλ. προσάρτημα 5). Κατάλληλα είναι και άλλα δοχεία, αλλά θα πρέπει να εξασφαλίζουν κατάλληλο βάθος υπερκείμενου νερού και ιζήματος. Η επιφάνεια του ιζήματος θα πρέπει να είναι επαρκής για την παροχή 2 έως 3 cm² ανά προνύμφη. Η αναλογία του βάρους του στρώματος ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι περίπου 1:4. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κλωβοί αναπαραγωγής (τουλάχιστον 30 cm και στις τρεις διαστάσεις) με γάζα (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm) στο επάνω μέρος και σε μία τουλάχιστον πλευρά του κλωβού (βλ. προσάρτημα 5). Σε κάθε κλωβό, τοποθετείται δοχείο κρυστάλλωσης 2 l για την ωστοκία, το οποίο περιέχει νερό δοκιμής και ιζημα. Και για το δοχείο κρυστάλλωσης, η αναλογία του βάρους του στρώματος ιζήματος προς το βάθος του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να είναι περίπου 1:4. Αφού συλλεχθούν οι αλυσίδες αυγών από το δοχείο κρυστάλλωσης, τοποθετούνται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 12 βοθρίων (μία αλυσίδα ανά βοθρίο το οποίο περιέχει τουλάχιστον 2,5 ml νερό από το εμβολιασμένο δοχείο κρυστάλλωσης) και, στη συνέχεια, οι πλάκες καλύπτονται με ένα καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης άλλα δοχεία που είναι κατάλληλα για τη φύλαξη των αλυσίδων αυγών. Με εξαίρεση τις πλάκες μικροτιτλοδότησης, όλα τα δοχεία δοκιμής και ο λοιπός εξοπλισμός που θα έρχονται σε επαφή με το σύστημα δοκιμής θα πρέπει να είναι κατασκευασμένα εξ ολοκλήρου από γυαλί ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό (π.χ. πολυτετραφθορααιθυλένιο).

Επιλογή ειδών

12. Το είδος που χρησιμοποιείται στη δοκιμή είναι κατά προτίμηση το *Chironomus riparius*. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το *C. yoshimatsui*. Κατάλληλο είναι επίσης το *C. dilutus*, αλλά είναι πιο δύσκολο στη μεταχείριση και απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δοκιμής. Οι λεπτομέρειες των μεθόδων καλλιέργειας του *C. riparius* παρατίθενται στο προσάρτημα 2. Πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας είναι επίσης διαθέσιμες για τα είδη *C. dilutus* (5) και *C. yoshimatsui* (14). Η ταυτοποίηση των ειδών θα πρέπει να επιβεβαιώνεται πριν από τη δοκιμή, ενώ δεν απαιτείται πριν από κάθε δοκιμή, εάν οι οργανισμοί προέρχονται από εσωτερική καλλιέργεια.

Ίζημα

13. Κατά προτίμηση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μορφοποιημένα ιζήματα (που ονομάζονται επίσης ανασυσταθέντα, τεχνητά ή συνθετικά ιζήματα). Ωστόσο, εάν χρησιμοποιείται φυσικό ιζημα, θα πρέπει να έχει χαρακτηριστεί (τουλάχιστον το pH, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, ενώ συνιστάται επίσης ο προσδιορισμός άλλων παραμέτρων, όπως η αναλογία C/N και η κοκκομετρία) και να είναι απαλλαγμένο από τυχόν μόλυνση και άλλους οργανισμούς που ενδέχεται να ανταγωνιστούν ή να καταναλώσουν τις προνύμφες χειρονομίδων. Επίσης συνιστάται, πριν από τη δοκιμή, ο εγκλιματισμός των ιζημάτων για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες της δοκιμής. Όπως περιγράφεται στο σημείο (1), συνιστάται η χρήση του ακόλουθου μορφοποιημένου ιζήματος (1) (20) (21):
 - α. 4-5 % (ξηρό βάρος) τύρφης: με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5 έως 6,0. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται τύρφη σε μορφή σκόνης, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και μόνο αερόξηρη,
 - β. 20 % (ξηρό βάρος) καολινιτικής αργίλου (περιεκτικότητα σε καολινίτη κατά προτίμηση άνω του 30 %),

(!) Στους 20 °C υπό κανονική ατμοσφαιρική πίεση, η τιμή ASV στα γλυκά νερά ισούται με 9,1 mg/l (το 60 % ισούται με 5,46 mg/l)

- γ. 75-76 % (ξηρό βάρος) χαλαζιακής άμμου (θα πρέπει να επικρατεί η λεπτή άμμος με ποσοστό σωματιδίων μεγέθους μεταξύ 50 και 200 μm πάνω από 50 %),
- δ. Προστίθεται απιονισμένο νερό για να επιτευχθεί υγρασία του τελικού μείγματος της τάξης του 30–50 %,
- ε. Προστίθεται ανθρακικό ασβέστιο χημικώς καθαρό (CaCO₃) για τη ρύθμιση του pH του τελικού μείγματος του ιζήματος σε 7,0 ± 0,5,
- στ. Η περιεκτικότητα του τελικού μίγματος σε οργανικό άνθρακα θα πρέπει να είναι 2 % (± 0,5 %) και να ρυθμίζεται με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων τύρφης και άμμου, σύμφωνα με τα στοιχεία α) και γ).
14. Η πηγή της τύρφης, της καολινιτικής αργίλου και της άμμου θα πρέπει να είναι γνωστή. Τα συστατικά των ιζημάτων θα πρέπει να ελέγχονται για απουσία χημικής μόλυνσης (π.χ. βαρέα μέταλλα, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις). Στο προσάρτημα 3, παρατίθεται παράδειγμα παρασκευής μορφοποιημένου ιζήματος. Επίσης, επιτρέπεται η ανάμειξη των ξηρών συστατικών, εάν καταδεικνύεται ότι, μετά την προσθήκη υπερκείμενου νερού, δεν διαχωρίζονται τα συστατικά του ιζήματος (π.χ. επίπλευση σωματιδίων τύρφης) και ότι η τύρφη ή το ίζημα είναι επαρκώς εγκλιματισμένα.

Νερό

15. Κάθε νερό που είναι σύμφωνο με τα χημικά χαρακτηριστικά του αποδεκτού νερού αραιώσης, τα οποία απαριθμούνται στα προσάρτηματα 2 και 4, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Οποιοδήποτε κατάλληλο νερό, φυσικό (επιφανειακά ή υπόγεια ύδατα), ανασυσταθέν (βλ. προσάρτημα 2) ή αποχλωριωμένο νερό βρύσης είναι αποδεκτό ως νερό καλλιέργειας και δοκιμής, εάν οι χειρονομίες επιβιώνουν σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας και των δοκιμών χωρίς να επιδεικνύουν σημεία πίεσης. Κατά την έναρξη της δοκιμής, το pH του νερού δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9 και η συνολική σκληρότητα να μην είναι μεγαλύτερη από 400 mg/l ως CaCO₃. Ωστόσο, εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elenđt M4 στην περίπτωση αυτή). Το ίδιο είδος νερού θα πρέπει να χρησιμοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, που απαριθμούνται στο προσάρτημα 4, θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον δύο φορές ετησίως ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για σημαντική μεταβολή τους.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο νερό

16. α. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής υπολογίζονται βάσει των συγκεντρώσεων στη στήλη ύδατος, δηλαδή στο νερό που υπέρκειται του ιζήματος. Τα διαλύματα δοκιμής των επιλεγμένων συγκεντρώσεων παρασκευάζονται συνήθως με αραιώση ενός διαλύματος παρακαταθήκης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης θα πρέπει κατά προτίμηση να παρασκευάζονται με διάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό δοκιμής. Η χρήση διαλυτών ή μέσων διασποράς μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλα συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Στους διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η ακετόνη, ο μονοαιθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη. Μέσα διασποράς που μπορούν να χρησιμοποιούνται είναι το Cremophor RH40, το Tween 80, η μεθυλοκυτταρίνη 0,01 % και το HCO-40. Η συγκέντρωση του μέσου διαλυτοποίησης στο τελικό μέσο δοκιμής θα πρέπει να είναι ελάχιστη (δηλαδή ≤ 0,1 ml/l) και η ίδια σε κάθε αγωγή. Όταν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης, αυτό δεν θα πρέπει να έχει σημαντικές επιδράσεις στην επιβίωση, όπως γίνεται αντιληπτό με έναν μάρτυρα του διαλύτη σε σύγκριση με έναν αρνητικό μάρτυρα (νερού). Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων υλικών.

Διαλύματα παρακαταθήκης — Εμβολιασμένο ίζημα

16. β. Τα εμβολιασμένα ιζήματα με την επιλεγμένη συγκέντρωση παρασκευάζονται συνήθως με την απευθείας προσθήκη διαλύματος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο ίζημα. Διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που έχει διαλυθεί σε απιονισμένο νερό αναμειγνύεται με το μορφοποιημένο ίζημα με τη βοήθεια πρέσας, αναμεικτή τροφών ή χειρωνακτικά. Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να διαλυθεί σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο κατάλληλου οργανικού διαλύτη (π.χ. εξάνιο, ακετόνη ή χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με 10 g λεπτής χαλαζιακής άμμου για κάθε δοχείο δοκιμής. Ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί και θα πρέπει να απομακρύνεται εντελώς από την άμμο. Στη συνέχεια, η άμμος αναμειγνύεται με την

κατάλληλη ποσότητα ιζήματος. Για τη διαλυτοποίηση, τη διασπορά ή τη γαλακτωματοποίηση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα που εξατμίζονται εύκολα. Υπενθυμίζεται ότι, κατά την παρασκευή του ιζήματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η άμμος που παρέχεται από το μείγμα υπό δοκιμή χημικής ουσίας και άμμου (δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να αναλύονται επιμέρους δείγματα για τον προσδιορισμό του βαθμού ομοιογένειας.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

17. Ο σχεδιασμός της δοκιμής αφορά την επιλογή του αριθμού και της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων δοκιμής, του αριθμού των δοχείων για κάθε συγκέντρωση, του αριθμού των προνυμφών ανά δοχείο, του αριθμού των δοχείων κρυστάλλωσης και των κλωβών αναπαραγωγής. Παρακάτω περιγράφονται σχεδιασμοί για την EC_x, την NOEC και την οριακή δοκιμή.

Σχεδιασμός για ανάλυση παλινδρόμησης

18. Η συγκέντρωση επίδρασης (EC_x) και το εύρος συγκεντρώσεων που ενδιαφέρουν σε σχέση με την επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να καλύπτονται από τη δοκιμή, έτσι ώστε να μην γίνεται παρέκταση του τελικού σημείου εκτός των ορίων των παραγόμενων δεδομένων. Θα πρέπει να αποφεύγεται η παρέκταση πολύ χαμηλότερα από την κατώτατη συγκέντρωση ή πάνω από την ανώτατη συγκέντρωση. Η διεξαγωγή προκαταρκτικής δοκιμής καθορισμού εύρους σύμφωνα με τις μεθόδους δοκιμών Γ.27 ή Γ.28 ενδέχεται να είναι χρήσιμη για την επιλογή του κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.
19. Για μια προσέγγιση EC_x, απαιτούνται τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις, με οκτώ επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Για κάθε συγκέντρωση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο κλωβοί αναπαραγωγής (Α και Β). Οι οκτώ επαναλήψεις χωρίζονται σε δύο ομάδες των τεσσάρων επαναλήψεων που χρησιμοποιούνται για κάθε κλωβό αναπαραγωγής. Αυτή η συγχώνευση των επαναλήψεων είναι αναγκαία λόγω του αριθμού των χειρονόμων που απαιτείται να υπάρχουν στον κλωβό για ορθές εκτιμήσεις της αναπαραγωγής. Ωστόσο, η πρώτη θυματρική γενιά έχει και πάλι οκτώ επαναλήψεις, που ξεκινούν από τους εκτιθέμενους πληθυσμούς στους κλωβούς αναπαραγωγής. Ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 2 (εξαιρέση θα μπορούσε να γίνει σε περιπτώσεις όπου η καμπύλη δόσης-απόκρισης έχει μικρή κλίση). Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε αγωγή μπορεί να μειώνεται στις έξι (τρεις σε κάθε κλωβό αναπαραγωγής), εάν αυξάνεται ο αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής με διαφορετικές αποκρίσεις. Η αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων ή η μείωση του μεγέθους των διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων δοκιμής τείνουν να οδηγούν σε στενότερα διαστήματα εμπιστοσύνης γύρω από την EC_x.

Σχεδιασμός για την εκτίμηση της τιμής NOEC

20. Για μια προσέγγιση NOEC, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής με τουλάχιστον οκτώ επαναλήψεις (4 για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, Α και Β) και ο συντελεστής μεταξύ των συγκεντρώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από δύο. Ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να είναι επαρκής για να εξασφαλίζεται κατάλληλη στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % ($\alpha = 0,05$). Για τον ρυθμό ανάπτυξης, την αναπαραγωγική απόδοση και τη γονιμότητα, κατάλληλη είναι συνήθως μια ανάλυση διασποράς (ANOVA), ακολουθούμενη από τη δοκιμασία Dunnett ή τη δοκιμασία Williams (22-25). Για τον λόγο εμφάνισης και την αναλογία φύλου, κατάλληλες μπορεί να είναι οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (με διόρθωση κατά Bonferroni) ή Mantel-Haentzel.

Οριακή δοκιμή

21. Εάν δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση στην προαιρετική προκαταρκτική δοκιμή καθορισμού εύρους έως μια μέγιστη συγκέντρωση, είναι δυνατόν να διεξαχθεί οριακή δοκιμή (μία συγκέντρωση δοκιμής και μάρτυρας(-ες)). Σκοπός της οριακής δοκιμής είναι να δείξει ότι κάθε τοξική επίδραση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εντοπίζεται σε επίπεδα μεγαλύτερα από την οριακή συγκέντρωση που ελέγχεται. Συνιστώνται 100 mg/l για το νερό και 1 000 mg/kg (ξηρό βάρος) για το ίζημα. Συνήθως, χρειάζονται τουλάχιστον οκτώ επαναλήψεις, τόσο για την αγωγή όσο και για τον μάρτυρα. Θα πρέπει να καταδεικνύεται επαρκής στατιστική ισχύς για τον εντοπισμό διαφοράς 20 % από τον μάρτυρα με επίπεδο σημαντικότητας 5 % ($\alpha = 0,05$). Με μετρικές αποκρίσεις (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης), η δοκιμασία t είναι κατάλληλη στατιστική μέθοδος, εάν τα δεδομένα πληρούν τις απαιτήσεις αυτής της δοκιμής (κανονικότητα, ομοιογενείς διασπορές). Εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t άνισης διασποράς ή μια μη παραμετρική δοκιμασία, όπως η Wilcoxon-Mann-Whitney. Για τον λόγο εμφάνισης, κατάλληλη είναι η δοκιμή Fisher's exact.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Προετοιμασία του συστήματος νερού-ιζήματος (εμβολιασμός νερού)

22. α. Μορφοποιημένο ιζήμα (βλ. παράγραφους 13-14 και προσάρτημα 3) προστίθεται σε κάθε δοχείο δοκιμής και δοχείο κρυστάλλωσης για να σχηματιστεί ένα στρώμα τουλάχιστον 1,5 cm (για το δοχείο κρυστάλλωσης μπορεί να είναι λίγο μικρότερο) αλλά 3 cm το μέγιστο. Νερό (βλ. παράγραφο 15) προστίθεται ώστε η αναλογία του βάρους του στρώματος ιζήματος προς το βάθος του νερού να μην υπερβαίνει το 1:4. Μετά την προετοιμασία των δοχείων δοκιμής, το σύστημα ιζήματος-νερού θα πρέπει να παραμένει υπό ήπιο αερισμό για περίπου επτά ημέρες πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου της πατρικής ή πρώτης θυγατρικής γενιάς (βλ. παράγραφο 14 και προσάρτημα 3). Το σύστημα ιζήματος-νερού των δοχείων κρυστάλλωσης δεν αερίζεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής, επειδή δεν χρειάζεται να υποστηριχτεί η επιβίωση των προνυμφών (οι αλυσίδες αυγών έχουν ήδη συλληχθεί πριν από την εκκόλαψη). Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επανεναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ιζήμα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό. Αμέσως μετά ο δίσκος αφαιρείται. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές.

Προετοιμασία του συστήματος νερού-ιζήματος (εμβολιασμένο ιζήμα)

22. β. Τα εμβολιασμένα ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί σύμφωνα με την παράγραφο 16β τοποθετούνται στα δοχεία και στο δοχείο κρυστάλλωσης και προστίθεται υπερκείμενο νερό για να επιτευχθεί αναλογία όγκων ιζήματος-νερού 1:4. Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να κυμαίνεται από 1,5 έως 3 cm (για το δοχείο κρυστάλλωσης μπορεί να είναι λίγο μικρότερο). Για να αποφεύγεται ο διαχωρισμός των συστατικών του ιζήματος και η επανεναιώρηση του λεπτόκοκκου υλικού κατά τη διάρκεια της προσθήκης νερού δοκιμής στη στήλη ύδατος, μπορεί να καλύπτεται το ιζήμα με πλαστικό δίσκο, ενώ το νερό χύνεται επάνω σε αυτό, και αμέσως μετά να αφαιρείται ο δίσκος. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες συσκευές. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ του ιζήματος και της υδατικής φάσης (4) (5) (7) (18). Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ιζήματα και τις χημικές ουσίες και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως πέντε εβδομάδες. Δεδομένου ότι οι χρόνοι αυτοί επιτρέπουν την αποικοδόμηση πολλών χημικών ουσιών, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται 48ωρη περίοδος εξισορρόπησης. Ωστόσο, όταν είναι γνωστό ότι ο χρόνος ημιζωής της αποικοδόμησης της χημικής ουσίας στο ιζήμα είναι πολύ μεγάλος (βλ. παράγραφο 8), ο χρόνος εξισορρόπησης μπορεί να παραταθεί. Στο τέλος αυτής της νέας περιόδου εξισορρόπησης, θα πρέπει να μετράται η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο υπερκείμενο νερό, στο ενδοπορικό νερό και στο ιζήμα, τουλάχιστον στα δοχεία με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση (βλ. παράγραφο 38). Οι εν λόγω αναλυτικοί προσδιορισμοί της υπό δοκιμή χημικής ουσίας επιτρέπουν τον υπολογισμό του ισοζυγίου μάζας και την έκφραση των αποτελεσμάτων με βάση τις μετρούμενες συγκεντρώσεις.
23. Τα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να καλύπτονται (π.χ. με γυάλινες πλάκες). Εάν είναι απαραίτητο, κατά τη διάρκεια της μελέτης το νερό μπορεί να συμπληρώνεται μέχρι τον αρχικό όγκο, ώστε να αναπληρώνεται η εξάτμιση. Αυτό θα πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέπεται τυχόν συσσώρευση αλάτων. Τα δοχεία κρυστάλλωσης στους κλωβούς αναπαραγωγής δεν καλύπτονται και μπορούν να ρυθμίζονται για να αναπληρώνεται η απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Ωστόσο, αυτό δεν χρειάζεται, επειδή οι αλυσίδες αυγών βρίσκονται σε επαφή με το νερό μόνο για περίπου μία ημέρα και τα δοχεία κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται μόνο κατά τη διάρκεια μιας σύντομης φάσης της δοκιμής.

Προσθήκη των οργανισμών δοκιμής

24. Τέσσερις έως πέντε ημέρες πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά, θα πρέπει να λαμβάνονται μάζες αυγών από την καλλιέργεια και να τοποθετούνται σε μικρά δοχεία με το μέσο καλλιέργειας. Μπορεί να χρησιμοποιείται παλιό μέσο από την αρχική καλλιέργεια ή προσφάτως παρασκευασμένο. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας μικρή ποσότητα τροφής, π.χ. λίγες σταγόνες διηθήματος από εναιώρημα λεπτοαλεσμένων νιφάδων τροφής για ψάρια (βλ. προσάρτημα 2). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μάζες φρέσκων αυγών. Κανονικά, οι προνύμφες αρχίζουν να εκκολάπτονται λίγες ημέρες μετά την τοποθέτηση των αυγών (2 έως 3 ημέρες για το *C. riparius* στους 20 °C και 1 έως 4 ημέρες για το *C. dilutus* στους 23 °C και το *C. yoshimatsui* στους 25 °C) και αναπτύσσονται σε τέσσερα στάδια, διάρκειας 4-8 ημερών το καθένα. Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται προνύμφες πρώτου σταδίου (48 ώρες, το μέγιστο, μετά την εκκόλαψη). Το στάδιο των προνυμφών μπορεί δυνητικά να εξακριβωθεί από το πλάτος της κεφαλικής κάψας (7).

25. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το σύστημα ιζήματος-νερού. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού διακόπτεται και δεν θα πρέπει να αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών (βλ. παράγραφο 32). Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλ. παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 120 (6 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση) για την προσέγγιση της EC_x και 160 για την προσέγγιση της NOEC (8 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση). Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, η έκθεση ξεκινάει με την προσθήκη των προνυμφών.

Εμβολιασμός του υπερκείμενου νερού

26. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου για την πατρική γενιά, η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιάζεται στη στήλη υπερκείμενου ύδατος και παρέχεται και πάλι ήπιος αερισμός (για πιθανές τροποποιήσεις του σχεδιασμού δοκιμής, βλ. παράγραφο 7). Μικροί όγκοι των διαλυμάτων παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ιζήμα. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, η έκθεση ξεκινάει με τον εμβολιασμό του νερού (δηλ. μία ημέρα μετά την προσθήκη των προνυμφών).

Συλλογή εμφανιζόμενων ενηλίκων

27. Οι εμφανιζόμενοι χειρονόμοι της πατρικής γενιάς συλλέγονται από τα δοχεία δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, αλλά κατά προτίμηση δύο, (βλ. σημείο 36) με τη χρήση αναρροφητήρα, φυσητήρα εμφυσησεως αέρα ή παρόμοιας συσκευής (βλ. προσάρτημα 5). Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υφίστανται ζημιά τα ενήλικα άτομα. Οι χειρονόμοι που συλλέγονται από τέσσερα δοχεία δοκιμής εντός μίας αγωγής απελευθερώνονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής στον οποίο έχουν εκχωρηθεί προηγουμένως. Την ημέρα της πρώτης εμφάνισης (αρσενικού), τα δοχεία κρυστάλλωσης εμβολιάζονται με έναν μικρό όγκο του διαλύματος παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας κάτω από την επιφάνεια του νερού (σχεδιασμός εμβολιασμένου νερού) με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ιζήμα. Η ονομαστική συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο δοχείο κρυστάλλωσης είναι ίδια όπως και στα δοχεία αγωγής που έχουν εκχωρηθεί στον συγκεκριμένο κλωβό αναπαραγωγής. Για τον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, τα δοχεία κρυστάλλωσης προετοιμάζονται περίπου την 11η ημέρα μετά την έναρξη της έκθεσης (δηλ. την προσθήκη προνυμφών πατρικής γενιάς) ώστε να γίνει εξισορρόπησή τους για περίπου 48 ώρες προτού παραχθούν οι πρώτες αλυσίδες αυγών.
28. Οι αλυσίδες αυγών συλλέγονται από το δοχείο κρυστάλλωσης στον κλωβό αναπαραγωγής με λαβίδα ή αμβλύ σιφώνιο. Κάθε αλυσίδα αυγών τοποθετείται μέσα σε ένα δοχείο που περιέχει μέσο καλλιέργειας από το δοχείο κρυστάλλωσης από το οποίο συλλέχθηκε (π.χ. ένα βοθρίο μιας μικροπλάκας 12 βοθρίων με τουλάχιστον 2,5 ml μέσου). Τα δοχεία με τις αλυσίδες αυγών καλύπτονται με ένα καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Οι αλυσίδες αυγών παραμένουν για παρατήρηση τουλάχιστον έξι μέρες αφού παραχθούν, ώστε να ταξινομηθούν ως γόνιμα ή μη γόνιμα.

Για την έναρξη της πρώτης θυγατρικής γενιάς, επιλέγονται τουλάχιστον τρεις, αλλά κατά προτίμηση έξι, γόνιμες αλυσίδες αυγών από κάθε κλωβό αναπαραγωγής, οι οποίες παραμένουν μαζί με λίγη τροφή ώστε να εκκολαφθούν. Αυτές οι αλυσίδες αυγών θα πρέπει να έχουν παραχθεί κατά την κορύφωση της ωοτοκίας, η οποία συνήθως συμβαίνει περίπου την 19η ημέρα της δοκιμής στους μάρτυρες. Στην ιδανική περίπτωση, η έναρξη της πρώτης θυγατρικής γενιάς σε όλες τις αγωγές γίνεται την ίδια ημέρα, αλλά αυτό ενδέχεται να μην είναι πάντα δυνατό εξαιτίας επιδράσεων στην ανάπτυξη των προνυμφών που σχετίζονται με τη χημική ουσία. Σε αυτήν την περίπτωση, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να εκκινηθούν αργότερα από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της αγωγής και τον μάρτυρα (διαλύτη).

29. α. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, η προετοιμασία του συστήματος ιζήματος-νερού για την πρώτη θυγατρική γενιά πραγματοποιείται με εμβολιασμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στη στήλη υπερκείμενου νερού περίπου 1 ώρα πριν από την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία δοκιμής. Μικροί όγκοι των διαλυμάτων της υπό δοκιμή χημικής ουσίας εφαρμόζονται κάτω από την επιφάνεια του νερού με τη βοήθεια σιφωνίου. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει στη συνέχεια να αναμειγνύεται με επιμέλεια, ώστε να μην διαταράσσεται το ιζήμα. Μετά τον εμβολιασμό, παρέχεται ήπιος αερισμός.
29. β. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, τα δοχεία έκθεσης που περιέχουν το σύστημα ιζήματος-νερού για την πρώτη θυγατρική γενιά προετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και για την πατρική γενιά.
30. Είκοσι προνύμφες πρώτου σταδίου (48 ώρες μετά την εκκόλαψη, το μέγιστο) για την πρώτη θυγατρική γενιά κατανέμονται τυχαία, με αμβλύ σιφώνιο, σε κάθε δοχείο δοκιμής που περιέχει το σύστημα ιζήματος-νερού. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προνυμφών πρώτου σταδίου στα δοχεία δοκιμής, ο αερισμός του νερού θα πρέπει να

διακόπτεται και να μην αποκαθίσταται πριν από την παρέλευση 24ώρου από την προσθήκη των προνυμφών. Ανάλογα με τον σχεδιασμό της δοκιμής (βλ. παραγράφους 19 και 20), ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων προνυμφών ανά συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 120 (6 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση) για την προσέγγιση της EC_x και 160 για την προσέγγιση της NOEC (8 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση).

Τροφή

31. Η παροχή τροφής στις προνύμφες μέσα στα δοχεία δοκιμής είναι απαραίτητη, κατά προτίμηση καθημερινά ή τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα. Η τροφή για ψάρια (εναιώρημα σε νερό ή λεπτοαλεσμένη τροφή, π.χ. Tetra-Min ή Tetra-Phyll, βλ. λεπτομέρειες στο προσάρτημα 2), σε ποσότητα 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg για το είδος *C. yoshimatsui*) ανά προνύμφη ανά ημέρα, είναι επαρκής ποσότητα τροφής για τις νεαρές προνύμφες κατά τις πρώτες 10 ημέρες της ανάπτυξής τους. Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορεί να χρειάζονται ελαφρώς μεγαλύτερες ποσότητες τροφής: 0,5-1,0 mg ανά προνύμφη ανά ημέρα θα πρέπει να είναι επαρκής ποσότητα για το υπόλοιπο της δοκιμής. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να μειώνεται σε κάθε αγωγή και στους μάρτυρες, σε περίπτωση που αναπτύσσονται μύκητες ή εάν παρατηρείται θνησιμότητα στους μάρτυρες. Εάν η ανάπτυξη μυκήτων δεν μπορεί να ανακοπεί, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Η τοξικολογική συνάφεια της έκθεσης μέσω της πρόσληψης τροφής είναι γενικά υψηλότερη για χημικές ουσίες με υψηλή συγγένεια προς οργανικό άνθρακα ή χημικές ουσίες που συνδέονται με το ίζημα με ομοιοπολικούς δεσμούς. Ως εκ τούτου, κατά τη δοκιμή χημικών ουσιών με τις εν λόγω ιδιότητες, η ποσότητα τροφής που απαιτείται για να διασφαλιστεί η επιβίωση και η φυσική ανάπτυξη των προνυμφών μπορεί να προστίθεται στο μορφοποιημένο ίζημα πριν από την περίοδο σταθεροποίησης, ανάλογα με τη ρυθμιστική απαίτηση. Για την αποφυγή της υποβάθμισης της ποιότητας του νερού, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φυτικό υλικό αντί της τροφής για ψάρια, π.χ. προσθήκη 0,5 % (ξηρό βάρος) λεπτοαλεσμένων φύλλων τσουκνίδας (*Urtica dioica*), μουριάς (*Morus alba*), λευκού τριφυλλιού (*Trifolium repens*), σπανακιού (*Spinacia oleracea*) ή άλλων φυτικών υλών (*Cerophyl* ή *α-κυτταρίνη*). Η προσθήκη του πλήρους σιτηρεσίου από μια οργανική πηγή τροφής στο ίζημα πριν από τον εμβολιασμό δεν είναι ασήμαντο ζήτημα όσον αφορά την ποιότητα του νερού και τη βιολογική απόδοση (21), ούτε τυποποιημένη μέθοδος. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική (19) (26). Οι ενήλικοι χειρονόμοι στον κλωβό αναπαραγωγής δεν χρειάζονται σίτιση κανονικά, αλλά η αναπαραγωγική απόδοση και η γονιμότητα ενισχύονται όταν ένα τεμάχιο βαμβακιού εμποτισμένο σε κορεσμένο διάλυμα σακχαρόζης παρέχεται ως πηγή τροφής για τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα (34).

Συνθήκες επώασης

32. Παρέχεται ήπιος αερισμός του υπερκείμενου νερού στα δοχεία δοκιμής 24 ώρες μετά την προσθήκη των προνυμφών πρώτου σταδίου και των δύο γενεών και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής (θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου να μην μειώνεται σε επίπεδα κάτω από το 60 % της ASV). Ο αερισμός παρέχεται μέσω γυάλινου σιφωνίου Pasteur, του οποίου το στόμιο στερεώνεται σε ύψος 2-3 cm πάνω από το στρώμα ιζήματος, παρέχοντας μερικές φυσαλίδες/δευτερόλεπτο. Κατά τη δοκιμή πτητικών χημικών ουσιών, θα πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να μην αερίζεται το σύστημα ιζήματος-νερού, ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να ικανοποιείται το κριτήριο εγκυρότητας του ελάχιστου ποσοστού του 60 % της ASV (παράγραφος 10). Περαιτέρω καθοδήγηση παρέχεται στο σημείο (16).
33. Η δοκιμή με το είδος *C. riparius* διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (± 2 °C). Για τα είδη *C. dilutus* και *C. yoshimatsui*, οι συνιστώμενες θερμοκρασίες είναι 23 °C και 25 °C (± 2 °C), αντιστοίχως. Εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών και η φωτεινή ισχύς θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 500 και 1 000 Lux. Για τους κλωβούς αναπαραγωγής, μπορεί να συμπεριλαμβάνεται μια επιπλέον φάση μίας ώρας με ημίφως (χάραμα και σούρουπο).

Διάρκεια έκθεσης

34. Σχεδιασμός εμβολιασμένου νερού: Η περίοδος έκθεσης της πατρικής γενιάς ξεκινάει όταν η υπό δοκιμή χημική ουσία εμβολιαστεί μέσα στο υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής (το οποίο γίνεται μία ημέρα μετά την εισαγωγή των προνυμφών — για πιθανές τροποποιήσεις του σχεδιασμού έκθεσης, βλ. παράγραφο 7). Η έκθεση της πρώτης θυγατρικής γενιάς των προνυμφών ξεκινάει αμέσως, επειδή αυτές οι προνύμφες εισάγονται σε σύστημα ιζήματος-νερού που έχει ήδη εμβολιαστεί. Η μέγιστη διάρκεια έκθεσης για την πατρική γενιά είναι 27 ημέρες και για την πρώτη θυγατρική γενιά 28 ημέρες (οι προνύμφες της πατρικής γενιάς παραμένουν μία ημέρα μέσα στα δοχεία χωρίς έκθεση) για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*. Λαμβανομένης υπόψη της επικάλυψης, η πλήρης διάρκεια της δοκιμής είναι περίπου 44 ημέρες. Για το είδος *C. dilutus*, οι μέγιστες διάρκειες έκθεσης είναι 64 και 65 ημέρες για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά, αντίστοιχα. Η συνολική διάρκεια είναι περίπου 100 ημέρες.

Σχεδιασμός εμβολιασμένου ιζήματος: η έκθεση ξεκινάει με την προσθήκη των προνυμφών και διαρκεί 28 ημέρες το μέγιστο και για τις δύο γενιές για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui*, και 65 ημέρες το μέγιστο και για τις δύο γενιές για το είδος *C. dilutus*.

Παρατηρήσεις

Εμφάνιση

35. Προσδιορίζονται ο χρόνος ανάπτυξης και ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων και για τις δύο γενιές. Τα αρσενικά άτομα αναγνωρίζονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους και το λεπτό τους σώμα.
36. Τα δοχεία δοκιμής και των δύο γενεών θα πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα με σκοπό την οπτική εκτίμηση κάθε μη φυσιολογικής συμπεριφοράς των προνυμφών (π.χ. εγκατάλειψη του ιζήματος, ασυνήθιστη κολύμβηση), σε σύγκριση με το δοχείο-μάρτυρα. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εμφάνισης, η οποία ξεκινάει περίπου 12 ημέρες μετά την εισαγωγή των προνυμφών για τα είδη *C. riparius* και *C. yoshimatsui* (μετά από 20 ημέρες για το είδος *C. dilutus*), πραγματοποιείται καταμέτρηση των εμφανιζόμενων χειρονόμων και προσδιορισμός του φύλου τους τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, αλλά κατά προτίμηση δύο (νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα). Μετά την αναγνώριση, οι χειρονόμοι της πατρικής γενιάς απομακρύνονται με προσοχή από τα δοχεία και μεταφέρονται σε κλωβό αναπαραγωγής. Οι χειρονόμοι της πρώτης θυγατρικής γενιάς απομακρύνονται και θανατώνονται μετά την αναγνώριση. Κάθε αλυσίδα αυγών που εναποτίθεται στα δοχεία δοκιμής της πατρικής γενιάς θα πρέπει να συλλέγεται ξεχωριστά και να μεταφέρεται με τουλάχιστον 2,5 ml εγγενούς νερού σε μικροπλάκες 12 βοθρίων (ή άλλα κατάλληλα δοχεία), οι οποίες καλύπτονται με καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Επίσης, θα πρέπει να καταγράφεται ο αριθμός των νεκρών προνυμφών και των ορατών χρυσαλλίδων που δεν τελειοποιήθηκαν. Παραδείγματα κλωβού αναπαραγωγής, δοχείου δοκιμής και φυσητήρα εμφυσησεως αέρα παρέχονται στο προσάρτημα 5.

Αναπαραγωγή

37. Οι επιδράσεις στην αναπαραγωγή εκτιμώνται μέσω του αριθμού των αλυσίδων αυγών που παράγονται από την πατρική γενιά των χειρονόμων και της γονιμότητας αυτών των αλυσίδων αυγών. Οι αλυσίδες αυγών συλλέγονται μία φορά την ημέρα από το δοχείο κρυστάλλωσης που είναι τοποθετημένο μέσα σε κάθε περιέκτη αναπαραγωγής. Οι αλυσίδες αυγών θα πρέπει να συλλέγονται και να μεταφέρονται με τουλάχιστον 2,5 ml εγγενούς νερού σε μια μικροπλάκα 12 βοθρίων (μία αλυσίδα αυγών σε κάθε βοθρίο) ή άλλα κατάλληλα δοχεία, τα οποία καλύπτονται με καπάκι για την αποφυγή σημαντικής εξάτμισης. Για κάθε αλυσίδα αυγών καταγράφονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: ημέρα παραγωγής, μέγεθος (κανονικό, δηλ. $1,0 \pm 0,3$ cm ή μικρό, κατά κανόνα $\leq 0,5$ cm), δομή (φυσιολογική = μορφή μπανάνας με σπειροειδή κλωστή αυγών ή μη φυσιολογική, π.χ. μη σπειροειδής κλωστή αυγών) και γονιμότητα (γόνιμη ή μη γόνιμη). Η γονιμότητα μιας αλυσίδας αυγών εκτιμάται κατά τη διάρκεια των έξι ημερών μετά την παραγωγή της. Μία αλυσίδα αυγών θεωρείται γόνιμη όταν εκκολάπτεται τουλάχιστον το ένα τρίτο των αυγών. Ο συνολικός αριθμός των θηλυκών ατόμων που προστίθενται στον κλωβό αναπαραγωγής χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό άτομο και ο αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό άτομο. Εάν απαιτείται, ο αριθμός των αυγών σε μια αλυσίδα αυγών μπορεί να υπολογιστεί χωρίς να υποστούν ζημιά με την κυκλική μέθοδο μέτρησης (περιγράφεται στα σημεία 32 και 33).

Αναλυτικές μετρήσεις

Συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

38. Θα πρέπει να αναλύονται, τουλάχιστον, δείγματα του υπερκείμενου νερού, του ενδοπορικού νερού και του ιζήματος στην αρχή της έκθεσης (στην περίπτωση εμβολιασμού νερού, κατά προτίμηση μία ώρα μετά την εφαρμογή) και στο τέλος της δοκιμής, στην υψηλότερη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Αυτό ισχύει για τα δοχεία και από τις δύο γενιές. Από τα δοχεία κρυστάλλωσης στον κλωβό αναπαραγωγής μόνο το υπερκείμενο νερό αναλύεται, επειδή με αυτό έρχονται σε επαφή οι αλυσίδες αυγών (για τον σχεδιασμό εμβολιασμένου ιζήματος, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο αναλυτικής επιβεβαίωσης της συγκέντρωσης του ιζήματος). Ενδεχομένως να διεξαχθούν περαιτέρω μετρήσεις του ιζήματος, του ενδοπορικού νερού ή του υπερκείμενου νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εάν κριθεί απαραίτητο. Οι συγκεκριμένοι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά/κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο σύστημα νερού-ιζήματος. Η δειγματοληψία του ιζήματος και του ενδοπορικού νερού στην αρχή και κατά τη διάρκεια της δοκιμής (βλ. παράγραφο 39) απαιτεί πρόσθετα δοχεία δοκιμής για τη διεξαγωγή των αναλυτικών προσδιορισμών. Στον σχεδιασμό εμβολιασμένου νερού, οι μετρήσεις στο ίζημα μπορεί να μην είναι απαραίτητες εάν η κατανομή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος έχει προσδιοριστεί σαφώς σε μια μελέτη νερού/ιζήματος υπό συγκρίσιμες συνθήκες (π.χ. αναλογία ιζήματος προς νερό, τύπος εφαρμογής, περιεκτικότητα του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα) ή εάν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό φαίνεται ότι παραμένουν μεταξύ 80 έως 120 % της ονομαστικής ή μετρούμενης αρχικής συγκέντρωσης.
39. Όταν εκτελούνται ενδιάμεσες μετρήσεις (π.χ. την 7η ή/και 14η ημέρα) και εάν για την ανάλυση απαιτούνται μεγάλα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ληφθούν από τα δοχεία δοκιμής χωρίς να επηρεάσουν το σύστημα δοκιμής, θα πρέπει να εκτελούνται αναλυτικοί προσδιορισμοί σε δείγματα από πρόσθετα δοχεία δοκιμής που υποβάλλονται στην ίδια αγωγή (συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας των οργανισμών δοκιμής), αλλά δεν χρησιμοποιούνται για βιολογικές παρατηρήσεις.

40. Η φυγοκέντριση, π.χ. σε 10 000 g στους 4 °C για 30 λεπτά, αποτελεί τη συνιστώμενη διαδικασία για την απομόνωση του διάμεσου (= ενδοπορικού) νερού. Ωστόσο, εάν καταδεικνύεται ότι η υπό δοκιμή χημική ουσία δεν προσροφάται στους ηθμούς, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διήθησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ανάλυση οι συγκεντρώσεις σε ενδοπορικό νερό, καθώς ο όγκος του δείγματος μπορεί να είναι υπερβολικά μικρός.

Φυσικοχημικές παράμετροι

41. Θα πρέπει να μετρώνται με κατάλληλο τρόπο το pH, το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό δοκιμής και η θερμοκρασία του νερού στα δοχεία δοκιμής και στα δοχεία κρυστάλλωσης (βλ. παράγραφο 10). Η σκληρότητα και η αμμωνία θα πρέπει να μετρώνται στους μάρτυρες και σε ένα δοχείο δοκιμής και δοχείο κρυστάλλωσης στην υψηλότερη συγκέντρωση στην αρχή και το τέλος της δοκιμής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Σκοπός της παρούσας δοκιμής κύκλου ζωής είναι η διαπίστωση της επίδρασης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στην αναπαραγωγή και, για δύο γενιές, στον ρυθμό ανάπτυξης και τον συνολικό αριθμό των πλήρως αναπτυγμένων και ζωντανών αρσενικών και θηλυκών χειρονόμων. Για τον λόγο εμφάνισης, θα πρέπει να συνενώνονται δεδομένα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Εάν δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ευαίσθητες του ρυθμού ανάπτυξης των δύο φύλων, τα αποτελέσματα των αρσενικών και θηλυκών ατόμων μπορούν να συνενώνονται για στατιστική ανάλυση.
43. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρείται επίδραση, εκφραζόμενες ως συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο νερό (για εμβολιασμένο νερό) ή στο ίζημα (για εμβολιασμένο ίζημα), συνήθως υπολογίζονται με βάση τις συγκεντρώσεις που μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης (βλ. παράγραφο 38). Επομένως, για το εμβολιασμένο νερό, οι συγκεντρώσεις που συνήθως μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης στο υπερκείμενο νερό των δοχείων και για τις δύο γενιές και οι συγκεντρώσεις στα δοχεία κρυστάλλωσης παράγουν έναν μέσο όρο για κάθε αγωγή. Για το εμβολιασμένο ίζημα, οι συγκεντρώσεις που συνήθως μετρώνται κατά την έναρξη της έκθεσης στα δοχεία και για τις δύο γενιές (και προαιρετικά αυτές των δοχείων κρυστάλλωσης) παράγουν έναν μέσο όρο για κάθε αγωγή.
44. Για την εκτίμηση των σημείων των τιμών, δηλ. της EC_x , μπορούν να χρησιμοποιούνται τα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο και ανά κλωβό αναπαραγωγής ως πραγματικές επαναλήψεις. Κατά τον υπολογισμό διαστήματος εμπιστοσύνης για κάθε EC_x , θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων ή να αποδεικνύεται ότι η μεταβλητότητα αυτή είναι τόσο μικρή, ώστε μπορεί να αγνοηθεί. Όταν η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, θα πρέπει να εφαρμόζεται μετασχηματισμός στα στατιστικά στοιχεία ανά δοχείο, ώστε να βελτιώνεται η ομοιογένεια της διασποράς. Ωστόσο, οι τιμές EC_x θα πρέπει να υπολογίζονται αφού μετασχηματιστεί εκ νέου η απόκριση στην αρχική τιμή (31).
45. Όταν η στατιστική ανάλυση στοχεύει στον προσδιορισμό της NOEC μέσω δοκιμασίας υποθέσεων, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβλητότητα μεταξύ των δοχείων, γεγονός που εξασφαλίζεται με τη χρήση των μεθόδων ANOVA (π.χ. δοκιμασίες Williams και Dunnett). Η δοκιμασία Williams είναι κατάλληλη όταν αναμένεται θεωρητικά μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης, ενώ η δοκιμασία Dunnett είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις όπου δεν ισχύει η υπόθεση της μονοτονικότητας. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι κατάλληλος πιο ανθεκτικός δοκιμασίες (27), σε περιπτώσεις όπου παραβιάζονται οι συνήθεις παραδοχές της ANOVA (31).

Λόγος εμφάνισης

46. Οι λόγοι εμφάνισης είναι ποσοστιαία δεδομένα που μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία Cochran-Armitage, εφαρμοζόμενη καθοδικά, όπου αναμένεται μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης και τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη συγκεκριμένη προσδοκία. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμασία Fisher's exact ή Mantel-Haentzal, με διόρθωση των τιμών p κατά Bonferroni-Holm. Εάν υπάρχουν ενδείξεις για μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων στο πλαίσιο της ίδιας συγκέντρωσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από εκείνη που θα έδειχνε μια διωνυμική κατανομή (συχνά αναφέρεται ως "εξωδιωνυμική" διασπορά), θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια ανθεκτική δοκιμασία Cochran-Armitage ή Fisher's exact, όπως προτείνεται στην παράγραφο (27).

Προσδιορίζεται το άθροισμα των ζωντανών χειρονόμων (αρσενικών και θηλυκών) που εμφανίζονται ανά δοχείο, n_e , και διαιρείται δια του αριθμού των εισαγόμενων προνυμφών, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

όπου:

ER = λόγος εμφάνισης

n_e = αριθμός ζωντανών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο

n_a = αριθμός προνυμφών που εισήχθησαν ανά δοχείο (κανονικά 20)

Όταν το n_e είναι μεγαλύτερο από το n_a (δηλ. όταν έχει εισαχθεί ακουσίως μεγαλύτερος αριθμός προνυμφών από τον προβλεπόμενο), το n_a θα πρέπει να γίνεται ίσο με το n_e .

47. Μια εναλλακτική προσέγγιση που είναι η πλέον κατάλληλη για δείγματα μεγάλου μεγέθους, όταν υπάρχει εξωδιωνυμική διασπορά, είναι να θεωρείται ο λόγος εμφάνισης συνεχής απόκριση και να χρησιμοποιούνται διαδικασίες που συνάδουν με αυτά τα δεδομένα για τον ER . Εν προκειμένω, το δείγμα μεγάλου μεγέθους ορίζεται ως αριθμός τόσο των εμφανιζόμενων όσο και των μη εμφανιζόμενων ατόμων μεγαλύτερος του 5 ανά επανάληψη (δοχείο).
48. Για την εφαρμογή των μεθόδων ANOVA, οι τιμές του ER θα πρέπει πρώτα να μετασχηματίζονται με μετασχηματισμό της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου ή με τον μετασχηματισμό Tukey-Freeman για την επίτευξη μιας κατά προσέγγιση κανονικής κατανομής και την εξίσωση των διασπορών. Οι δοκιμασίες Cochran-Armitage, Fisher's exact (Bonferroni) και Mantel-Haentzel μπορούν να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται απόλυτες συχνότητες. Ο μετασχηματισμός της τετραγωνικής ρίζας του τόξου ημιτόνου εφαρμόζεται λαμβάνοντας το αντίστροφο του ημιτόνου (\sin^{-1}) της τετραγωνικής ρίζας του ER .
49. Για τους λόγους εμφάνισης, οι τιμές EC_x υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης (π.χ., με μοντέλο probit, logit ή Weibull (28)). Εάν η ανάλυση παλινδρόμησης αποτύχει (π.χ. όταν υπάρχουν λιγότερες από δύο μερικές αποκρίσεις), μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες, μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως ο κινητός μέσος όρος ή η απλή παρεμβολή.

Ρυθμός ανάπτυξης

50. Ο μέσος χρόνος ανάπτυξης αντιπροσωπεύει το μέσο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή των προνυμφών (ημέρα 0 της δοκιμής) έως την εμφάνιση της πειραματικής κοόρτης χειρονόμων (για τον υπολογισμό του πραγματικού χρόνου ανάπτυξης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ηλικία των προνυμφών κατά τον χρόνο της εισαγωγής). Ο ρυθμός ανάπτυξης (μονάδα: 1/ημέρα) ισούται με το αντίστροφο του χρόνου ανάπτυξης και αντιπροσωπεύει το ημερήσιο τμήμα της ανάπτυξης των προνυμφών. Ο ρυθμός ανάπτυξης προτιμάται για την αξιολόγηση των παρουσών μελετών τοξικότητας σε ίζημα, καθώς παρουσιάζει μικρότερη διασπορά, είναι πιο ομοιογενής και προσεγγίζει περισσότερο την κανονική κατανομή σε σύγκριση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, περισσότερες διαδικασίες ανθεκτικής παραμετρικής δοκιμής μπορούν να εφαρμόζονται στον ρυθμό ανάπτυξης σε αντίθεση με τον χρόνο ανάπτυξης. Για τον ρυθμό ανάπτυξης ως συνεχή απόκριση, οι τιμές EC_x μπορούν να υπολογίζονται με ανάλυση παλινδρόμησης [π.χ. (29) (30)]. Η NOEC για τον μέσο ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett. Επειδή τα αρσενικά εμφανίζονται νωρίτερα από τα θηλυκά, δηλ. έχουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, είναι σκόπιμο να υπολογίζεται ο ρυθμός ανάπτυξης για κάθε φύλο ξεχωριστά εκτός από τον υπολογισμό του ρυθμού ανάπτυξης για το σύνολο των χειρονόμων.
51. Για τις στατιστικές δοκιμασίες, ο αριθμός των χειρονόμων που παρατηρείται κατά την ημέρα επιθεώρησης x υποτίθεται ότι εμφανίστηκε κατά το μέσο χρονικό διάστημα μεταξύ της ημέρας x και της ημέρας $x - 1$ (l = διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης, συνήθως 1 ημέρα). Ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο (\bar{x}) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i X_i}{n_e}$$

όπου:

\bar{x} : μέσος ρυθμός ανάπτυξης ανά δοχείο

i : δείκτης του διαστήματος επιθεώρησης

m : μέγιστος αριθμός διαστημάτων επιθεώρησης

f_i : αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα

n_i : επιθεώρησης i συνολικός αριθμός χειρονόμων που εμφανίστηκαν στο τέλος του πειράματος (Σf_i)

x_i : ρυθμός ανάπτυξης των χειρονόμων που εμφανίστηκαν κατά το διάστημα i

$$x_i = 1 / \text{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

όπου:

day_i : ημέρα επιθεώρησης (ημέρες από την εισαγωγή των προνυμφών)

l_i : διάρκεια του διαστήματος επιθεώρησης i (ημέρες, συνήθως 1 ημέρα)

Αναλογία φύλου

52. Οι αναλογίες φύλου είναι ποσοστιαία δεδομένα και επομένως θα πρέπει να αξιολογούνται με μια δοκιμασία Fisher's exact ή άλλες κατάλληλες μεθόδους. Η κανονική αναλογία φύλου του είδους *C. riparius* είναι ίση με ένα, δηλ. τα αρσενικά και τα θηλυκά είναι εξίσου άφθονα. Τα δεδομένα αναλογίας φύλου χρήζουν ίδιας μεταχείρισης και για τις δύο γενιές. Δεδομένου ότι ο μέγιστος αριθμός χειρονόμων ανά δοχείο (δηλ. 20) είναι πολύ χαμηλός για μια ουσιώδη στατιστική ανάλυση, ο συνολικός αριθμός των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων για κάθε φύλο αθροίζεται από όλα τα δοχεία μίας αγωγής. Τα εν λόγω μη μετασχηματισμένα δεδομένα ελέγχονται έναντι των δεδομένων του μάρτυρα (διαλύτη) ή των συνενωμένων δεδομένων μάρτυρα σε έναν πίνακα συνάφειας 2×2 .

Αναπαραγωγή

53. Η αναπαραγωγή, όπως και η αναπαραγωγική απόδοση, υπολογίζεται ως ο αριθμός των αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό. Ειδικότερα, ο συνολικός αριθμός των αλυσίδων αυγών που παράγονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής διαιρείται με τον συνολικό αριθμό των ζωντανών και αβλαβών θηλυκών ατόμων που έχουν προστεθεί στον εν λόγω κλωβό. Η NOEC για την αναπαραγωγική απόδοση μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett.
54. Η αναπαραγωγική απόδοση των αλυσίδων αυγών χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ποσοτικά ο αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά θηλυκό. Ο συνολικός αριθμός των γόνιμων αλυσίδων αυγών που παράγονται σε έναν κλωβό αναπαραγωγής διαιρείται με τον συνολικό αριθμό των ζωντανών και αβλαβών θηλυκών ατόμων που έχουν προστεθεί στον εν λόγω κλωβό. Η NOEC για τη γονιμότητα μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους ANOVA, π.χ. δοκιμασία Williams ή Dunnett.

Έκθεση δοκιμής

55. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να παρέχει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία:

- φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες (υδατοδιαλυτότητα, τάση ατμών, $\log K_{ow}$, συντελεστής κατανομής στο έδαφος (ή στο ίζημα, εάν είναι διαθέσιμος), σταθερότητα στο νερό και στο ίζημα κ.λπ.),
- στοιχεία ταυτοποίησης χημικής ουσίας (κοινή ονομασία, χημική ονομασία, συντακτικός τύπος, αριθμός CAS κ.λπ.), συμπεριλαμβανομένων της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Υπό δοκιμή είδη:

- χρησιμοποιούμενοι οργανισμοί δοκιμής: είδος, επιστημονική ονομασία, πηγή των οργανισμών και συνθήκες αναπαραγωγής,
- πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο μεταχείρισης των μαζών αυγών και των προνυμφών,

- πληροφορίες σχετικά με τη μεταχείριση των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων της πατρικής γενιάς με τη χρήση φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα κ.λπ (βλ. προσάρτημα 5),
- ηλικία των οργανισμών δοκιμής κατά τον χρόνο εισαγωγής στα δοχεία δοκιμής της πατρικής και πρώτης θυγατρικής γενιάς.

Συνθήκες δοκιμής:

- ίζημα που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή φυσικό ή μορφοποιημένο (τεχνητό),
- φυσικό ίζημα: τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένου, εάν είναι δυνατόν, του ιστορικού μόλυνσης· χαρακτηριστικά ιζήματος: pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, αναλογία C/N και κοκκομετρία (κατά περίπτωση),
- μορφοποιημένο ίζημα: παρασκευή, συστατικά και χαρακτηριστικά (περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, pH, υγρασία, κ.λπ. μετρούμενα κατά την έναρξη της δοκιμής),
- παρασκευή του νερού δοκιμής (εάν χρησιμοποιείται ανασυσταθέν νερό) και χαρακτηριστικά του (συγκέντρωση οξυγόνου, pH, σκληρότητα κ.λπ. μετρούμενα κατά την έναρξη της δοκιμής),
- βάθος του ιζήματος και του υπερκείμενου νερού για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,
- όγκος του υπερκείμενου και του ενδοπορικού νερού, βάρος του υγρού ιζήματος με και χωρίς ενδοπορικό νερό για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,
- δοχεία δοκιμής (υλικό και μέγεθος),
- δοχεία κρυστάλλωσης (υλικό και μέγεθος),
- κλωβοί αναπαραγωγής (υλικό και μέγεθος),
- μέθοδος παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης και συγκεντρώσεις δοκιμής για τα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,
- εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης: συγκεντρώσεις δοκιμής, αριθμός επαναλήψεων και διαλύτες, εφόσον απαιτούνται,
- συνθήκες επώασης για τα δοχεία δοκιμής: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς, αερισμός (φυσαλίδες ανά δευτερόλεπτο),
- συνθήκες επώασης για τους κλωβούς αναπαραγωγής και τα δοχεία κρυστάλλωσης: θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς,
- συνθήκες επώασης για τις αλυσίδες αυγών στις μικροπλάκες (ή άλλα δοχεία): θερμοκρασία, φωτοπερίοδος και φωτεινή ισχύς,
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση, συμπεριλαμβανομένων του είδους τροφής, της παρασκευής, της ποσότητας και του καθεστώτος σίτισης.

Αποτελέσματα:

- ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μετρούμενες συγκεντρώσεις δοκιμής και τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα δοχεία δοκιμής και τα δοχεία κρυστάλλωσης,
- ποιότητα του νερού στο εσωτερικό των δοχείων δοκιμής και των δοχείων κρυστάλλωσης, δηλ. pH, θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, σκληρότητα και αμμωνία,
- αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού δοκιμής για τα δοχεία δοκιμής, εάν σημειώνεται,
- αριθμός των αρσενικών και των θηλυκών χειρονόμων που εμφανίστηκαν ανά δοχείο και ανά ημέρα για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,
- αναλογία φύλου των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων ανά αγωγή για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,
- αριθμός των προνυμφών που δεν εμφανίστηκαν ως τέλειοι χειρονόμοι ανά δοχείο για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,
- ποσοστό/κλάσμα εμφάνισης ανά επανάληψη και συγκέντρωση δοκιμής (συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους) για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,
- μέσος ρυθμός ανάπτυξης των πλήρως αναπτυχθέντων και ζωντανών χειρονόμων ανά επανάληψη και αγωγή (έξωχρωστά και συνενωμένα αποτελέσματα για αρσενικούς και θηλυκούς χειρονόμους) για την πατρική και πρώτη θυγατρική γενιά,

- αριθμός των αλυσίδων αυγών που εναποτέθηκαν στα δοχεία κρυστάλλωσης ανά κλωβό αναπαραγωγής και ημέρα,
- χαρακτηριστικά κάθε αλυσίδας αυγών (μέγεθος, σχήμα και γονιμότητα),
- αναπαραγωγική απόδοση — συνολικός αριθμός αλυσίδων αυγών ανά συνολικό αριθμό θηλυκών ατόμων που προστέθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής,
- γονιμότητα — συνολικός αριθμός γόνιμων αλυσίδων αυγών ανά συνολικό αριθμό θηλυκών ατόμων που προστέθηκαν στον κλωβό αναπαραγωγής,
- εκτιμήσεις των τοξικών τελικών σημείων, π.χ. EC_x (και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης), NOEC και στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης τυχόν αποκλίσεων από την παρούσα μέθοδο δοκιμών στην έκβαση της δοκιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Κεφάλαιο Γ.28 του παρόντος προσαρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου νερού.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. και M.G. Butler (1999), Paelearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311-322.
- (3) Fleming, R. κ.ά. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Αρ. έκθεσης: EC 3738. Αύγουστος 1994. WRC, HB.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, Από το εργαστήριο WOSTA που πραγματοποιήθηκε στις Κάτω Χώρες.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Στο: Annual Book of ASTM Standards, Τόμος 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, Έκδοση SPE 1/RM/32, Δεκέμβριος 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Δεύτερη έκδοση, EPA 600/R-99/064, Μάρτιος 2000, Αναθεώρηση της πρώτης έκδοσης με ημερομηνία Ιούνιος 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. και 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, Οντάριο, Καναδάς.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. και 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. και 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) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος προσαρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος.

- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Ap. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
 - (17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. και 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*, Έκδοση EPS 1/RM/30, Σεπτέμβριος 1995.
 - (19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. και 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. και J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
 - (21) Naylor, C. και 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. και 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. και 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. και 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 Ap. 54, σελ. 146, ENV/JM/MONO(2006)18, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
 - (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. και 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. και 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 Μέρος 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, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι ορισμοί:

Χημική ουσία είναι μια ουσία ή ένα μείγμα.

Μορφοποιημένο ίζημα ή ανασυσταθέν, τεχνητό ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που τοποθετείται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Διάμεσο νερό ή ενδοπορικό νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος και του εδάφους.

Εμβολιασμένο νερό είναι το νερό δοκιμής στο οποίο έχει προστεθεί υπό δοκιμή χημική ουσία.

Υπό δοκιμή χημική ουσία είναι κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Προσάρτημα 2

Συστάσεις για την καλλιέργεια του *chironomus riparius*

1. Οι προνύμφες του γένους *Chironomus* μπορούν να εκτρέφονται σε δοχεία κρυστάλλωσης ή μεγαλύτερους περιέκτες. Λεπτή χαλαζιακή άμμος απλώνεται σε ένα λεπτό στρώμα βάθους περίπου 5 έως 10 mm πάνω από τον πυθμένα του περιέκτη. Το Kieselgur (π.χ. Merck, Art 8117) έχει επίσης αποδειχθεί κατάλληλο υπόστρωμα (επαρκεί ένα λεπτότερο στρώμα πάχους πολύ λίγων mm). Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλο νερό σε βάθος αρκετών εκατοστών. Το νερό θα πρέπει να συμπληρώνεται, όσο χρειάζεται ώστε να αναπληρώνονται οι απώλειες λόγω εξάτμισης, καθώς και για την πρόληψη της αποξήρανσης. Το νερό μπορεί να αντικαθίσταται, εάν είναι απαραίτητο. Θα πρέπει να παρέχεται ήπιος αερισμός. Τα δοχεία εκτροφής των προνυμφών θα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε κατάλληλο κλωβό που αποτρέπει τη διαφυγή των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων. Ο κλωβός θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέπει στα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα να σχηματίσουν σμήνος, γιατί διαφορετικά δεν είναι δυνατή η αναπαραγωγή (οι ελάχιστες διαστάσεις είναι περίπου 30 × 30 × 30 cm).
2. Οι κλωβοί θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε αίθουσα σταθερού περιβάλλοντος, στους 20 ± 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός (ισχύς περίπου 1 000 lux), 8 ωρών σκοταδιού. Έχει αναφερθεί ότι υγρασία του αέρα μικρότερη από 60 % RH μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή.

Νερό αραίωσης

3. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοδήποτε κατάλληλο φυσικό ή συνθετικό νερό. Συνήθως χρησιμοποιούνται νερό γεώτρησης, αποχλωρωμένο νερό βρύσης και τεχνητά μέσα (π.χ. θρεπτικό υλικό Elendt "M4" ή "M7", βλ. κατωτέρω). Το νερό θα πρέπει να αερίζεται πριν από τη χρήση. Εάν είναι απαραίτητο, το νερό καλλιέργειας μπορεί να ανανεώνεται με έκχυση ή σιφωνισμό του χρησιμοποιημένου νερού από τα δοχεία καλλιέργειας, με προσοχή, χωρίς να καταστρέφονται οι σωλήνες των προνυμφών.

Σίτιση προνυμφών

4. Οι προνύμφες του γένους *Chironomus* θα πρέπει να τρέφονται με νιφάδες τροφής για ψάρια (Tetra Min®, Tetra Phyll® ή άλλη παρόμοια τροφή για ψάρια με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα), σε ποσότητα περίπου 250 mg ανά δοχείο ανά ημέρα. Η τροφή αυτή μπορεί να χορηγείται ως ξηρή αλεσμένη σκόνη ή ως εναιώρημα σε νερό: 1,0 g νιφάδων τροφής προστίθεται σε 20 ml νερού αραίωσης και αναμειγνύεται για να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χορηγείται με ρυθμό περίπου 5 ml ανά δοχείο ανά ημέρα (ανακινείτε πριν από τη χρήση). Οι μεγαλύτερης ηλικίας προνύμφες μπορούν να λαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες.
5. Η σίτιση ρυθμίζεται ανάλογα με την ποιότητα του νερού. Εάν το μέσο καλλιέργειας "θολώσει", η σίτιση θα πρέπει να μειωθεί. Οι προσθήκες τροφής θα πρέπει να παρακολουθούνται επισταμένως. Η υπερβολικά μικρή ποσότητα τροφής θα προκαλέσει μετανάστευση των προνυμφών προς τη στήλη ύδατος, ενώ η υπερβολικά μεγάλη ποσότητα θα προκαλέσει αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα και μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να οδηγήσουν και οι δύο σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης.
6. Μπορούν επίσης να προστίθενται κύτταρα ορισμένων πράσινων φυκών (π.χ. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), όταν ετοιμάζονται νέα δοχεία καλλιέργειας.

Σίτιση εμφανιζόμενων ενήλικων

7. Ορισμένοι πειραματιστές έχουν προτείνει τον εμποτισμό ενός τεμαχίου βαμβακιού με κορεσμένο διάλυμα σακχαρώδης για να χρησιμεύσει ως τροφή για τα εμφανιζόμενα ενήλικα άτομα.

Εμφάνιση

8. Στους 20 ± 2 °C θα αρχίσουν να εμφανίζονται ενήλικα άτομα από τα δοχεία εκτροφής προνυμφών μετά από περίπου 13-15 ημέρες. Τα αρσενικά άτομα διακρίνονται εύκολα από τις πτεροειδείς κεραίες τους και το λεπτό σώμα.

Μάζες αυγών

9. Μόλις εμφανιστούν ενήλικα άτομα μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, όλα τα δοχεία εκτροφής προνυμφών θα πρέπει να ελέγχονται τρεις φορές την εβδομάδα για απόθεση των ζελατινωδών μαζών αυγών. Εάν υπάρχουν μάζες αυγών, θα πρέπει να αφαιρούνται με προσοχή και να μεταφέρονται σε έναν μικρό δίσκο που περιέχει δείγμα του νερού αναπαραγωγής. Οι μάζες των αυγών χρησιμοποιούνται για την έναρξη καλλιέργειας σε νέο δοχείο (π.χ. 2-4 μάζες αυγών/δοχείο) ή για δοκιμές τοξικότητας.
10. Οι προνύμφες πρώτου σταδίου θα πρέπει να εκκολάπτονται μετά από 2-3 ημέρες.

Ετοιμασία νέων δοχείων καλλιέργειας

11. Από τη στιγμή που οι καλλιέργειες έχουν εγκατασταθεί, υπάρχει δυνατότητα ετοιμασίας νέων δοχείων καλλιέργειας προνυμφών ανά εβδομάδα ή λιγότερο συχνά, ανάλογα με τις απαιτήσεις της δοκιμής, με αφαίρεση των παλαιότερων δοχείων μετά την εμφάνιση των ενήλικων χειρονόμων. Με τη χρήση του συστήματος αυτού, θα παράγεται κανονική ποσότητα ενήλικων ατόμων με την ελάχιστη δυνατή διαχείριση.

Παρασκευή των διαλυμάτων δοκιμής “M4” και “M7”

12. Το θρεπτικό υλικό “M4” έχει περιγραφεί από τον Elendt (1990). Το υλικό “M7” παρασκευάζεται όπως και το “M4”, εκτός από τις ουσίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, των οποίων οι συγκεντρώσεις στο “M7” είναι υποτετραπλάσιες εκείνων του “M4”. Το διάλυμα δοκιμής δεν θα πρέπει να παρασκευάζεται σύμφωνα με τους Elendt και Bias (1990) για τις συγκεντρώσεις $\text{NaSiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 και K_2HPO_4 που υποδεικνύονται για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης δεν είναι επαρκή.

Παρασκευή του θρεπτικού υλικού “M7”

13. Κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (I) παρασκευάζεται χωριστά και από τα εν λόγω διαλύματα (I) παρασκευάζεται συνδυασμένο διάλυμα παρακαταθήκης (II) (βλ. πίνακα 1). Πενήντα ml συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II) αναμειγνύονται με τις ποσότητες κάθε διαλύματος παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που εμφανίζονται στον πίνακα 2 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 1 λίτρο με απιονισμένο νερό για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού “M7”. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών με την προσθήκη τριών βιταμινών σε απιονισμένο νερό, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 3, και 0,1 ml από το διάλυμα παρακαταθήκης συνδυασμού βιταμινών προστίθενται στο τελικό θρεπτικό υλικό “M7” λίγο πριν από τη χρήση. Το διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών φυλάσσεται στην κατάψυξη, χωρισμένο σε μικρές ποσότητες. Το θρεπτικό υλικό αερίζεται και σταθεροποιείται.

Πίνακας 1

Διαλύματα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

| Διαλύματα παρακαταθήκης (I) | Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό | Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό | | Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (mg/l) | |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------|-------|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| H_3BO_3 (¹) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (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 |
| $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (¹) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (¹) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (¹) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (¹) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |

| Διαλύματα παρακαταθήκης (I) | Ποσότητα (mg) που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό | Για την παρασκευή του συνδυασμένου διαλύματος παρακαταθήκης (II): αναμειγνύονται οι ακόλουθες ποσότητες (ml) διαλυμάτων παρακαταθήκης (I) και συμπληρώνεται ο όγκος έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό | | Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής (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⁾ Οι ουσίες αυτές διαφέρουν μεταξύ του M4 και του M7, όπως αναφέρεται ανωτέρω.

⁽²⁾ Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται χωριστά, ενώνονται και αποστειρώνονται αμέσως σε αυτόκαυστο.

Πίνακας 2

Διαλύματα παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

| | Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg) | Ποσότητα διαλυμάτων παρακαταθήκης μακροθρεπτικών συστατικών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l) | Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l) |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| CaCl ₂ × 6H 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 |

Πίνακας 3

Διάλυμα παρακαταθήκης βιταμινών για τα θρεπτικά υλικά M4 και M7

Συνδυάζονται και τα τρία διαλύματα βιταμινών για την παρασκευή ενιαίου διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών.

| | Ποσότητα που αραιώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό (mg) | Ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης βιταμινών που προστίθεται για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών M4 και M7 (ml/l) | Τελικές συγκεντρώσεις στα διαλύματα δοκιμής M4 και M7 (mg/l) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Υδροχλωρική θειαμίνη | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Κυανοκοβαλαμίνη (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Βιοτίνη | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, δημοσιεύθηκε από τους M. Streloke και H. Köpp. Βερολίνο.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. και 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.

Προσάρτημα 3

Παρασκευή μορφοποιημένου ιζήματος

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Η σύνθεση του μορφοποιημένου ιζήματος θα πρέπει να έχει ως εξής:

| Συστατικό | Χαρακτηριστικά | % ξηρού βάρους ιζήματος |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Τύρφη | Τύρφη σφάγγων, με pH όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο 5,5-6,0, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων ≤ 1 mm) και αερόξηρη | 4-5 |
| Χαλαζιακή άμμος | Μέγεθος κόκκων: > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μm | 75-76 |
| Καολιντική άργιλος | Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 % | 20 |
| Οργανικός άνθρακας | Ρυθμίζεται με προσθήκη τύρφης και άμμου | 2 ($\pm 0,5$) |
| Ανθρακικό ασβέστιο | CaCO_3 , κονιοποιημένο, χημικά καθαρό | 0,05-0,1 |
| Νερό | Αγωγιμότητα ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$ | 30-50 |

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Η τύρφη ξηραίνεται στον αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη. Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης σε απιονισμένο νερό με τη βοήθεια ομοιογενποιητή υψηλής απόδοσης. Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο $5,5 \pm 0,5$ με CaCO_3 . Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 ± 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται εκ νέου και θα πρέπει να είναι $6,0 \pm 0,5$. Στη συνέχεια, το εναιώρημα τύρφης αναμειγνύεται με τα άλλα συστατικά (άμμος και καολιντική άργιλος) και με απιονισμένο νερό για να ληφθεί ένα ομοιογενές ιζήμα με περιεκτικότητα σε νερό 30–50 % επί του ξηρού βάρους του ιζήματος. Το pH του τελικού μείγματος μετράται και πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με CaCO_3 , εάν είναι απαραίτητο. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Στη συνέχεια, πριν από τη χρήση του ιζήματος στη δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες, συνιστάται ο εγκλιματισμός του μορφοποιημένου ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Τα ξηρά συστατικά για την παρασκευή του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το μορφοποιημένο (υγρό) ιζήμα δεν θα πρέπει να αποθηκεύεται πριν από τη χρήση του στη δοκιμή. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την πάροδο των 7 ημερών εγκλιματισμού με τον οποίο ολοκληρώνεται η παρασκευή του.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline Ap. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. και B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

Προσάρτημα 4

Χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραιώσης

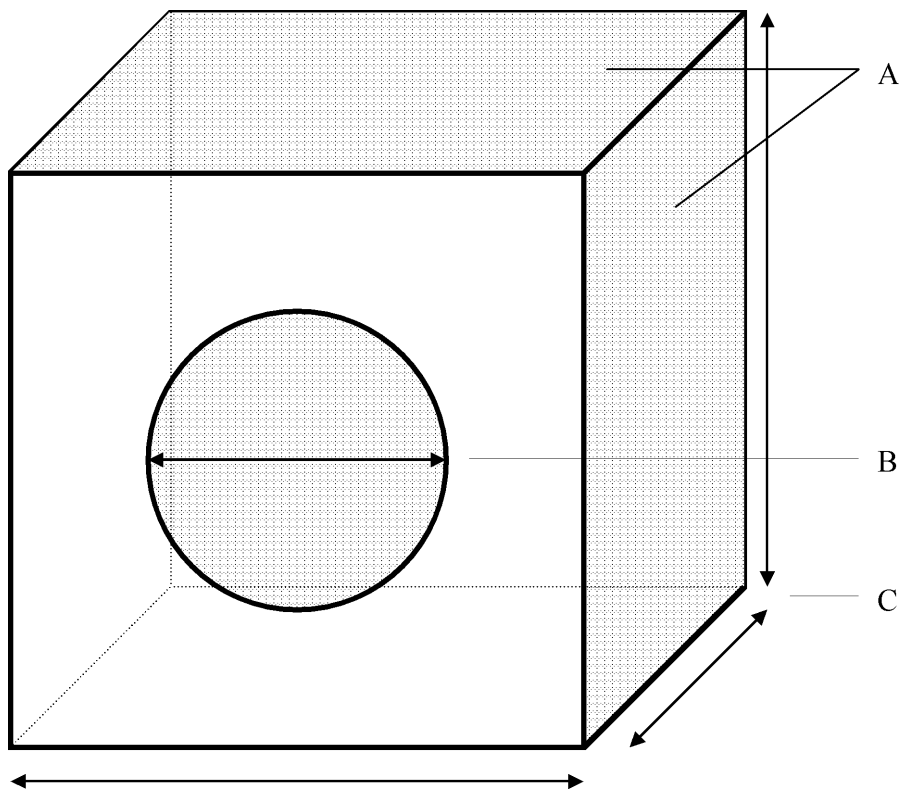
| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ |
|---------------------------------------------------------------------|----------------|
| Σωματίδια | < 20 mg/l |
| Ολικός οργανικός άνθρακας | < 2 mg/l |
| Μη ιονισμένη αμμωνία | < 1 µg/l |
| Σκληρότητα ως CaCO ₃ | < 400 mg/l (*) |
| Υπολείμματα χλωρίου | < 10 µg/l |
| Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα | < 50 ng/l |
| Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια | < 50 ng/l |
| Ολικό οργανικό χλώριο | < 25 ng/l |

(*) Ωστόσο, σημειώνεται ότι εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας (και, ως εκ τούτου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό Elendt M4 σε αυτήν την περίπτωση).

Προσάρτημα 5

Καθοδήγησή για την εκτέλεση της δοκιμής

Παράδειγμα κλωβού αναπαραγωγής:

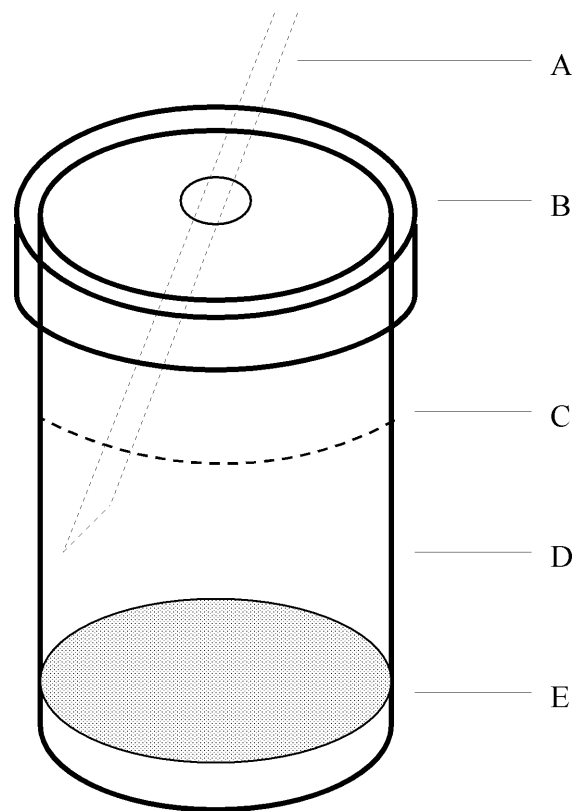


A: γάζα στο επάνω μέρος και σε μία τουλάχιστον πλευρά του κλωβού (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm)

B: άνοιγμα για την τοποθέτηση των εμφανιζόμενων ενήλικων ατόμων μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής και για την απομάκρυνση των αλυσίδων αυγών από τα δοχεία κρυστάλλωσης (δεν εμφανίζεται σε αυτήν την απεικόνιση)

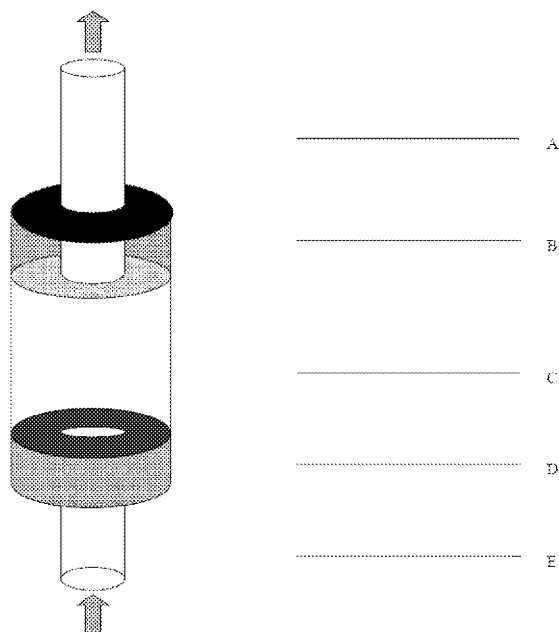
Γ: κλωβός αναπαραγωγής μεγέθους τουλάχιστον 30 cm σε μήκος, 30 cm σε ύψος και 30 cm σε πλάτος

Παράδειγμα δοχείου δοκιμής:



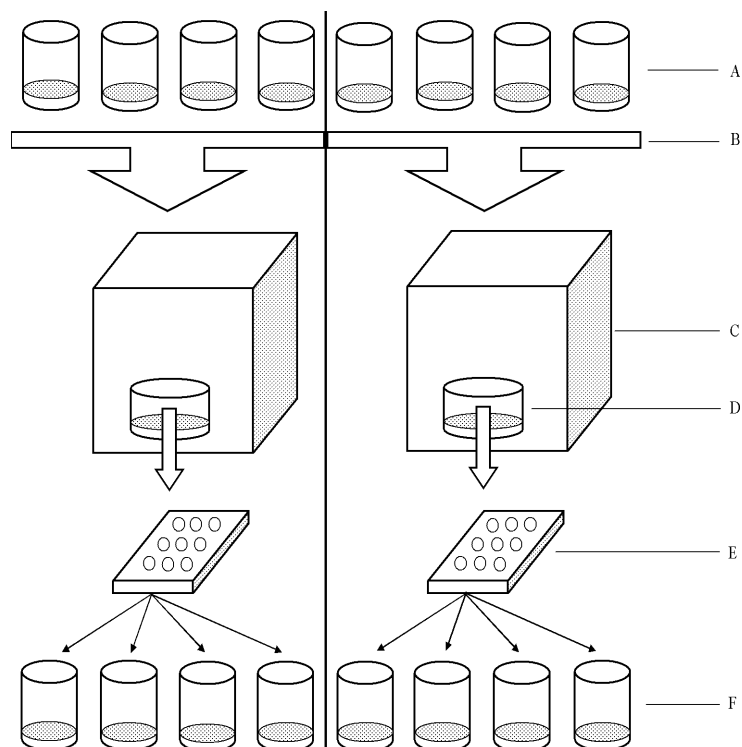
- A: σιφόνιο pasteur για την παροχή αέρα στο υπερκείμενο νερό
- B: γυάλινο καπάκι για την αποφυγή διαφυγής των εμφανιζόμενων χειρονόμων
- Γ: στρώμα επιφάνειας νερού
- Δ: δοχείο δοκιμής (ποτήρι ζέσεως τουλάχιστον 600 ml)
- E: στρώμα ιζήματος

Παράδειγμα φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα για τη λήψη ενήλικων χειρονόμων (τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση ροής του αέρα):



- A: γυάλινος σωλήνας (εσωτερική διάμετρος περίπου 5 mm) συνδεδεμένος σε αντλία αυτόματης πλήρωσης
- B: πώμα από βουλκανισμένο καουτσούκ, διατρημένο με γυάλινο σωλήνα (A). Στην εσωτερική πλευρά, το άνοιγμα του γυάλινου σωλήνα (A) είναι καλυμμένο με λίγο βαμβάκι και γάζα (μέγεθος πλέγματος περίπου 1 mm) για την αποφυγή πρόκλησης ζημιάς στους χειρονόμους όταν απορροφώνται μέσα στον φυσητήρα εμφυσήσεως αέρα
- Γ: διαφανής περιέκτης (πλαστικός ή γυάλινος, μήκους περίπου 15 cm) για τη λήψη των χειρονόμων
- Δ: πώμα από βουλκανισμένο καουτσούκ, διατρημένο με σωλήνα (E). Για την απελευθέρωση των χειρονόμων μέσα στον κλωβό αναπαραγωγής, το πώμα Δ αφαιρείται από τον περιέκτη Γ
- E: σωλήνας (πλαστικός ή γυάλινος, εσωτερική διάμετρος περίπου 8 mm) για τη συλλογή των ενήλικων χειρονόμων από το δοχείο

Σχηματική παρουσίαση μιας δοκιμής κύκλου ζωής:



- A: πατρική γενιά — δοχεία δοκιμής που περιέχουν σύστημα ιζήματος-νερού, οκτώ επαναλήψεις, 20 προνύμφες πρώτου σταδίου ανά δοχείο
- B: τέσσερα δοχεία δοκιμής για κάθε κλωβό αναπαραγωγής, A και B
- Γ: κλωβοί αναπαραγωγής (A και B) για δημιουργία σμήνους, ζευγάρι και ωοτοκία
- Δ: δίσκοι κρυστάλλωσης για την εναπόθεση των αλυσίδων αυγών
- Ε: μικροπλάκες, ένα βοθρίο για κάθε αλυσίδα αυγών
- ΣΤ: πρώτη θυγατρική γενιά — δοχεία δοκιμής που περιέχουν σύστημα ιζήματος-νερού, οκτώ επαναλήψεις, 20 προνύμφες πρώτου σταδίου ανά δοχείο

Γ.41. ΔΟΚΙΜΗ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΨΑΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 234 του ΟΟΣΑ (2011). Βασίζεται σε μια απόφαση του 1998 για την εκπόνηση νέων μεθόδων δοκιμών ή την ενημέρωση των υφιστάμενων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Η δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών (FSDT) θεωρήθηκε μια ελπιδοφόρα μέθοδος δοκιμών που καλύπτει ένα ευαίσθητο στάδιο ζωής των ψαριών το οποίο ανταποκρίνεται σε οιστρογόνα και χημικές ουσίες που μοιάζουν με ανδρογόνα. Η μέθοδος δοκιμών υποβλήθηκε σε διεργαστηριακή διαδικασία επικύρωσης από το 2006 έως το 2010, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε επικύρωση για το ρυζόψαρο (*Oryzias latipes*), το ζεβρόψαρο (*Danio rerio*) και τον τριάκανθο γαστερόστεο (*Gasterosteus aculeatus*), ενώ πραγματοποιήθηκε μερική επικύρωση για τον λιποκέφαλο φοξίνο (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Το παρόν πρωτόκολλο περιλαμβάνει το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο. Το πρωτόκολλο είναι, κατ' αρχήν, μια βελτίωση της κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ: Fish, Early Life Stage Toxicity Test (Δοκιμή τοξικότητας κατά το αρχικό στάδιο της ζωής των ψαριών) (1), όπου η έκθεση συνεχίζεται μέχρι τη σεξουαλική διαφοροποίηση των ψαριών, δηλ. περίπου 60 ημέρες μετά την εκκόλαψη (days post-hatch, dph) για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο (η περίοδος έκθεσης μπορεί να είναι μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας για άλλα είδη που θα επικυρωθούν στο μέλλον) και προστίθενται τελικά σημεία ευαίσθητα από ενδοκρινολογικής άποψης. Η δοκιμή FSDT εκτιμά τις επιδράσεις στα αρχικά στάδια της ζωής και τις πιθανές δυσμενείς συνέπειες των χημικών ουσιών που θεωρείται ότι διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα (π.χ. οιστρογόνα, ανδρογόνα και αναστολείς στεροειδογένεσης) στη σεξουαλική ανάπτυξη. Ο συνδυασμός των δύο βασικών ενδοκρινικών τελικών σημείων, ήτοι η συγκέντρωση λεκτινογενίνης (VTG) και η αναλογία φαινοτυπικού φύλου, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του τρόπου δράσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας με τη δοκιμή. Λόγω της σχετιζόμενης με τον πληθυσμό αλλαγής στην αναλογία φαινοτυπικού φύλου, η δοκιμή FSDT μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και του κινδύνου. Ωστόσο, εάν η δοκιμή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας ή του κινδύνου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο γαστερόστεος, καθώς τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα δεδομένα επικύρωσης έχουν δείξει ότι σε αυτό το είδος οι τροποποιήσεις της αναλογίας φαινοτυπικού φύλου από τις υπό δοκιμή χημικές ουσίες δεν ήταν συχνές.
2. Το πρωτόκολλο βασίζεται στην έκθεση ψαριών σε χημικές ουσίες μέσω του νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου σεξουαλικής ευμεταβλητότητας κατά την οποία αναμένεται ότι τα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα στις επιδράσεις των χημικών ουσιών που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα και παρεμβαίνουν στη σεξουαλική ανάπτυξη. Δύο βασικά τελικά σημεία μετρώνται ως δείκτες αναπτυξιακών ανωμαλιών που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα, οι συγκεντρώσεις VTG και οι αναλογίες φύλου (ποσοστά των φύλων) που προσδιορίζονται με ιστολογική ανάλυση των γονάδων. Η ιστοπαθολογική ανάλυση των γονάδων (αξιολόγηση και προσδιορισμός σταδίου των ωοκυττάρων και των σπερματογόνων κυττάρων) είναι προαιρετική. Επιπλέον, προσδιορίζεται το γενετικό φύλο, όπου είναι δυνατόν (π.χ. στο ρυζόψαρο και στον τριάκανθο γαστερόστεο). Η παρουσία ενός δείκτη γενετικού φύλου αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς αυξάνει την ισχύ των στατιστικών στοιχείων για την αναλογία φύλου και επιτρέπει τον εντοπισμό μιας μεμονωμένης αναστροφής του φαινοτυπικού φύλου. Άλλα κορυφαία τελικά σημεία που θα πρέπει να μετρώνται περιλαμβάνουν τον ρυθμό εκκόλαψης, την επιβίωση, το μήκος και το σωματικό βάρος. Η μέθοδος δοκιμών ενδεχομένως να μπορεί να προσαρμοστεί σε άλλα είδη εκτός από τα προαναφερόμενα, με την προϋπόθεση ότι αυτά τα άλλα είδη υποβάλλονται σε διαδικασία επικύρωσης ανάλογη με αυτήν που διεξήχθη για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο, ότι τα ψάρια-μάρτυρες διαφοροποιούνται σεξουαλικά στο τέλος της δοκιμής, ότι τα επίπεδα VTG είναι επαρκώς υψηλά για την ανίχνευση σημαντικών μεταβολών που σχετίζονται με τη χημική ουσία και ότι καθορίζεται η ευαισθησία του συστήματος δοκιμής με τη χρήση χημικών ουσιών αναφοράς που επιδρούν στο ενδοκρινικό σύστημα ((αντι)-οιστρογόνα, (αντι)-ανδρογόνα, αναστολείς αρωματάσης κ.λπ.). Επιπλέον, κάθε έκθεση επικύρωσης σχετικά με τα δεδομένα της δοκιμής FSDT με χρήση άλλων ειδών θα πρέπει να εξετάζεται από τον ΟΟΣΑ και το αποτέλεσμα της επικύρωσης θα πρέπει να κρίνεται ως ικανοποιητικό.

Αρχικές εκτιμήσεις και περιορισμοί

3. Η VTG κανονικά παράγεται στο ήπαρ των θηλυκών ωτόκων σπονδυλωτών ως απόκριση στα κυκλοφορούντα ενδογενή οιστρογόνα (2). Αποτελεί πρόδρομη ουσία των πρωτεϊνών της λεκτινίου του αυγού και, μετά την παραγωγή της στο ήπαρ, φθάνει στην ωθήκη μέσω της κυκλοφορίας του αίματος όπου προσλαμβάνεται και τροποποιείται από τα υπό ανάπτυξη αυγά. Η σύνθεση VTG είναι πολύ περιορισμένη, αλλά ανιχνεύσιμη, στα ανώριμα ψάρια και στα ενήλικα αρσενικά ψάρια, επειδή δεν διαθέτουν επαρκή επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων. Ωστόσο, το ήπαρ είναι ικανό να συνθέτει και να εκκρίνει VTG ως απόκριση στην εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων (3) (4) (5).
4. Η μέτρηση της VTG χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με οιστρογόνο, αντι-οιστρογόνο και ανδρογόνο δράση, καθώς και χημικών ουσιών που παρεμβαίνουν στη στεροειδογένεση, όπως οι αναστολείς αρωματάσης. Η ανίχνευση χημικών ουσιών με οιστρογόνο δράση είναι δυνατή μέσω μέτρησης της προκαλούμενης έκκρισης VTG σε αρσενικά ψάρια και έχει τεκμηριωθεί επαρκώς στην αξιολογηθείσα από ομοτίμους επιστημονική βιβλιογραφία. Η πρόκληση έκκρισης VTG έχει καταδειχθεί επίσης μετά από έκθεση σε ανδρογόνα που δύνανται να υποστούν αρωματοποίηση (6) (7). Η μείωση στα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στα θηλυκά, για παράδειγμα μέσω αναστολής της αρωματάσης που μετατρέπει τα ενδογενή ανδρογόνα στο φυσικό οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη, προκαλεί μείωση

της συγκέντρωσης VTG, η οποία χρησιμεύει για την ανίχνευση χημικών ουσιών με ιδιότητες αναστολής αρωματάσης ή αναστολών στεροειδογένεσης γενικότερα (33). Η βιολογική συνάφεια της απόκρισης VTG μετά από αναστολή οιστρογόνων/αρωματάσης έχει καθοριστεί και τεκμηριωθεί ευρέως (8) (9). Ωστόσο, η παραγωγή VTG στα θηλυκά είναι πιθανό να επηρεάζεται και από τη γενική τοξικότητα και τις τοξικές δράσεις που δεν σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα.

5. Διάφορες μέθοδοι μέτρησης έχουν αναπτυχθεί και τυποποιηθεί με επιτυχία για χρήση ρουτίνας στον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG στο αίμα, στο ήπαρ και σε ομογενοποιημένα δείγματα ολόκληρου του σώματος ή κεφαλιού/ουράς που συλλέγονται από μεμονωμένα ψάρια. Αυτό ισχύει για το ζεβρόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ρυζόψαρο, καθώς επίσης και για το μερικώς επικυρωμένο είδος του λιποκέφαλου φοξίνου. Υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA) ειδικές για το είδος που χρησιμοποιούν ανοσοχημεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Στο ρυζόψαρο και στο ζεβρόψαρο, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της VTG που μετράται από το πλάσμα αίματος, το ήπαρ και τα ομογενοποιημένα δείγματα, αν και τα ομογενοποιημένα δείγματα τείνουν να εμφανίζουν ελαφρώς χαμηλότερες τιμές σε σχέση με το πλάσμα (17) (18) (19). Στο προσάρτημα 5 παρέχονται οι συνιστώμενες διαδικασίες συλλογής δειγμάτων για την ανάλυση VTG.
6. Η αλλαγή στην αναλογία φαινοτυπικού φύλου (ποσοστά των φύλων) αποτελεί ένα τελικό σημείο που αντικατοπτρίζει την αναστροφή φύλου. Κατ' αρχήν, τα οιστρογόνα, τα αντι-οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, τα αντι-ανδρογόνα και οι χημικές ουσίες που αναστέλλουν τη στεροειδογένεση μπορούν να επηρεάσουν την αναλογία φύλου σε αναπτυσσόμενα ψάρια (20). Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η αναστροφή φύλου είναι μερικώς αναστρέψιμη στο ζεβρόψαρο (21) μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες που μοιάζουν με οιστρογόνα, ενώ η αναστροφή φύλου μετά από έκθεση σε χημικές ουσίες που μοιάζουν με ανδρογόνα είναι μόνιμη (30). Το φύλο ορίζεται ως θηλυκό, αρσενικό, διεμφυλικό (παρουσία ωοκυττάρων και σπερματογόνων κυττάρων σε μία γονάδα) ή αδιαφοροποίητο και προσδιορίζεται για κάθε ψάρι μέσω ιστολογικής εξέτασης των γονάδων. Παρέχεται καθοδήγηση στο προσάρτημα 7 και στο έγγραφο OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (Έγγραφο κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για τη διάγνωση ιστοπαθολογικών ευρημάτων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα σε γονάδες ψαριών) (22).
7. Το γενετικό φύλο εξετάζεται μέσω γενετικών δεικτών όταν υπάρχουν σε ένα δεδομένο είδος ψαριού. Στο ρυζόψαρο, τα γονίδια XX για τα θηλυκά ή XY για τα αρσενικά μπορούν να ανιχνεύονται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή με την ανάλυση του γονιδίου περιοχής DM του χρωμοσώματος Y (DMY) (αρνητικό ή θετικό για το DMY), όπως περιγράφεται στα σημεία (23) (24). Για τον τριάκανθο γαστερόστεο, υπάρχει μια ισοδύναμη μέθοδος PCR για τον καθορισμό του γενετικού φύλου που περιγράφεται στο προσάρτημα 10. Όταν το γενετικό φύλο μπορεί να συνδεθεί για κάθε άτομο με το φαινοτυπικό φύλο, η ισχύς της δοκιμής βελτιώνεται. Συνεπώς, το γενετικό φύλο θα πρέπει να καθορίζεται σε είδη με τεκμηριωμένους δείκτες γενετικού φύλου.
8. Τα δύο βασικά ενδοκρινικά τελικά σημεία, η VTG και η αναλογία φύλου, μπορούν σε συνδυασμό να καταδείξουν τον τρόπο δράσης (ΤΔ) της χημικής ουσίας στο ενδοκρινικό σύστημα (πίνακας 1). Η αναλογία φύλου είναι ένας βιοδείκτης που σχετίζεται με τον πληθυσμό (25) (26) και για ορισμένους καλά καθορισμένους τρόπους δράσης, τα αποτελέσματα της δοκιμής FSDT μπορούν να χρησιμοποιούνται για σκοπούς εκτίμησης της επικινδυνότητας και του κινδύνου όταν κρίνεται σκόπιμο από τη ρυθμιστική αρχή. Προς το παρόν, αυτοί οι τρόποι δράσης είναι τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα και οι αναστολές στεροειδογένεσης.

Πίνακας 1

Αντίδραση των ενδοκρινικών τελικών σημείων στους διαφορετικούς τρόπους δράσης των χημικών ουσιών:

↑ = αύξηση, ↓ = μείωση, — = δεν έχει διερευνηθεί

| ΤΔ | VTG ♂ | VTG ♀ | Αναλογία φύλου | Παραπομπές |
|-------------------------------|-------|-------|------------------------|------------|
| Ασθενής αγωνιστής οιστρογόνων | ↑ | ↑ | ↑♀ ή ↑Αδιαφ. | (27) (40) |
| Ισχυρός αγωνιστής οιστρογόνων | ↑ | ↑ | ↑♀ ή ↑Αδιαφ., Κανένα ♂ | (28) (40) |
| Ανταγωνιστής οιστρογόνων | — | — | ↓♀, ↑Αδιαφ. | (29) |
| Αγωνιστής ανδρογόνων | ↓ ή — | ↓ ή — | ↑ ♂, Κανένα ♀ | (28) (30) |
| Ανταγωνιστής ανδρογόνων | — | — | ↑♀ ↑Διεμφυλικό | (31) |
| Αναστολέας αρωματάσης | ↓ | ↓ | ↓♀ | (33) |

9. Η δοκιμή FSDT δεν καλύπτει το αναπαραγωγικό στάδιο ζωής των ψαριών και, επομένως, οι χημικές ουσίες για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι επηρεάζουν την αναπαραγωγή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές της σεξουαλικής ανάπτυξης θα πρέπει να εξετάζονται σε μια δοκιμή που καλύπτει την αναπαραγωγή.
10. Οι ορισμοί για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών παρέχονται στο προσάρτημα 1.
11. Η δοκιμή FSDT *in vivo* προορίζεται για τον εντοπισμό χημικών ουσιών με ανδρογόνες και οιστρογόνες ιδιότητες, καθώς και αντι-ανδρογόνες, αντι-οιστρογόνες και ανασταλτικές της στεροειδογένεσης ιδιότητες. Οι φάσεις επικύρωσης (1 και 2) της δοκιμής FSDT όντως κάλυψαν χημικές ουσίες με οιστρογόνες, ανδρογόνες και ανασταλτικές της στεροειδογένεσης ιδιότητες. Οι επιδράσεις των ανταγωνιστών οιστρογόνων και ανδρογόνων στη δοκιμή FSDT παρουσιάζονται στον πίνακα 1, αλλά προς το παρόν αυτοί οι ΤΔ είναι λιγότερο τεκμηριωμένοι.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

12. Στη δοκιμή, τα ψάρια εκτίθενται από τη φάση του προσφάτως γονιμοποιημένου αυγού έως την ολοκλήρωση της σεξουαλικής διαφοροποίησης, σε τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που αραιώνεται σε νερό. Οι συνθήκες δοκιμής θα πρέπει να είναι συνεχούς ροής νερού, εκτός εάν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω της διαθεσιμότητας ή της φύσης (π.χ. περιορισμένη διαλυτότητα) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Η δοκιμή ξεκινάει με την τοποθέτηση προσφάτως γονιμοποιημένων αυγών (πριν από τη διαίρεση του βλαστόδισκου) στους θαλάμους δοκιμής. Η πλήρωση των θαλάμων περιγράφεται για κάθε είδος στην παράγραφο 27. Για τα επικυρωμένα είδη ψαριών, το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστεο και το ζεβρόψαρο, η δοκιμή τερματίζεται στις 60 dph. Κατά τον τερματισμό της δοκιμής, όλα τα ψάρια υποβάλλονται σε ανώδυνη ευθανασία. Λαμβάνεται ένα βιολογικό δείγμα (πλάσμα αίματος, ήπαρ ή ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς) για ανάλυση της VTG από κάθε ψάρι και το υπόλοιπο μέρος μονιμοποιείται για ιστολογική αξιολόγηση των γονάδων, ώστε να καθοριστεί το φαινοτυπικό φύλο. Προαιρετικά, μπορεί να διεξαχθεί ιστοπαθολογική εξέταση (π.χ. προσδιορισμός σταδίου των γονάδων, σοβαρότητα της διεμφυλικότητας). Λαμβάνεται ένα βιολογικό δείγμα (εδρικό ή ραχιαίο πτερύγιο) για τον καθορισμό του γενετικού φύλου σε είδη που έχουν τους κατάλληλους δείκτες (προσαρτήματα 9 και 10).
13. Μια επισκόπηση των σχετικών συνθηκών της δοκιμής ειδικά για τα επικυρωμένα είδη: ρυζόψαρο, τριάκανθο γαστερόστεο και ζεβρόψαρο, παρέχεται στο προσάρτημα 2.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

14. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμα αποτελέσματα από μια δοκιμή οξείας τοξικότητας ή άλλη βραχυχρόνια δοκιμασία τοξικότητας [π.χ. μέθοδος δοκιμών Γ.14 (34) και κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ (1)], η οποία, κατά προτίμηση, θα έχει διεξαχθεί με το είδος που έχει επιλεγεί για αυτήν τη δοκιμή. Αυτό σημαίνει ότι η υδατοδιαλυτότητα και η τάση ατμών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι γνωστές και υπάρχει διαθέσιμη αξιόπιστη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής ουσίας στους θαλάμους δοκιμής με γνωστή και δημοσιευμένη ακρίβεια (accuracy) και όριο ανίχνευσης.
15. Στις χρήσιμες πληροφορίες περιλαμβάνονται ο συντακτικός τύπος, η καθαρότητα της χημικής ουσίας, η σταθερότητα στο νερό και το φως, η pK_a , η P_{ow} και αποτελέσματα δοκιμής ως προς την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα (μέθοδος δοκιμών Γ.4) (35).

Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής

16. Για να θεωρηθούν αποδεκτά τα αποτελέσματα της δοκιμής, πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:
 - Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 60 τοις εκατό της τιμής κορεσμού με αέρα (air saturation value -ASV) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής,
 - Η θερμοκρασία του νερού μεταξύ των θαλάμων δοκιμής δεν θα πρέπει να διαφέρει κατά περισσότερο από $\pm 1,5$ °C σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης και θα πρέπει να διατηρείται εντός του εύρους θερμοκρασιών που ορίζεται για το υπό δοκιμή είδος (προσάρτημα 2),
 - Θα πρέπει να διατίθεται μια επικυρωμένη μέθοδος για την ανάλυση της χημικής ουσίας έκθεσης με όριο ανίχνευσης πολύ χαμηλότερο από την κατώτατη ονομαστική συγκέντρωση και θα πρέπει να συλλέγονται ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχουν διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός ± 20 % των μέσων τιμών που έχουν μετρηθεί,

- Η συνολική επιβίωση των γονιμοποιημένων αυγών στους μάρτυρες και, κατά περίπτωση, στους μάρτυρες με διαλύτη, θα πρέπει να είναι ανώτερη ή ίση με τις οριακές τιμές που καθορίζονται στο προσάρτημα 2,
- Τα κριτήρια αποδοχής που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τα ποσοστά των φύλων κατά τον τερματισμό της δοκιμής βασίζονται σε δεδομένα από τις ομάδες-μάρτυρες (συνενωμένα δεδομένα από διαλύτη και μάρτυρα νερού, εκτός εάν διαφέρουν σημαντικά, οπότε σε αυτήν την περίπτωση μόνο από διαλύτη):

| | | Ρυζόψαρο | Ζεβρόψαρο | Τριάκανθος γαστερόστεος |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------------------|
| Ανάπτυξη | Υγρό βάρος ψαριού που έχει στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί | > 150 mg | > 75 mg | > 120 mg |
| | Μήκος (τυπικό μήκος) | > 20 mm | > 14 mm | > 20 mm |
| Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) | | 30-70 % | 30-70 % | 30-70 % |

- Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης, αυτός δεν θα πρέπει να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ούτε να προκαλεί διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος ή άλλες δυσμενείς επιδράσεις στα αρχικά στάδια της ζωής, όπως γίνεται αντιληπτό με μάρτυρα που περιέχει διαλύτη.

Εάν παρατηρηθεί απόκλιση από τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμής, οι συνέπειες θα πρέπει να εκτιμώνται σε σχέση με την αξιοπιστία των δεδομένων της δοκιμής και οι εκτιμήσεις αυτές θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στην έκθεση.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Θάλαμοι δοκιμής

17. Μπορεί να χρησιμοποιείται οποιοσδήποτε θάλαμος από γυαλί, ανοξείδωτο χάλυβα ή άλλο χημικώς αδρανές υλικό. Οι διαστάσεις των θαλάμων θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να ανταποκρίνονται στα κριτήρια για τον ρυθμό πλήρωσης που παρέχονται παρακάτω. Είναι επιθυμητό οι θάλαμοι δοκιμής να τοποθετούνται με τυχαίο τρόπο στον χώρο εκτέλεσης των δοκιμών. Προτιμάται ένας τυχαίοποιημένος σχεδιασμός σε ομάδες με παρουσία κάθε συγκέντρωσης σε κάθε ομάδα αντί του πλήρως τυχαίοποιημένου σχεδιασμού. Οι θάλαμοι δοκιμής θα πρέπει να προστατεύονται από ανεπιθύμητες οχλήσεις.

Επίλογή ειδών

18. Τα συνιστώμενα είδη ψαριών περιλαμβάνονται στο προσάρτημα 2. Οι διαδικασίες για την ένταξη νέων ειδών παρέχονται στην παράγραφο 2.

Διατήρηση των γονικών ψαριών

19. Λεπτομέρειες για τη διατήρηση των γονικών ψαριών κάτω από ικανοποιητικές συνθήκες παρέχονται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ (1). Τα γονικά ψάρια θα πρέπει να σιτίζονται μία ή δύο φορές την ημέρα με κατάλληλη τροφή.

Χειρισμός των εμβρύων και των προνυμφών

20. Αρχικά, τα έμβρυα και οι προνύμφες μπορούν να εκτίθενται στην υπό δοκιμή χημική ουσία μέσα σε έναν κύριο θάλαμο εντός μικρότερων θαλάμων από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα, των οποίων οι πλευρές ή τα άκρα είναι από πλέγμα για να επιτρέπεται ροή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας μέσα στον θάλαμο. Για να μην προκαλείται στροβιλώδης ροή διαμέσου αυτών των μικρών θαλάμων, οι εν λόγω θάλαμοι μπορούν να αναρτώνται από έναν βραχίονα στήριξης διαμορφωμένο ώστε να μετακινεί τον θάλαμο προς τα επάνω και προς τα κάτω, διατηρώντας ωστόσο τους οργανισμούς πάντα βυθισμένους στο νερό.
21. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται περιέκτες αυγών, σχάρες ή πλέγματα για τη συγκράτηση των αυγών εντός του κυρίου θαλάμου δοκιμής, αυτά θα πρέπει να αφαιρούνται μετά την εκκόλαψη των προνυμφών, εκτός από τα πλέγματα που χρειάζονται για να μην διαφεύγουν τα ψάρια. Εάν είναι αναγκαίο να μεταφερθούν οι προνύμφες, δεν θα πρέπει να εκτεθούν στον αέρα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δίκτυα για την απελευθέρωση των ψαριών από τους περιέκτες συγκράτησης αυγών. Η μεταφορά, η χρονική στιγμή της οποίας εξαρτάται από το είδος, δεν είναι πάντοτε απαραίτητη.

Νερό

22. Κάθε νερό, στο οποίο το είδος δοκιμής παρουσιάζει επιβίωση του μάρτυρα τουλάχιστον το ίδιο καλή με αυτή στο νερό που περιγράφεται στο προσάρτημα 3, είναι κατάλληλο ως νερό δοκιμής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Για να διασφαλίζεται ότι το νερό της αραιώσης δεν θα επηρεάζει κατά τρόπο ανεπιθύμητο το αποτέλεσμα της δοκιμής (π.χ. αντιδρώντας με την υπό δοκιμή χημική ουσία) ή τη συμπεριφορά των γεννητόρων, θα πρέπει κατά διαστήματα να λαμβάνονται δείγματα για ανάλυση. Ο ολικός οργανικός άνθρακας, η αγωγιμότητα, το pH και τα αιωρούμενα στερεά θα πρέπει να μετρώνται, για παράδειγμα, κάθε τρεις μήνες όταν είναι γνωστό ότι το νερό αραιώσης είναι σχετικά σταθερής ποιότητας. Αν η ποιότητα του νερού είναι αμφίβολη, θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις για βαρέα μέταλλα (π.χ. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), βασικά ανιόντα και κατιόντα (π.χ. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻) και φυτοφάρμακα. Λεπτομέρειες για τη χημική ανάλυση και τη συλλογή νερού περιλαμβάνονται στην παράγραφο 34.

Διαλύματα δοκιμής

23. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται σύστημα συνεχούς ροής νερού, εάν είναι πρακτικώς εφικτό. Στις δοκιμές συνεχούς ροής νερού, για την προσαγωγή μιας σειράς συγκεντρώσεων διαλύματος στους θαλάμους δοκιμής απαιτείται σύστημα το οποίο παρέχει συνεχώς και αραιώνει ένα διάλυμα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (π.χ. αντλία μετρήσεως, αναλογικός αραιωτής και σύστημα κορεσμού). Οι ταχύτερες ροές των διαλυμάτων παρακαταθήκης και του νερού αραιώσης θα πρέπει να ελέγχονται κατά διαστήματα κατά τη διάρκεια της δοκιμής και δεν θα πρέπει να διαφέρουν κατά περισσότερο από 10 % καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Θεωρείται κατάλληλη μια ταχύτητα ροής ισοδύναμη με τον όγκο τουλάχιστον πέντε θαλάμων δοκιμής ανά 24 ώρες (1). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η χρήση πλαστικών σωληνώσεων ή άλλων υλικών, μερικά από τα οποία μπορεί να περιέχουν βιολογικώς δραστικές χημικές ουσίες ή να προσροφούν την υπό δοκιμή χημική ουσία.
24. Το διάλυμα παρακαταθήκης θα πρέπει να παρασκευάζεται, κατά προτίμηση, χωρίς τη χρήση διαλυτών, με απλή ανάμειξη ή ανάδευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο νερό αραιώσης με τη χρήση μηχανικών μέσων (π.χ. ανάδευση ή κατεργασία με υπερήχους). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, θα πρέπει να ακολουθούνται οι διαδικασίες που προβλέπονται στο έγγραφο OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τις δοκιμές υδατικής τοξικότητας δύσκολων ουσιών και μειγμάτων) (36). Η χρήση διαλυτών θα πρέπει να αποφεύγεται, αλλά μπορεί να είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να παρασκευασθεί ένα κατάλληλο συμπυκνωμένο διάλυμα παρακαταθήκης. Παραδείγματα διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιούνται παρέχονται στο σημείο (36).
25. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι ημιστατικές συνθήκες δοκιμής, εκτός εάν παρέχεται αιτιολόγηση στην οποία γίνεται αναφορά σε επιτακτικούς λόγους που σχετίζονται με την υπό δοκιμή χημική ουσία (π.χ. σταθερότητα, περιορισμένη διαθεσιμότητα, υψηλό κόστος ή υψηλός κίνδυνος). Για την ημιστατική τεχνική, είναι δυνατόν να ακολουθούνται δύο διαφορετικές διαδικασίες ανανέωσης. Είτε προετοιμάζονται καινούρια διαλύματα δοκιμής σε καθαρούς θαλάμους και τα αυγά και οι προνύμφες που επιβιώνουν μεταφέρονται προσεκτικά στους καινούριους θαλάμους, είτε οι οργανισμοί δοκιμής διατηρούνται στους θαλάμους δοκιμής και ένα μέρος (τουλάχιστον τα δύο τρίτα) του νερού δοκιμής ανανεώνεται σε καθημερινή βάση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συνθήκες έκθεσης

Συλλογή των αυγών και διάρκεια

26. Για την αποφυγή της μεροληψίας από γενετικής απόψεως, τα αυγά συλλέγονται από τουλάχιστον τρία ζεύγη ή ομάδες αναπαραγωγής, αναμειγνύονται και επιλέγονται τυχαία για την έναρξη της δοκιμής. Για τον τριάκανθο γαστερόστυο, βλέπε την περιγραφή της τεχνητής γονιμοποίησης στο προσάρτημα 11. Η δοκιμή θα πρέπει να ξεκινάει το συντομότερο δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση των αυγών και τα έμβρυα θα πρέπει να βυθίζονται στα διαλύματα δοκιμής, κατά προτίμηση, πριν από την έναρξη διαίρεσης του βλαστοδίσκου ή όσο το δυνατό συντομότερα μετά το στάδιο αυτό και όχι αργότερα από 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η δοκιμή θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρι την ολοκλήρωση της σεξουαλικής διαφοροποίησης στην ομάδα-μάρτυρα (60 dph για το ρυζόψαρο, τον τριάκανθο γαστερόστυο και το ζεβρόψαρο).

Πλήρωση

27. Ο αριθμός των γονιμοποιημένων αυγών κατά την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 120 αυγά για κάθε συγκέντρωση, τα οποία διαιρούνται σε τουλάχιστον 4 επαναλήψεις (η κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τον μάρτυρα είναι αποδεκτή). Τα αυγά θα πρέπει να κατανέμονται τυχαία (με τη χρήση στατιστικών πινάκων για την τυχαίοποίηση) στις αγωγές. Ο ρυθμός πλήρωσης (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλός ώστε να μπορεί να διατηρείται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε τιμή ίση με τουλάχιστον το 60 % της ASV χωρίς άμεσο αερισμό των θαλάμων. Για τις δοκιμές συνεχούς ροής νερού, συνιστάται ο ρυθμός πλήρωσης να μην υπερβαίνει τα 0,5 g/l ανά 24ωρο και να μην υπερβαίνει τα 5 g/l διαλύματος οποιαδήποτε στιγμή. Ο αριθμός των ψαριών ανά επανάληψη θα πρέπει να κατανέμεται εκ νέου, το αργότερο 28 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, ώστε κάθε επανάληψη να περιέχει ίσο αριθμό ψαριών, στον βαθμό που αυτό είναι εφικτό. Εάν προκύψει θνησιμότητα που σχετίζεται με την έκθεση, ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να μειώνεται ανάλογα, ώστε οι πυκνότητες των ψαριών μεταξύ των επιπέδων αγωγής να παραμένουν, όσο το δυνατόν περισσότερο, ίσες.

Φως και θερμοκρασία

28. Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι κατάλληλες για τα είδη δοκιμής (για τις πειραματικές συνθήκες σχετικά με τη δοκιμή FSDT, βλ. προσάρτημα 2).

Σίτιση

29. Η τροφή και η σίτιση αποτελούν βασικούς παράγοντες και είναι σημαντικό να παρέχεται η σωστή τροφή για κάθε στάδιο, στα κατάλληλα χρονικά διαστήματα και σε επαρκή ποσότητα ώστε να υποστηρίζεται η φυσιολογική ανάπτυξη. Η σίτιση θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά βούληση (*ad libitum*), ενώ θα πρέπει να ελαχιστοποιείται η πλεονάζουσα ποσότητα τροφής. Για την επίτευξη επαρκούς ρυθμού ανάπτυξης, θα πρέπει να παρέχεται τροφή στα ψάρια τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα (είναι αποδεκτή η σίτιση μία φορά ημερησίως τα σαββατοκύριακα), ενώ θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον τρεις ώρες μεταξύ κάθε σίτισης. Η πλεονάζουσα τροφή και τα περιττώματα θα πρέπει να απομακρύνονται, κατά περίπτωση, για την αποφυγή συσσώρευσης αποβλήτων. Καθόσον αποκτάται όλο και περισσότερη εμπειρία, η τροφή και τα καθεστώτα σίτισης συνεχώς επαναπροσδιορίζονται για τη βελτίωση της επιβίωσης και τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης. Επομένως, θα πρέπει να γίνεται προσπάθεια ώστε να επιβεβαιώνεται το προτεινόμενο καθεστώς σίτισης από αναγνωρισμένους εμπειρογνώμονες. Η σίτιση θα πρέπει να διακόπτεται 24 ώρες πριν από τη λήξη της δοκιμής. Παραδείγματα κατάλληλων τροφών παρατίθενται στο προσάρτημα 2 (βλ. επίσης το έγγραφο OECD Fish Testing Framework (Πλαίσιο δοκιμών με ψάρια του ΟΟΣΑ)) (39).

Συγκεντρώσεις δοκιμής

30. Η κλιμάκωση των υπό δοκιμή χημικών ουσιών θα πρέπει να πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 4. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις δοκιμής σε τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις. Η καμπύλη που συνδέει την LC_{50} με την περίοδο έκθεσης στις διαθέσιμες μελέτες οξείας τοξικότητας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή του εύρους των συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται πέντε συγκεντρώσεις δοκιμής εάν τα δεδομένα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση του κινδύνου.
31. Δεν χρειάζεται να ελέγχονται συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας μεγαλύτερες από το 10 % της οξείας τιμής LC_{50} για ενήλικα άτομα ή από 10 mg/l, όποια τιμή είναι μικρότερη. Η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι ίση με το 10 % της τιμής LC_{50} στο στάδιο ζωής προνυμφών/νεαρών ατόμων.

Μάρτυρες

32. Εκτός από τις συγκεντρώσεις δοκιμής, θα πρέπει να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα νερού αραίωσης (≥ 4 επαναλήψεις) και, κατά περίπτωση, σε μάρτυρα με διαλύτη (≥ 4 επαναλήψεις). Για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο διαλύτες για τους οποίους είναι γνωστό, κατόπιν ελέγχου, ότι δεν επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά τα τελικά σημεία της δοκιμής.
33. Όταν χρησιμοποιείται διαλύτης, η τελική συγκέντρωσή του δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,1 ml/l (36) και θα πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση σε όλους τους θαλάμους δοκιμής, εκτός από τον θάλαμο με τον μάρτυρα νερού αραίωσης. Εντούτοις, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για την αποφυγή της χρήσης τέτοιων διαλυτών ή για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων του διαλύτη στο ελάχιστο.

Συχνότητα αναλυτικών προσδιορισμών και μετρήσεων

34. Η χημική ανάλυση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την έναρξη της δοκιμής, προκειμένου να ελέγχεται η συμμόρφωση με τα κριτήρια αποδοχής. Όλες οι επαναλήψεις θα πρέπει να αναλύονται ξεχωριστά στην αρχή και κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Θα πρέπει να αναλύεται μία επανάληψη ανά συγκέντρωση δοκιμής τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια της δοκιμής, και να γίνεται συστηματικά αλλαγή μεταξύ των επαναλήψεων (1, 2, 3, 4, 1, 2 κ.λπ.). Εάν τα δείγματα αποθηκεύονται ώστε να αναλυθούν κάποια άλλη στιγμή, η μέθοδος αποθήκευσης των δειγμάτων θα πρέπει να έχει προηγουμένως επικυρωθεί. Τα δείγματα θα πρέπει να υφίστανται φιλτράρισμα (π.χ. με χρήση πόρων μεγέθους 0,45 μm) ή φυγοκέντρωση για να διασφαλίζεται ότι οι προσδιορισμοί αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα.
35. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, θα πρέπει να μετρώνται το διαλυμένο οξυγόνο, το pH, η συνολική σκληρότητα, η αγωγιμότητα, η αλατότητα (κατά περίπτωση) και η θερμοκρασία σε όλους τους θαλάμους δοκιμής. Θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον το διαλυμένο οξυγόνο, η αλατότητα (κατά περίπτωση) και η θερμοκρασία σε εβδομαδιαία βάση, και το pH, η αγωγιμότητα και η σκληρότητα στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Η θερμοκρασία θα πρέπει, κατά προτίμηση, να παρακολουθείται συνεχώς σε έναν τουλάχιστον θάλαμο δοκιμής.
36. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να βασίζονται σε μετρηθείσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, εάν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο διάλυμα έχει διατηρηθεί ικανοποιητικά εντός του ± 20 % της ονομαστικής συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, τα αποτελέσματα μπορούν να βασίζονται στις ονομαστικές ή στις μετρηθείσες τιμές.

Παρατηρήσεις και μετρήσεις*Στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης*

37. Η έκθεση θα πρέπει να ξεκινάει το συντομότερο δυνατόν μετά τη γονιμοποίηση και πριν από την έναρξη διαίρεσης του βλαστοδίσκου, αλλά όχι αργότερα από 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, προκειμένου να διασφαλίζεται έκθεση στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Εκκόλαψη και επιβίωση

38. Η εκκόλαψη και η επιβίωση θα πρέπει να παρατηρούνται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και να καταγράφονται τα αριθμητικά δεδομένα. Τα έμβρυα, οι προνύμφες και τα νεαρά ψάρια που είναι νεκρά θα πρέπει να απομακρύνονται αμέσως μόλις γίνονται αντιληπτά, καθώς μπορεί να αποσυντεθούν ταχέως και να διαλυθούν από τις ενέργειες των άλλων ψαριών. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν απομακρύνονται τα νεκρά στοιχεία ώστε να μην χτυπηθούν ή υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αυγά/προνύμφες καθώς είναι εξαιρετικά λεπτεπίλεπτα και ευαίσθητα. Τα κριτήρια θανάτου είναι διαφορετικά αναλόγως του σταδίου ζωής:

- για τα αυγά: ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, αισθητή μείωση διαφάνειας και αλλαγή χρώματος λόγω πήξης ή/και καταβύθισης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα λευκή θαμπή όψη,
- για τις προνύμφες και τα νεαρά ψάρια: ακινησία ή/και απουσία αναπνευστικής κίνησης ή/και απουσία καρδιακού ρυθμού ή/και λευκό θαμπό χρώμα του κεντρικού νευρικού συστήματος ή/και έλλειψη αντίδρασης σε μηχανικά ερεθίσματα.

Μη φυσιολογική εμφάνιση

39. Ο αριθμός των προνυμφών ή των ψαριών που εμφανίζουν μη φυσιολογικό σχήμα σώματος θα πρέπει να καταγράφεται, ενώ θα πρέπει να περιγράφονται η εμφάνιση και η φύση της ανωμαλίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι φυσιολογικό να εμφανίζονται μη φυσιολογικά έμβρυα και προνύμφες και μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό των μαρτύρων σε ορισμένα είδη. Τα μη φυσιολογικά ζώα θα πρέπει να απομακρύνονται από τους θαλάμους δοκιμής μόνο όταν πεθάνουν. Ωστόσο, σύμφωνα με την Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, εάν οι ανωμαλίες έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση πόνου, ταλαιπωρίας και αγωνίας ή μόνιμης βλάβης, και ο θάνατος μπορεί να προβλεφθεί με αξιοπιστία, τα ζώα θα πρέπει να υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία σύμφωνα με την περιγραφή που δίνεται στην παράγραφο 44 και να συμπεριλαμβάνονται ως θνησιμότητα για την ανάλυση των δεδομένων.

Μη φυσιολογική συμπεριφορά

40. Οι ανωμαλίες, π.χ. υπεραερισμός, μη συγχρονισμένη κολύμβηση, άτυπη αδράνεια και άτυπη συμπεριφορά σίτισης, θα πρέπει να καταγράφονται κατά την εμφάνισή τους.

Βάρος

41. Στο τέλος της δοκιμής, όλα τα επιζώντα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία (αναισθησία σε περίπτωση που πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος) και θα πρέπει να μετράται το υγρό βάρος του κάθε ψαριού (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί).

Μήκος

42. Στο τέλος της δοκιμής, θα πρέπει να μετράται το μήκος κάθε ψαριού (τυπικό μήκος).
43. Οι παρατηρήσεις αυτές θα έχουν ως αποτέλεσμα τη διαθεσιμότητα προς αναφορά κάποιων από τα ακόλουθα δεδομένα ή όλων:
- συνολική θνησιμότητα,
 - αριθμοί υγιών ψαριών στο τέλος της δοκιμής,
 - χρόνος έως την έναρξη και τη λήξη της εκκόλαψης,
 - μήκος και βάρος των επιβιωσάντων ζώων,
 - αριθμοί παραμορφωμένων προνυμφών,
 - αριθμοί ψαριών που εμφανίζουν μη φυσιολογική συμπεριφορά.

Δειγματοληψία των ψαριών

44. Η δειγματοληψία των ψαριών πραγματοποιείται κατά τον τερματισμό της δοκιμής. Τα ψάρια της δειγματοληψίας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία με π.χ. MS-222 (100-500 mg ανά λίτρο ρυθμισμένο με 200 mg NaHCO₃ ανά λίτρο) ή FA-100 (4-αλλυλο-2-μεθοξυφαινόλη; ευγενόλη) και το κάθε ψάρι θα πρέπει να μετράται και να ζυγίζεται ως προς το υγρό βάρος (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) ή να υποβάλλεται σε αναισθησία εάν πρέπει να ληφθεί δείγμα αίματος (βλ. παράγραφο 49).

Δειγματοληψία για ανάλυση της VTG και προσδιορισμό του φύλου μέσω ιστολογικής αξιολόγησης

45. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να λαμβάνονται ως δείγμα και να προετοιμάζονται για ανάλυση του φύλου και της VTG. Όλα τα ψάρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστολογική εξέταση για τον προσδιορισμό του φύλου. Για τις μετρήσεις της VTG, είναι αποδεκτό να λαμβάνεται ένα επιμέρους δείγμα αποτελούμενο από τουλάχιστον 16 ψάρια από κάθε επανάληψη. Θα πρέπει να αναλύονται περισσότερα ψάρια για τη μέτρηση της VTG, εάν τα αποτελέσματα του επιμέρους δείγματος αποδειχθούν ασαφή.
46. Η διαδικασία δειγματοληψίας για ανάλυση της VTG και προσδιορισμό του φύλου εξαρτάται από τη μέθοδο ανάλυσης της VTG:

Μέθοδος ομογενοποιημένου δείγματος κεφαλιού/ουράς για ανάλυση της VTG

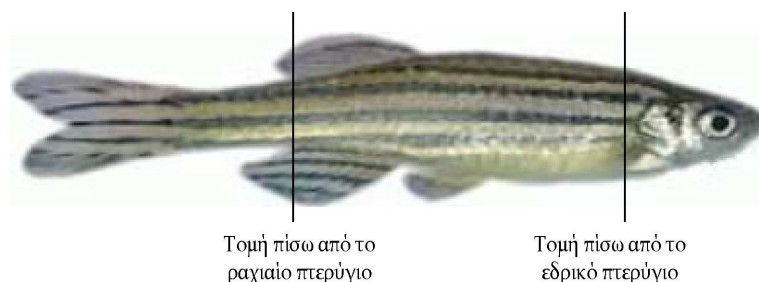
47. Το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία. Το κεφάλι και η ουρά κάθε ψαριού διαχωρίζονται από το σώμα με τομές που πραγματοποιούνται με ένα νυστέρι ακριβώς πίσω από τα θωρακικά πτερύγια και ακριβώς πίσω από το ραχιαίο πτερύγιο (βλ. σχήμα 1). Τα μέρη του κεφαλιού και της ουράς από κάθε ψάρι συνενώνονται, ζυγίζονται και αριθμούνται καθένα χωριστά, στη συνέχεια καταψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους - 70 °C ή χαμηλότερα για την ανάλυση της VTG. Το μέρος σώματος του ψαριού αριθμείται και μονιμοποιείται σε κατάλληλο μονιμοποιητικό υγρό για ιστολογική αξιολόγηση (22). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, εκτιμάται η VTG και η ιστοπαθολογία του κάθε ψαριού και, επομένως, μια πιθανή αλλαγή στο επίπεδο της VTG μπορεί να συνδεθεί με το φαινοτυπικό φύλο ή το γενετικό φύλο (ρυζόψαρο και τριάκανθος γαστερόστεος) των ψαριών. Για περισσότερες πληροφορίες, δείτε την καθοδήγηση για την ομογενοποίηση (προσάρτημα 5) και την καθοδήγηση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της VTG (προσάρτημα 6).

Μέθοδος ομογενοποιημένου δείγματος ήπατος για ανάλυση της VTG

48. Το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία. Το ήπαρ διαχωρίζεται και αποθηκεύεται στους - 70 °C ή χαμηλότερα. Συνιστώμενες διαδικασίες για την εκτομή και την προκατεργασία του ήπατος διατίθενται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ (37) ή στο κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος (38). Στη συνέχεια, γίνεται ομογενοποίηση του κάθε ήπατος ξεχωριστά όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ ή στο Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της VTG με μια ομόλογη τεχνική ELISA (βλ. προσάρτημα 6 για ένα παράδειγμα ποσοτικού προσδιορισμού στο ζεβρόψαρο ή την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 229 του ΟΟΣΑ (37) για το ρυζόψαρο). Με αυτήν την τεχνική, είναι επίσης δυνατή η λήψη δεδομένων για κάθε ψάρι τόσο για τη VTG όσο και για την ιστολογία των γονάδων.

Μέθοδος πλάσματος αίματος για ανάλυση της VTG

49. Λαμβάνεται δείγμα αίματος από αναισθητοποιημένα ψάρια μέσω καρδιακής παρακέντησης ή κοπής της ουραίας φλέβας ή της ουράς, το οποίο φυγοκεντρείται στους 4 °C για τη συλλογή πλάσματος. Το πλάσμα αποθηκεύεται στους - 70 °C ή χαμηλότερα μέχρι τη χρήση του. Ολόκληρο το ψάρι υποβάλλεται σε ευθανασία και μονιμοποιείται για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα του πλάσματος αίματος και το ψάρι αριθμούνται καθένα χωριστά για να συνδεθούν τα επίπεδα της VTG με το φύλο του ψαριού.

Σχήμα 1:**Τρόπος κοπής ενός ψαριού για μέτρηση της VTG από ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς και για ιστολογική αξιολόγηση του μεσαίου τμήματος**

Προσδιορισμός γενετικού φύλου

50. Λαμβάνεται βιολογικό δείγμα για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου από κάθε ψάρι που ανήκει σε είδος το οποίο φέρει τους κατάλληλους δείκτες. Για το ρυζόψαρο, συλλέγεται το εδρικό ή το ραχιαίο πτερύγιο. Στο προσάρτημα 9, παρέχεται μια λεπτομερής περιγραφή που περιλαμβάνει τη δειγματοληψία ιστού και τον προσδιορισμό του φύλου με μέθοδο PCR. Παρομοίως, για τον τριάκανθο γαστερόστεο, παρέχονται στο προσάρτημα 10 μια περιγραφή της δειγματοληψίας ιστού και μια μέθοδος PCR για τον προσδιορισμό του φύλου.

Μέτρηση της VTG

51. Η μέτρηση της VTG θα πρέπει να βασίζεται σε μια ποσοτική μέθοδο που έχει επικυρωθεί αναλυτικά. Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη μεταβλητότητα εντός της ίδιας δοκιμασίας και μεταξύ διαφορετικών δοκιμασιών σε ό,τι αφορά τη μέθοδο που χρησιμοποιείται σε ένα δεδομένο εργαστήριο. Η πρόελευση της μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και εντός του ίδιου εργαστηρίου βασίζεται (πιθανότατα) στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του πληθυσμού των ψαριών. Λαμβανομένης υπόψη της μεταβλητότητας της μέτρησης της VTG, θα πρέπει να γίνεται προσεκτικός χειρισμός των NOEC που βασίζονται μόνο σε αυτό το τελικό σημείο. Υπάρχουν διαθέσιμες διαφορετικές μέθοδοι για την εκτίμηση της παραγωγής VTG στα είδη ψαριών που εξετάζονται σε αυτήν τη δοκιμασία. Μια τεχνική μέτρησης που είναι σχετικά ευαίσθητη και συγκεκριμένη είναι ο καθορισμός των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών μέσω ενζυμικής δοκιμής ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ομόλογα αντισώματα (κατά της VTG του ίδιου είδους), αλλά πιο σημαντικό είναι να χρησιμοποιούνται ομόλογα πρότυπα.

Προσδιορισμός φύλου

52. Ανάλογα με τη διαδικασία δειγματοληψίας για τη μέτρηση της VTG, ολόκληρο το ψάρι ή το μεσαίο τμήμα κάθε ψαριού που απομένει τοποθετείται σε μια προ-σημασμένη κασέτα κατεργασίας και μονιμοποιείται με ένα κατάλληλο μονιμοποιητικό υγρό για τον ιστολογικό καθορισμό του φύλου (προαιρετικά επίσης για την αξιολόγηση του σταδίου ανάπτυξης των γονάδων). Καθοδήγηση σχετικά με τη μονιμοποίηση και τη σκλήνωση παρέχεται στο προσάρτημα 7, καθώς και στο έγγραφο OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (Έγγραφο κατευθυντήριας γραμμής ΟΟΣΑ σχετικά με τη διάγνωση ιστοπαθολογικών ευρημάτων που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα στις γονάδες ψαριών) (22). Μετά την κατεργασία, τα ψάρια εγκλείονται σε μπλοκ παραφίνης. Τα ψάρια θα πρέπει να τοποθετούνται κατά μήκος στο μπλοκ παραφίνης. Από κάθε ψάρι λαμβάνονται τουλάχιστον έξι κατά μήκος τομές (πάχους 3-5 μm) σε εμπρόσθιο επίπεδο, συμπεριλαμβανομένου ιστού των γονάδων και από τις δύο γονάδες. Το διάστημα μεταξύ των εν λόγω τομών θα πρέπει να είναι περίπου 50 μm για τα αρσενικά και 250 μm για τα θηλυκά. Ωστόσο, επειδή κάθε μπλοκ συχνά περιέχει τομές από αρσενικά και θηλυκά άτομα (εάν γίνεται σκλήνωση περισσότερων του ενός ψαριού σε κάθε μπλοκ), το διάστημα μεταξύ των τομών σε αυτά τα μπλοκ θα πρέπει να είναι περίπου 50 μm μέχρι να ληφθούν τουλάχιστον έξι τομές των γονάδων από κάθε αρσενικό άτομο. Στη συνέχεια, το διάστημα μεταξύ των τομών μπορεί να αυξηθεί σε περίπου 250 μm για τα θηλυκά άτομα. Οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάζονται σε οπτικό μικροσκόπιο εστιάζοντας στο φύλο (αρσενικό, θηλυκό, διεμφυλικό ή αδιαφοροποίητο). Η διεμφυλικότητα ορίζεται ως παρουσία περισσότερων του ενός ωοκυττάρων στον όρχη ανά έξι τομές που αναλύονται ή παρουσία σπερματογόνων κυττάρων (ναι/όχι) στις ωοθήκες. Η ιστοπαθολογική εξέταση και ο προσδιορισμός σταδίου των ωοθηκών και των όρχεων είναι προαιρετικές διαδικασίες, αλλά εάν διερευνηθούν, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναλυθούν στατιστικά και να γίνει αναφορά τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά είδη ψαριών δεν διαθέτουν εκ φύσεως πλήρως αναπτυγμένο ζεύγος γονάδων και ενδεχομένως να υπάρχει μόνο μία γονάδα (π.χ. στο ρυζόψαρο και περιστασιακά στο ζεβρόψαρο). Όλες οι εν λόγω παρατηρήσεις θα πρέπει να καταγράφονται.
53. Ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου σε κάθε ρυζόψαρο βασίζεται στην παρουσία ή απουσία του γονιδίου καθορισμού του αρσενικού φύλου, DMY, που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα στο ρυζόψαρο. Ο προσδιορισμός του γονοτυπικού φύλου στο ρυζόψαρο μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου DMY από DNA που εκχυλίζεται π.χ. από ένα τμήμα του εδρικού ή του ραχιαίου πτερυγίου. Η παρουσία του DMY υποδεικνύει άτομο XY (αρσενικό) ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ η απουσία του DMY υποδεικνύει άτομο XX (θηλυκό) ανεξάρτητα από τον φαινότυπο (23). Καθοδήγηση για την προετοιμασία του ιστού και τη μέθοδο PCR παρέχεται στο προσάρτημα 9. Ο προσδιορισμός του γενετικού φύλου σε κάθε τριάκανθο γαστερόστεο πραγματοποιείται επίσης με μια μέθοδο PCR, που περιγράφεται στο προσάρτημα 10.
54. Η εμφάνιση διεμφυλικών ατόμων (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) θα πρέπει να αναφέρεται.

Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

55. Τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου ελέγχονται από το ενδοκρινικό σύστημα σε είδη όπως το ρυζόψαρο. Επομένως, θα πρέπει να γίνονται παρατηρήσεις της φυσικής εμφάνισης των ψαριών, εάν είναι δυνατόν, στο τέλος της έκθεσης. Στο ρυζόψαρο, ο σχηματισμός της θηλής στο οπίσθιο τμήμα του εδρικού πτερυγίου στα θηλυκά άτομα είναι ευαίσθητος στα ανδρογόνα. Στο κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος (38) παρέχονται σχετικές φωτογραφίες των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου για τα αρσενικά άτομα, καθώς και για τα θηλυκά άτομα στα οποία έχουν χορηγηθεί ανδρογόνα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

56. Είναι σημαντικό ο καθορισμός του τελικού σημείου να πραγματοποιείται με βάση την ισχυρότερη έγκυρη στατιστική δοκιμασία. Η επανάληψη αποτελεί την πειραματική μονάδα, αλλά η μεταβλητότητα εντός των επαναλήψεων θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις στατιστικές δοκιμασίες. Στο προσάρτημα 8 διατίθεται ένα διάγραμμα απόφασης που βοηθά στην επιλογή της καταλληλότερης στατιστικής δοκιμασίας που πρέπει να χρησιμοποιείται με βάση τα χαρακτηριστικά των δεδομένων που λαμβάνονται από τη δοκιμή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας είναι 0,05 για όλα τα τελικά σημεία που συμπεριλαμβάνονται.

Ποσοστά των φύλων και γενετικό φύλο

57. Τα ποσοστά των φύλων θα πρέπει να αναλύονται για να διαπιστώνονται σημαντικές επιδράσεις (προσέγγιση NOEC/LOEC) της έκθεσης μέσω της δοκιμασίας Jonckheere-Terpstra (δοκιμασία τάσεων) εάν υπάρχει μονοτονική σχέση δόσης-απόκρισης. Εάν διαπιστωθεί μη μονοτονικότητα, θα πρέπει να εφαρμόζεται δοκιμή που βασίζεται σε ζεύγη. Εάν είναι δυνατή η επίτευξη κανονικότητας και ομοιογενούς διασποράς, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Dunnett. Εάν υπάρχει ομοιογενής διασπορά, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Tamhane-Dunnnett. Διαφορετικά, χρησιμοποιείται η δοκιμασία Mann-Whitney με διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Στο προσάρτημα 8 περιλαμβάνεται ένα διάγραμμα ροής που περιγράφει τα στατιστικά στοιχεία των ποσοστών των φύλων. Τα ποσοστά των φύλων θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως ποσοστά συγκέντρωσης \pm τυπική απόκλιση (SD) για τα αρσενικά, τα θηλυκά, τα διεμφυλικά και τα αδιαφοροποίητα άτομα. Θα πρέπει να επισημαίνεται η στατιστική σημαντικότητα. Παραδείγματα παρουσιάζονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42). Το γενετικό φύλο θα πρέπει να αναφέρεται ως ποσοστό αναστροφής του φαινοτυπικού φύλου των αρσενικών, θηλυκών, διεμφυλικών και αδιαφοροποιητών ατόμων.

Συγκentrώσεις της VTG

58. Οι συγκentrώσεις της VTG θα πρέπει να αναλύονται για να διαπιστώνονται σημαντικές επιδράσεις (προσέγγιση NOEC/LOEC) της έκθεσης. Η δοκιμασία Dunnett προτιμάται σε σχέση με τη δοκιμασία t με διόρθωση κατά Bonferroni. Όταν χρησιμοποιείται διόρθωση κατά Bonferroni, προτιμάται η διόρθωση κατά Bonferroni-Holm. Θα πρέπει να επιτρέπεται ένα περιθώριο για λογαριθμικό μετασχηματισμό της VTG για την επίτευξη κανονικότητας και ομοιογένειας της διασποράς. Επίσης, εάν η σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης συνάδει με μονοτονικότητα, προτιμάται η δοκιμασία Jonckheere-Terpstra από όλες τις παραπάνω δοκιμασίες. Εάν χρησιμοποιούνται δοκιμασίες t ή δοκιμασία Dunnett, δεν χρειάζεται να εφαρμοστεί έλεγχος F της ANOVA για συνέχιση. Για λεπτομέρειες, βλ. το διάγραμμα ροής στο προσάρτημα 8. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως μέσες τιμές συγκέντρωσης \pm SD για τα αρσενικά, τα θηλυκά, τα διεμφυλικά και τα αδιαφοροποίητα άτομα ξεχωριστά. Θα πρέπει να επισημαίνεται η στατιστική σημαντικότητα για τα φαινοτυπικά θηλυκά και φαινοτυπικά αρσενικά άτομα. Παραδείγματα παρουσιάζονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42).

Πραγματικές συγκentrώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας

59. Οι πραγματικές συγκentrώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στον θάλαμο δοκιμής θα πρέπει να αναλύονται με τις συχνότερες που περιγράφονται στην παράγραφο 34. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται σε πίνακες ως μέση συγκέντρωση \pm SD των επαναλήψεων, καθώς και των συγκentrώσεων, περιλαμβάνοντας επισημασμένες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των δειγμάτων και τις έκτοπες τιμές σε σχέση με τη μέση συγκέντρωση της αγωγής \pm 20 %. Παραδείγματα περιλαμβάνονται στην έκθεση επικύρωσης φάσης 2 της δοκιμής FSDT (42).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

60. Τα αποτελέσματα της δοκιμής θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκentrώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στα διαλύματα δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου.

Έκθεση δοκιμής

61. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή χημική ουσία

- Σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στοιχεία ταυτοποίησης της χημικής ουσίας, δεδομένα συμπεριλαμβανομένης της καθαρότητας και της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής

- Χρησιμοποιηθείσα διαδικασία δοκιμής (π.χ. συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική/ανανέωσης), σχεδιασμός δοκιμής συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων δοκιμής, της μεθόδου παρασκευής των διαλυμάτων παρακαταθήκης (σε ένα παράρτημα), της συχνότητας ανανέωσης (θα πρέπει να αναφέρεται το μέσο διαλυτοποίησης και η συγκέντρωσή του, όταν χρησιμοποιείται),
- Ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής, μέσες τιμές των μετρηθεισών τιμών με τις τυπικές αποκλίσεις τους στους θαλάμους δοκιμής, μέθοδος με την οποία επιτεύχθηκαν (η χρησιμοποιηθείσα αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να παρουσιάζεται σε ένα παράρτημα), καθώς και ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μετρήσεις αναφέρονται στις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε αληθές διάλυμα,
- Ποιότητα νερού στους θαλάμους δοκιμής: pH, σκληρότητα, θερμοκρασία και συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σίτιση (π.χ. είδος τροφής, πηγή, ποσότητα και συχνότητα χορήγησης) καθώς και αναλύσεις για ανίχνευση προσμειξέων (π.χ. PCB, PAH και οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα), κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα

- Ενδείξεις που αποδεικνύουν ότι οι μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια επικύρωσης: τα δεδομένα σχετικά με τον ρυθμό εκκόλαψης θα πρέπει να παρουσιάζονται σε πίνακες ως ποσοστά ανά επανάληψη και ανά συγκέντρωση. Οι έκτοπες τιμές σε σχέση με τα κριτήρια αποδοχής (στους μάρτυρες) θα πρέπει να επισημαίνονται. Η επιβίωση θα πρέπει να παρουσιάζεται ως ποσοστό ανά επανάληψη και ανά συγκέντρωση. Οι έκτοπες τιμές σε σχέση με τα κριτήρια επικύρωσης (στους μάρτυρες) θα πρέπει να επισημαίνονται,
 - Σαφής παράθεση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν για τα διάφορα τελικά σημεία που παρατηρήθηκαν: επιβίωση εμβρύων και επιτυχία εκκόλαψης, εξωτερικές ανωμαλίες, μήκος και βάρος, μετρήσεις της VTG (ng/g ομογενοποιημένου δείγματος, ng/ml πλάσματος ή ng/mg ήπατος), ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου, δεδομένα γενετικού φύλου, στοιχεία για οποιαδήποτε ασυνήθη αντίδραση των ψαριών και κάθε ορατή επίδραση που προκλήθηκε από την υπό δοκιμή χημική ουσία.
62. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (SD) ή τυπικό σφάλμα (SE). Στα στατιστικά στοιχεία θα πρέπει να αναφέρονται τουλάχιστον οι NOEC και LOEC και τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Θα πρέπει να ακολουθείται το στατιστικό διάγραμμα ροής (προσάρτημα 8).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline Ap. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen και J.P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, σελ. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. και S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, σελ. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix και 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, σελ. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen και 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, σελ. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard και B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, σελ. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren και G.I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, σελ. 397-411.

- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla και C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, σελ. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear και 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, σελ. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc και 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, σελ. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr και 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, σελ. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara και 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, σελ. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James και 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, σελ. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita και T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", *Journal of Health Science* 50, σελ. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson και A. Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*", 78, σελ. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. και G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, σελ. 101-105.
- (17) Holbeck, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. και 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*, σελ. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher και A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, σελ. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani και 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, σελ. 237-243.
- (20) Scholz, S. και N. Kluver (2009), "Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3", σελ. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers και H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, σελ. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment Ap. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata και Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", *Developmental Dynamics* 231, σελ. 518-526.

- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi και M. Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", *Zoological Science* 21, σελ. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak και 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, σελ. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron και K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, σελ. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno και 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, σελ. 279-290.
- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren και P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, σελ. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard και P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: 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, σελ. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech και P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, σελ. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch και C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, σελ. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley και 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, σελ. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen και P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, σελ. 165-170.
- (34) Κεφάλαιο Γ.14 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή ανάπτυξης νεαρών ψαριών.
- (35) Κεφάλαιο Γ.4 του παρόντος παραρτήματος, Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment Ap. 23, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline Ap. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (38) Κεφάλαιο Γ.37 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμασία ψαριών 21 ημερών: Βραχυχρόνια διαλογή για οιστρογονική και ανδρογονική δραστηριότητα, και αναστολή αρωματάσης.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment Ap. 171, ΟΟΣΑ, Παρίσι
- (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-Μέρος Α*, 70, 9-10 σελ. 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Ap. 141, ENV/JM/MONO(2011)22, ΟΟΣΑ, Παρίσι.

-
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Ap. 142, ENV/JM/MONO(2011)23, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Ap. 143, ENV/JM/MONO(2011)24, ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (44) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σελ. 33.
-

Προσάρτημα 1

Συντμήσεις και ορισμοί

Αδιαφοροποίητο ψάρι: Ψάρι με γονάδες που δεν παρουσιάζουν κανένα ορατό γεννητικό κύτταρο

Άξονας ΥΥΓ: Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων

Βάρος ψαριού: Υγρό βάρος ψαριού (στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί)

Βιοδείκτης: Δείκτης που έχει επίδραση σε ατομικό επίπεδο

Διευθυλωμένο ψάρι: Ψάρι με περισσότερα του ενός ωοκύτταρα στον όρχι ανά 6 τομές που αναλύονται ή με σπερματογόνα κύτταρα στις ωοθήκες (ναι/όχι)

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών

Κορυφαίο τελικό σημείο: Που έχει επίδραση σε επίπεδο πληθυσμού

Ρυθμός πλήρωσης: Υγρό βάρος ψαριών κατ' όγκο νερού

ΤΔ: Τρόπος δράσης

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα

ASV: Air saturation value (τιμή κορεσμού με αέρα)

DMY: Γονίδιο της περιοχής DM του Y χρωμοσώματος που απαιτείται για την ανάπτυξη του αρσενικού στο ρυζόψαρο

Dph: Days post hatch (ημέρες μετά την εκκόλαψη)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης)

FSDT: Fish Sexual Development Test (δοκιμή σεξουαλικής ανάπτυξης ψαριών)

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain-Reaction (αντίστροφη μεταγραφάση-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

VTG: Vitellogenin (λεκτιθογενίνη)

Προσάρτημα 2

Πειραματικές συνθήκες για τη δοκιμή FSDT (είδη γλυκών Νέρων)

| | | | |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Συνιστώμενα είδη | Ρυζόψαρο (<i>Oryzias latipes</i>) | Ζεβρόψαρο (<i>Danio rerio</i>) | Τριάκανθος γαστερόστεος (<i>Gasterosteus aculeatus</i>) |
| 2. Τύπος δοκιμής | Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική | Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική | Συνεχούς ροής νερού ή ημιστατική |
| 3. Θερμοκρασία νερού | 25 ± 2 °C | 27 ± 2 °C | 20 ± 2 °C |
| 4. Ποιότητα φωτισμού | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) | Λαμπτήρες φθορισμού (ευρέως φάσματος) |
| 5. Ένταση φωτός | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) | 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 080 lux ή 50-100 ft-c (επίπεδα στο περιβάλλον του εργαστηρίου) |
| 6. Φωτοπερίοδος | 12-16 ώρες φως, 8-12 ώρες σκοτάδι | 12-16 ώρες φως, 8-12 ώρες σκοτάδι | 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι |
| 7. Ελάχιστο μέγεθος θαλάμου | Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l | Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l | Κάθε θάλαμος θα πρέπει να περιέχει όγκο νερού τουλάχιστον 7 l |
| 8. Ανανεώσεις όγκου διαλυμάτων δοκιμής | Τουλάχιστον 5 ημερησίως | Τουλάχιστον 5 ημερησίως | Τουλάχιστον 5 ημερησίως |
| 9. Ηλικία οργανισμών δοκιμής κατά την έναρξη της έκθεσης | Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά (πρώιμο βλαστικό στάδιο) | Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά (πρώιμο βλαστικό στάδιο) | Προσφάτως γονιμοποιημένα αυγά |
| 10. Αρ. αυγών ανά αγωγή | Τουλάχιστον 120 | Τουλάχιστον 120 | Τουλάχιστον 120 |
| 11. Αρ. αγωγών | Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) | Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) | Τουλάχιστον 3 (συν κατάλληλοι μάρτυρες) |
| 12. Αρ. επαναλήψεων ανά αγωγή | Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες) | Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες) | Τουλάχιστον 4 (εκτός εάν εφαρμόζεται κατανομή τετραγωνικής ρίζας προς τους μάρτυρες) |
| 13. Καθεστώς σίτισης | Ζωντανά <i>Artemia</i> , κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα | Ειδική τροφή ιχθυδίων, ζωντανά <i>Artemia</i> , κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα | Ζωντανά <i>Artemia</i> , κατεψυγμένες ενήλικες γαρίδες σε άλμη, τροφή σε νιφάδες κ.λπ. Συνιστάται να παρέχεται σίτιση δύο φορές την ημέρα |

| | | | |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14. Αερισμός | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 60 % της τιμής κορεσμού με αέρα | Καθόλου, εκτός εάν η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) μειωθεί κάτω από το 70 % της τιμής κορεσμού με αέρα |
| 15. Νερό αραίωσης | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό | Καθαρό νερό από επιφανειακά ύδατα, νερό γεώτρησης ή ανασυσταθέν νερό |
| 16. Διάρκεια έκθεσης στην υπό δοκιμή χημική ουσία | 60 dph | 60 dph | 60 dph |
| 17. Βιολογικά τελικά σημεία | Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, γενετικό φύλο αναλογία φύλου | Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου | Επιτυχία εκκόλαψης, επιβίωση, μακροσκοπική μορφολογία, VTG, ιστολογία των γονάδων, αναλογία φύλου |
| 18. Κριτήρια αποδοχής της δοκιμής για συνενωμένες επαναλήψεις μαρτύρων | Επιτυχία εκκόλαψης > 80 % | Επιτυχία εκκόλαψης > 80 % | Επιτυχία εκκόλαψης > 80 % |
| | Επιβίωση μετά την εκκόλαψη \geq 70 % | Επιβίωση μετά την εκκόλαψη \geq 70 % | Επιβίωση μετά την εκκόλαψη \geq 70 % |
| | Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 150 mg | Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 75 mg | Ανάπτυξη (υγρό βάρος ψαριού, στεγνωμένο με απορροφητικό χαρτί) > 120 mg |
| | Μήκος (τυπικό μήκος) > 20 mm | Μήκος (τυπικό μήκος) > 14 mm | Μήκος (τυπικό μήκος) > 20 mm |
| | Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 % | Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 % | Αναλογία φύλου (% αρσενικών ή θηλυκών) 30 %-70 % |

Προσάρτημα 3

Χημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| Σωματίδια | < 20 mg/l |
| Ολικός οργανικός άνθρακας | < 2 mg/l |
| Μη ιονισμένη αμμωνία | < 1 µg/l |
| Υπολείμματα χλωρίου | < 10 µg/l |
| Ολικά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα | < 50 ng/l |
| Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια | < 50 ng/l |
| Ολικό οργανικό χλώριο | < 25 ng/l |

Προσάρτημα 4

Από τη μέθοδο δοκιμών Γ.14/καθοδήγηση για τις συγκεντρώσεις δοκιμής

| Στήλη (αριθμός συγκεντρώσεων μεταξύ 100 και 10 ή μεταξύ 10 και 1) (*) | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

(*) Από μια στήλη μπορεί να επιλεγεί μια σειρά τριών (ή περισσότερων) διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ενδιάμεσα σημεία μεταξύ συγκεντρώσεων στη στήλη (χ) βρίσκονται στη στήλη $(2χ + 1)$. Οι καταγεγραμμένες τιμές μπορεί να αντιπροσωπεύουν συγκεντρώσεις εκφραζόμενες ως % κατ' όγκο ή κατά βάρος (mg/l ή µg/l). Οι τιμές μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να διαιρεθούν με οποιαδήποτε δύναμη του 10, αναλόγως. Η στήλη 1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αν υφίσταται σημαντική αβεβαιότητα ως προς τα επίπεδα τοξικότητας.

Προσάρτημα 5

Καθοδήγησή για την ομογενοποίηση του κεφαλιού και της ουράς από νεαρό πετρόψαρο, λιποκεφαλο όξινο, τρικαντό ξαστερώστε και ρυζόχαρτο

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών που συντελούνται πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της VTG. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα συγκρίσιμο ποσοτικό προσδιορισμό της VTG. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της VTG από το πλάσμα αίματος ή το ήπαρ αντί του προσδιορισμού από ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού/ουράς είναι θέμα επιλογής.

Διαδικασία

1. Τα ψάρια υποβάλλονται σε αναισθησία και ευθανασία, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής.
2. Το κεφάλι και η ουρά κόβονται, σύμφωνα με την περιγραφή της δοκιμής. **Σημαντική παρατήρηση:** Όλα τα εργαλεία ανατομής και η πλάκα κοπής θα πρέπει να εκπλένονται και να καθαρίζονται κατάλληλα (π.χ. με 96 % αιθανόλη) ανάμεσα στους χειρισμούς του κάθε ψαριού για την αποφυγή “επιμόλυνσης VTG” από τα θηλυκά άτομα ή τα αρσενικά άτομα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG προς τα αρσενικά άτομα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί τεχνητή πρόκληση παραγωγής VTG.
3. Το βάρος του συνενωμένου κεφαλιού και της ουράς από το κάθε ψάρι μετράται με ακρίβεια χιλιοστόγραμμου.
4. Αφού ζυγιστούν, τα τμήματα του ψαριού τοποθετούνται σε κατάλληλους σωλήνες (π.χ. σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml) και καταψύχονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να ομογενοποιηθούν ή ομογενοποιούνται απευθείας σε πάγο με δύο πλαστικούς υπέρους. (Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι, εάν εκτελούνται σε πάγο και το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ομοιογενούς μάζας). **Σημαντική παρατήρηση:** Οι σωλήνες θα πρέπει να αριθμούνται κατάλληλα, ώστε το κεφάλι και η ουρά από το ψάρι να μπορούν να σχετιστούν με το αντίστοιχο τμήμα του σώματος που χρησιμοποιείται για την ιστολογική εξέταση των γονάδων.
5. Όταν επιτευχθεί μια ομοιογενής μάζα, προστίθεται παγωμένο **ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (*)** σε ποσότητα ίση με 4-10 φορές το βάρος του ιστού (σημειώνεται η αραίωση). Συνεχίστε τη διαδικασία με τους υπέρους μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. **Σημαντική σημείωση:** Για κάθε ψάρι χρησιμοποιούνται καινούριοι υπέροι.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι τη φυγοκέντρωσή τους σε $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και 50 000 g για 30 λεπτά.
7. Με τη χρήση ενός σιφωνίου μεταφέρονται 20 έως 50 μl (σημειώνεται η ποσότητα) υπερκείμενου υγρού σε **τουλάχιστον δύο** σωλήνες, με βύθιση της μύτης του σιφωνίου κάτω από το στρώμα λίπους στην επιφάνεια και με προσεκτική αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού χωρίς κλάσματα λίπους ή ιζήματος.
8. Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση.

(*) Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης:

50 mM Tris-HCl pH 7,4, μείγμα αναστολέων πρωτεάσης 1 % (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl μείγματος αναστολέων πρωτεάσης (ή ισοδύναμων μειγμάτων αναστολέων πρωτεάσης).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Μείγμα αναστολέων πρωτεάσης: Από τη Sigma (για ιστό θηλαστικών) Κωδικός προϊόντος **P 8340**.

Σημείωση: Το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ημέρα παρασκευής του. Κατά τη διάρκεια της χρήσης να τοποθετείται πάνω σε πάγο

Προσάρτημα 6

Καθοδήγησή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λεκθογενίνης από το ομογενοποιημένο δείγμα κεφαλιού και ουράς στο πετρόψαρο (*danio rerio*) (τροποποίηση των *holbech κ.α., 2001*). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες όπου γίνεται χρήση ομολόγων αντισωμάτων και προτύπων διαλυμάτων

1. Πλάκες μικροτιτλοδότησης (πιστοποιημένες Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark) προεπιστρωμένες με 5 µg/ml αντι-IgG λιποβιτελλίνης ζεβρόψαρου αποψύχονται και εκπλένονται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*).
2. Κεκαθαρμένο πρότυπο διάλυμα λεκθογενίνης ζεβρόψαρου (1) αραιώνεται διαδοχικά σε 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 και 20 ng/ml με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (**), και τα δείγματα αραιώνονται κατά 200 φορές τουλάχιστον (για την αποφυγή επίδρασης της μήτρας) σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και τοποθετούνται στις πλάκες. Εφαρμόζεται μάρτυρας της δοκιμασίας εις διπλούν. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 µl. Τα πρότυπα διαλύματα εφαρμόζονται εις διπλούν και τα δείγματα εις τριπλούν. Ακολουθεί επώαση όλη τη νύχτα στους 4 °C επάνω σε τάρακτρο.
3. Οι πλάκες εκπλένονται 5 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*).
4. Υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP), συνδεδεμένη σε πολυμερές δεξτράνης (π.χ. AMDEX A/S, Δανία) και συζευγμένα αντισώματα αραιώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Η πραγματική αραιώση διαφέρει ανάλογα με την παρτίδα και την ηλικία. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 µl και οι πλάκες επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου επάνω σε τάρακτρο.
5. Οι πλάκες εκπλένονται 5 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (*) και ο πυθμένας των πλακών καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη.
6. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 150 µl TMB plus (**). Σκεπάστε την πλάκα με φύλλο κασιτέρου για προστασία από το φως και παρακολουθήστε την ανάπτυξη του χρώματος στο τάρακτρο.
7. Όταν αναπτυχθεί πλήρως η πρότυπη καμπύλη, η ενζυμική δράση διακόπτεται με την προσθήκη 150 µl H₂SO₄ 0,2 M σε κάθε βοθρίο.
8. Η απορρόφηση μετρείται στα 450 nm (π.χ. σε συσκευή ανάγνωσης πλακών Molecular Devices Thermomax). Τα δεδομένα αναλύονται με χρήση του σχετικού λογισμικού (π.χ. Softmax).

(*) Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης:

| | |
|----------------------------------|----------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης PBS (****) | 500,0 ml |
| BSA | 5,0 g |
| Tween 20 | 5,0 ml |

Ρυθμίστε το pH στο 7,3 και συμπληρώστε με H₂O millipore μέχρι τα 5 l. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

(**) Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης:

| | |
|----------------------------------|----------|
| Διάλυμα παρακαταθήκης PBS (****) | 100,0 ml |
| BSA | 3,0 g |
| Tween 20 | 1,0 ml |

Ρυθμίστε το pH στο 7,3 και συμπληρώστε με H₂O millipore μέχρι τα 5 l. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

(1) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), κεκαθαρμένο σύμφωνα με τους: 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.

(***) Το TMB plus είναι ένα υπόστρωμα “έτοιμο προς χρήση” που παράγεται από την KemEnTec (Δανία). Είναι ευαίσθητο στο φως. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

(****) Διάλυμα παρακαταθήκης PBS

| | |
|-----------------------------------------------------|---------|
| 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 |

Ρυθμίστε το pH στο 6,8 και συμπληρώστε με H₂O millilivre μέχρι τα 2 l. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσάρτημα 7

Καθοδήγησή για την προετοιμασία των τομών των ιστών για τον προσδιορισμό του φύλου και του Σταδίου ανάπτυξης των γονάδων

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών που συντελούνται πριν από την αξιολόγηση των ιστολογικών τομών. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα ανάλογο προσδιορισμό του φύλου και του σταδίου ανάπτυξης των γονάδων.

Με λίγες εξαιρέσεις, οι διαδικασίες αυτές είναι παρόμοιες για το ρυζόψαρο (JMD) και το ζεβρόψαρο (ZF).

Ευθανασία, νεκροψία και μονιμοποίηση ιστών**Στόχοι:**

1. Τα ψάρια πρέπει να θανατώνονται με τρόπο ανώδυνο.
2. Λήψη των απαραίτητων μετρήσεων σωματικού βάρους και των λοιπών μετρήσεων.
3. Αξιολόγηση των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου.
4. Διατομή ιστών για ανάλυση της VTG.
5. Μονιμοποίηση των γονάδων.

Διαδικασίες:

1. Τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται αμέσως πριν από τη νεκροψία. Συνεπώς, εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα πολλά εξειδικευμένα άτομα για τις ανατομές, δεν θα πρέπει να θανατώνονται πολλά ψάρια ταυτόχρονα.
2. Με τη χρήση μιας μικρής απόχης, απομακρύνεται ένα ψάρι από τον πειραματικό θάλαμο και μεταφέρεται μέσα σε ένα δοχείο μεταφοράς στον χώρο όπου διεξάγονται οι νεκροψίες.
3. Το ψάρι τοποθετείται μέσα στο διάλυμα ευθανασίας. Το ψάρι απομακρύνεται από το διάλυμα όταν έχει σταματήσει να αναπνέει και δεν ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα.
4. Ζυγίζεται το υγρό βάρος του ψαριού.
5. Για την προετοιμασία των ιστών προς ανάλυση VTG, το ψάρι μπορεί να τοποθετείται σε μια πλάκα φελλού επάνω στην τράπεζα ενός στερεοσκοπικού μικροσκοπίου.
 - α. Για το ζεβρόψαρο, το κεφάλι κόβεται ακριβώς πίσω από το θωρακικό περύγιο και η ουρά κόβεται ακριβώς πίσω από το ραχιαίο περύγιο.
 - β. Στο ρυζόψαρο, για τη διατομή της κοιλιάς εκτελείται προσεκτικά μια τομή που εκτείνεται κατά μήκος της κοιλιακής μέσης γραμμής ξεκινώντας από το θωρακικό τόξο μέχρι το πρόσθιο σημείο του πρωκτού. Με τη χρήση μιας μικρής λαβίδας και ενός μικρού ψαλιδιού, το ήπαρ αφαιρείται προσεκτικά.
6. Τα δείγματα για ανάλυση VTG τοποθετούνται σε σωλήνες Eppendorf και καταψύχονται αμέσως σε υγρό άζωτο.
7. Το νεκρό σώμα μαζί με τις γονάδες τοποθετείται σε προεπισημασμένη πλαστική κασέτα ιστών, η οποία μεταφέρεται σε μονιμοποιητικό υγρό του Davidson ή του Bouin. Ο όγκος του μονιμοποιητικού υγρού θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος από τον κατά προσέγγιση όγκο των ιστών. Ο περιέκτης με το μονιμοποιητικό υγρό ανακινείται απαλά για πέντε δευτερόλεπτα για να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα από την κασέτα.
8.
 - α. Όλοι οι ιστοί μένουν στο μονιμοποιητικό υγρό του Davidson όλη τη νύχτα και την επόμενη ημέρα μεταφέρονται σε ξεχωριστούς περιέκτες που περιέχουν ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεύδης (φορμόλη) 10 %. Οι περιέκτες με τις κασέτες ανακινούνται απαλά για 5 δευτερόλεπτα για να διασφαλιστεί η επαρκής διείσδυση της φορμαλδεύδης εντός των κασετών.
 - β. Οι ιστοί μένουν στο μονιμοποιητικό υγρό του Bouin για 24 ώρες και, στη συνέχεια, μεταφέρονται σε αιθανόλη 70 %.

Επεξεργασία ιστών

Στόχοι:

1. Αφυδάτωση των ιστών για επαρκή διείσδυση της παραφίνης.
2. Εμποτισμός των ιστών με παραφίνη για τη διατήρηση της ακεραιότητάς τους και τη δημιουργία μιας σκληρής επιφάνειας για πραγματοποίηση μικροτομών.

Διαδικασίες:

3. Οι επισημασμένες κασέτες ιστών αφαιρούνται από τη φορμαλδεΰδη/αιθανόλη και τοποθετούνται σε καλάθια επεξεργασίας. Το καλάθι επεξεργασίας τοποθετείται στον σταθμό επεξεργασίας ιστών.
4. Επιλέγεται το πρόγραμμα επεξεργασίας.
5. Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου επεξεργασίας στον σταθμό επεξεργασίας ιστών, τα καλάθια μπορούν να μεταφερθούν στον σταθμό σκλήνωσης.

Σκλήνωση ιστών

Στόχος:

Τοποθέτηση του δείγματος με τον σωστό προσανατολισμό σε στερεοποιημένη παραφίνη για τη δημιουργία μικροτομών.

Διαδικασίες:

1. Τα καλάθια με τις κασέτες αφαιρούνται από τον σταθμό επεξεργασίας και βυθίζονται στον πρόσθιο θάλαμο της θερμικής μονάδας του σταθμού σκλήνωσης, ο οποίος είναι γεμάτος με παραφίνη, ή μεταφέρονται σε ξεχωριστό σύστημα θέρμανσης παραφίνης.
2. Η πρώτη κασέτα που θα υποβληθεί σε σκλήνωση αφαιρείται από τον πρόσθιο θάλαμο της θερμικής μονάδας ή από το σύστημα θέρμανσης παραφίνης. Το καπάκι της κασέτας αφαιρείται και απορρίπτεται, και ελέγχεται η ετικέτα της κασέτας ως προς τα στοιχεία του ζώου για να επιλυθούν τυχόν ασυμφωνίες πριν από τη σκλήνωση.
3. Επιλέγεται καλούπι σκλήνωσης κατάλληλου μεγέθους.
4. Το καλούπι τοποθετείται κάτω από το στόμιο του διανεμητή και γεμίζεται με λιωμένη παραφίνη.
5. Το δείγμα αφαιρείται από την κασέτα και τοποθετείται μέσα στη λιωμένη παραφίνη του καλουπιού. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με 4 έως 8 δείγματα για κάθε καλούπι παραφίνης. Η θέση του κάθε ψαριού επισημαίνεται με την τοποθέτηση του ψαριού αρ.1 κατά 180 μοίρες προς το ψάρι 2-4/8.
6. Προστίθεται επιπλέον παραφίνη για να καλυφθεί το δείγμα.
7. Το καλούπι με τη βάση κασέτας τοποθετείται στην ψυχόμενη πλάκα της μονάδας ψύξης.
8. Μετά τη στερεοποίηση της παραφίνης, το μπλοκ (δηλ. η σκληρή παραφίνη που περιέχει τους ιστούς και τη βάση κασέτας) αφαιρείται από το καλούπι.

Πραγματοποίηση μικροτομών

Στόχος:

Κοπή και στερέωση ιστολογικών τομών για χρώση.

Διαδικασίες:

1. Η αρχική φάση για τη δημιουργία μικροτομών που καλείται “διαμόρφωση δείγματος” διεξάγεται ως εξής:
 - α. Το μπλοκ παραφίνης τοποθετείται στον σφικτήρα του μικροτόμου.
 - β. Ο σφικτήρας προωθείται με περιστροφή του τροχού του μικροτόμου και πραγματοποιούνται παχιές τομές από την επιφάνεια της παραφίνης του μπλοκ μέχρι η λεπίδα να φτάσει στους εγκλεισμένους ιστούς.

- γ. Το πάχος τομής του μικροτόμου ρυθμίζεται σε τιμή από 3-5 μικρά. Ο σφικτήρας προωθείται και κόβονται πολλές τομές από το μπλοκ για την απομάκρυνση τεχνιμάτων που έχουν δημιουργηθεί στην κομμένη επιφάνεια του ιστού κατά τη διάρκεια της αδρής περικοπής.
- δ. Το μπλοκ μπορεί να απομακρύνεται από τον σφικτήρα και να τοποθετείται σε πάγο με την όψη προς τα κάτω για τη διαπότιση του ιστού.
2. Η επόμενη φάση της δημιουργίας μικροτομών είναι η τελική κοπή και στερέωση των τομών των ιστών σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι διαδικασίες αυτές διεξάγονται ως εξής:
- α. Εάν το μπλοκ έχει τοποθετηθεί σε πάγο, απομακρύνεται από τον πάγο και τοποθετείται ξανά στον σφικτήρα του μικροτόμου.
- β. Με τη ρύθμιση του πάχους τομής στον μικροτόμο σε 3 έως 5 μικρά, ο σφικτήρας προωθείται με περιστροφή του τροχού του μικροτόμου. Κόβονται τομές από το μπλοκ, μέχρι να παραχθεί μια “κορδέλα” που περιέχει τουλάχιστον μια αποδεκτή τομή στην οποία περιλαμβάνονται οι γονάδες. (Κατά τη διάρκεια κοπής των τομών, κατά περίπτωση, το μπλοκ μπορεί να αφαιρείται από τον σφικτήρα, να τοποθετείται σε πάγο για τη διαπότιση του ιστού και, στη συνέχεια, να τοποθετείται ξανά στον σφικτήρα).
- γ. Οι τομές τοποθετούνται στην επιφάνεια του νερού ενός υδατόλουτρου ώστε να επιπλέουν σε οριζόντια θέση. Γίνεται προσπάθεια λήψης τουλάχιστον μιας τομής χωρίς πτυχώσεις και χωρίς παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα κάτω από αυτήν.
- δ. Μια αντικειμενοφόρος πλάκα μικροσκοπίου βυθίζεται στο νερό κάτω από την καλύτερη τομή και την ανασκόνει για να τη βγάλει από το νερό. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως “στερέωση” της τομής επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
- ε. Προετοιμάζονται τρεις τομές για κάθε σετ ψαριού. Η δεύτερη και τρίτη τομή λαμβάνονται διατηρώντας διαστήματα 50 μικρών μετά την πρώτη τομή. Εάν δεν έχει πραγματοποιηθεί σκλήνωση του ψαριού με τις γονάδες του στο ίδιο επίπεδο τομής, πραγματοποιούνται επιπλέον τομές για να διασφαλιστεί η λήψη τουλάχιστον έξι τομών που περιλαμβάνουν τις γονάδες από κάθε ψάρι.
- στ. Με ειδικό στυλό για την επισήμανση αντικειμενοφόρων πλακών, σημειώνεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα ο αριθμός του μπλοκ από το οποίο δημιουργήθηκε η συγκεκριμένη πλάκα.
- ζ. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε μια βάση χρώσης.
- η. Το μπλοκ αφαιρείται από τον σφικτήρα και αποθηκεύεται με την όψη προς τα κάτω.

Χρώση, τοποθέτηση καλυπτρίδας και επισήμανση αντικειμενοφόρου πλάκας

Στόχοι:

- Χρώση των τομών για ιστοπαθολογική εξέταση.
- Μόνιμη σφράγιση των στερεωμένων και χρωσμένων ιστών.
- Μόνιμη ταυτοποίηση των χρωσμένων τομών με τρόπο που επιτρέπει την πλήρη ανιχνευσιμότητα.

Διαδικασίες:

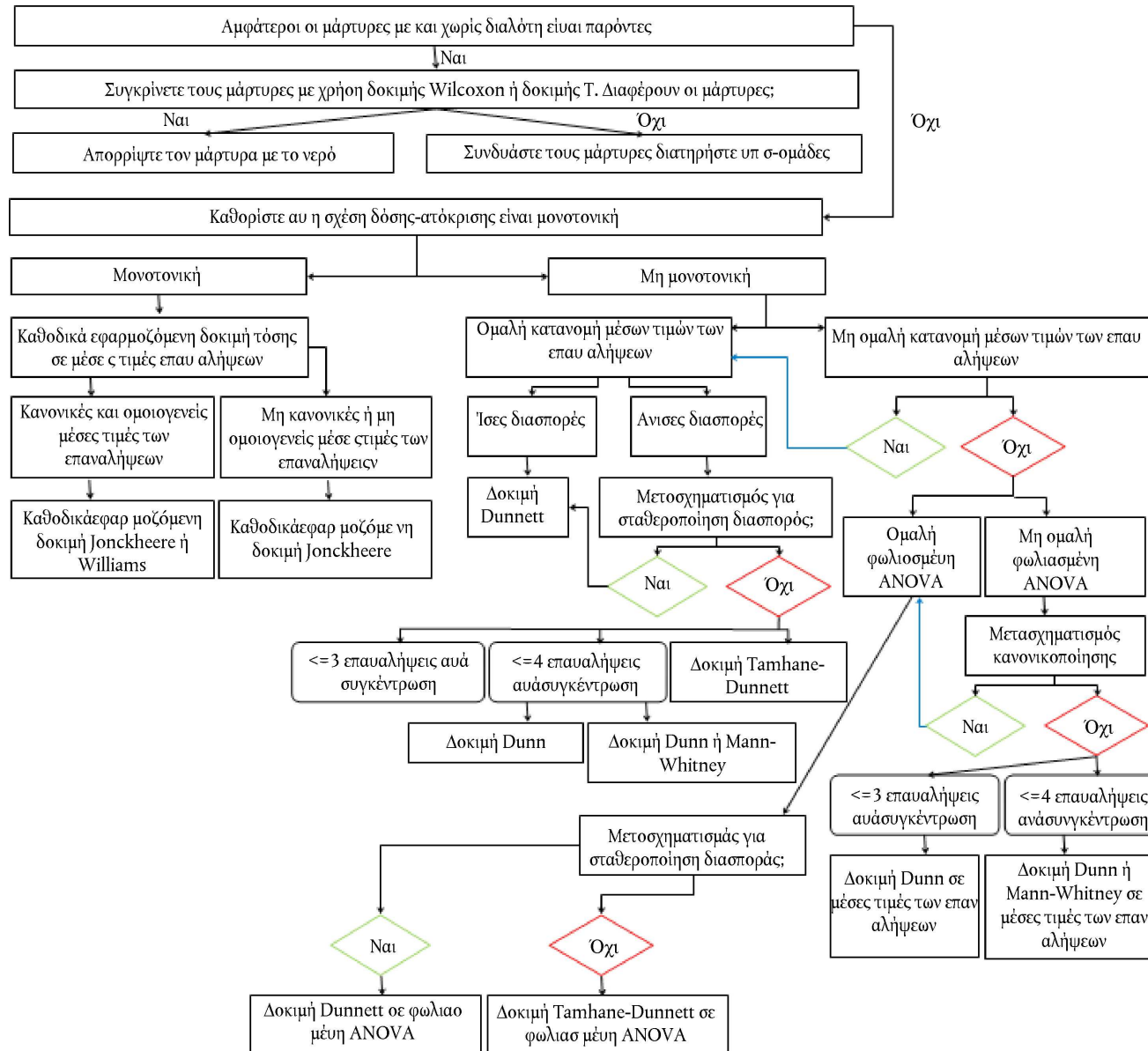
1. Χρώση
 - α. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξηραίνονται στον αέρα όλη τη νύχτα πριν από τη διαδικασία χρώσης.
 - β. Οι τομές βάφονται με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.
2. Τοποθέτηση καλυπτρίδας
 - α. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται χειροκίνητα ή αυτόματα.
 - β. Η αντικειμενοφόρος πλάκα βυθίζεται σε ξυλόλιο ή TissueClear, και η περίσσεια ξυλολίου/TissueClear αφαιρείται με απαλή ανακίνηση.
 - γ. Τοποθετούνται περίπου 0,1 ml επικαλυπτικού μέσου κοντά στο άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας στην αντίθετη πλευρά από το ματ άκρο ή επάνω στην καλυπτρίδα.
 - δ. Η καλυπτρίδα τοποθετείται υπό γωνία μικρής κλίσης στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

3. Επισημανση

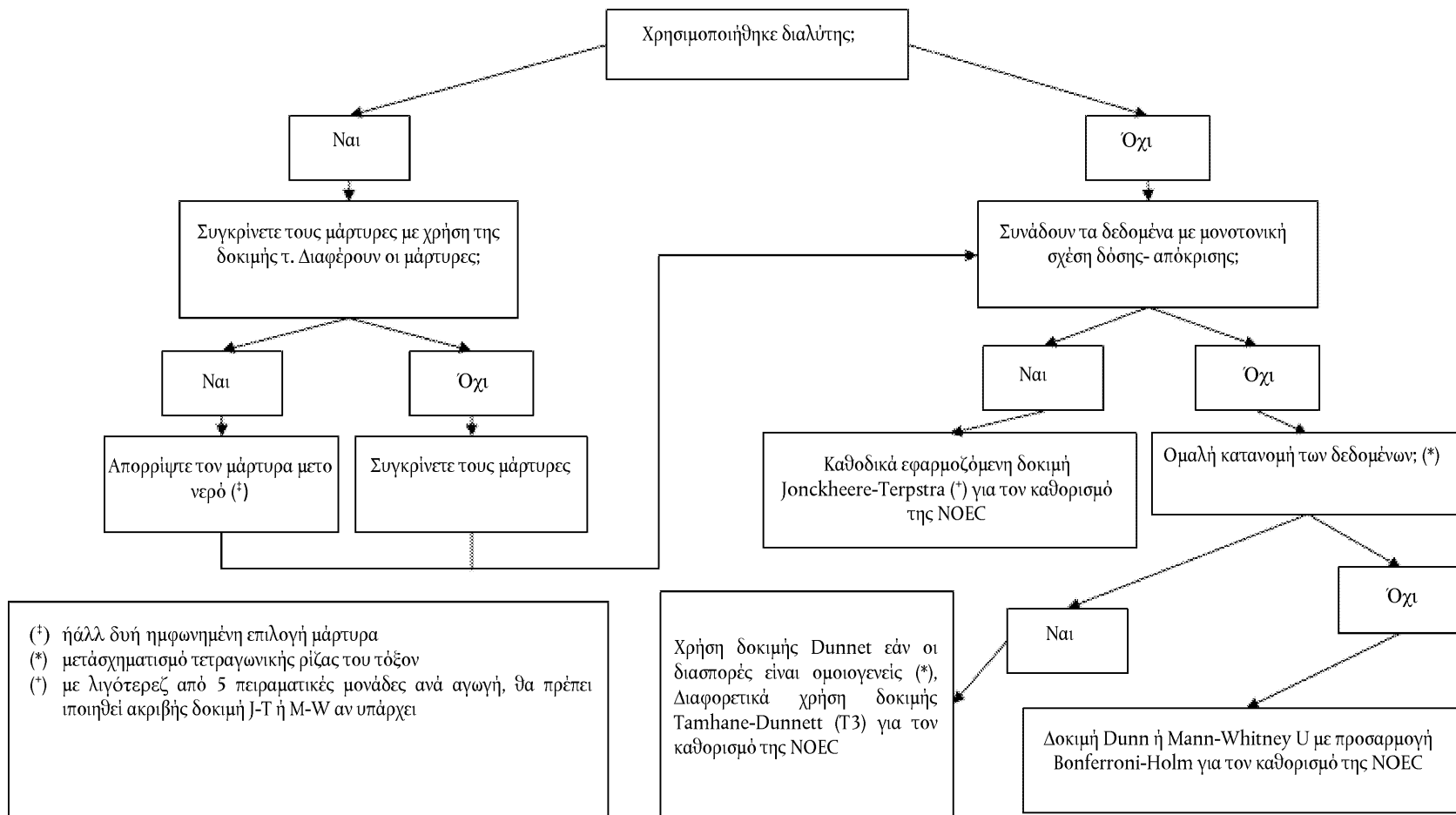
ε. Κάθε ετικέτα της αντικειμενοφόρου πλάκας θα πρέπει να περιέχει τα ακόλουθα στοιχεία.

- i. Ονομασία εργαστηρίου
 - ii. Είδος
 - iii. Αρ. δείγματος / Αρ. αντικειμένου πλάκας
 - iv. Χημική ουσία / Ομάδα αγωγής
 - v. Ημερομηνία
-

Στατιστικό διάγραμμα ροή για ανάλυση λεκιθογεννησης



Στατιστικό διάγραμμα ροή για ανάλυση αναλογίας φύλου



Προσάρτημα 9

Καθοδήγησή για δειγματοληψία ιστού για προσδιορισμό του γενετικού φύλου, καθώς και για προσδιορισμό του γενετικού φύλου μέσω μεθόδου PCR**Δειγματοληψία ιστού, προετοιμασία και φύλαξη πριν από τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου μέσω μεθόδου PCR στο ρυζόψαρο (προετοιμάστηκε από το εργαστήριο για υδρόβιους οργανισμούς της Bayer CropScience AG)**

1. Το εδρικό ή το ραχιαίο πτερύγιο κάθε ψαριού κόβονται με λεπτό ψαλίδι και τοποθετούνται σε έναν σωλήνα με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 1 (για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, βλ. παρακάτω). Το ψαλίδι καθαρίζεται μετά από τη χρήση σε κάθε ψάρι σε ένα ποτήρι ζέσεως γεμάτο με απεσταγμένο H₂O και στεγνώνεται με ένα χαρτί.
2. Στη συνέχεια, οι ιστοί των πτερυγίων ομογενοποιούνται με χρήση ενός υπέρου από τεφλόν για μικροσωλήνες προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων. Για κάθε σωλήνα χρησιμοποιείται καινούριος υπερός για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων. Οι υπεροι τοποθετούνται σε NaOH 0,5 M όλη τη νύχτα, εκπλένονται για 5 λεπτά σε απεσταγμένο H₂O και αποθηκεύονται σε αιθανόλη ή αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο μέχρι τη χρήση.
3. Είναι επίσης δυνατή η αποθήκευση του ιστού των πτερυγίων σε ξηρό πάγο χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 1 και, στη συνέχεια, σε καταψύκτη στους - 80 °C για την αποφυγή τυχόν υποβάθμισης της ποιότητας του DNA. Ωστόσο, η εκχύλιση είναι πιο αποτελεσματική εάν γίνει εκχύλιση του DNA την ίδια στιγμή (για πληροφορίες σχετικά με τον χειρισμό, βλ. παραπάνω. Τα δείγματα θα πρέπει να αποψύχονται στον πάγο μετά τη φύλαξη στους - 80 °C και πριν από την πλήρωση των σωλήνων με ρυθμιστικό διάλυμα).
4. Μετά την ομογενοποίηση, όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο και υποβάλλονται σε βρασμό επί 15 λεπτά στους 100 °C.
5. Κατόπιν, προστίθενται με σιφόνιο 100 μl του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης 2 (για λεπτομέρειες σχετικά με την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, βλ. παρακάτω) σε κάθε σωλήνα. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, ενώ στο διάστημα αυτό συχνά ανακινούνται απαλά με το χέρι.
6. Κατόπιν, όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο και υποβάλλονται σε βρασμό ξανά για επιπλέον 15 λεπτά στους 100 °C.
7. Μέχρι την περαιτέρω ανάλυση, οι σωλήνες καταψύχονται στους - 20 °C.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 1:

500 mg N-λαυρυλο σαρκοσίνη (π.χ. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml NaCl 5M

προσθήκη 100 ml απεσταγμ. H₂O

→ αυτόκαυστο

Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 2:

20 g Chelex (π.χ. Biorad, Munich, GE)

Για διόγκωση σε 100 ml απεσταγμ. H₂O

→ αυτόκαυστο

Προσδιορισμός του γενετικού φύλου (με μέθοδο PCR) στο ρυζόψαρο (προετοιμάστηκε από το εργαστήριο για υδρόβιους οργανισμούς της Bayer CropScience AG και το Πανεπιστήμιο Universität Würzburg Biozentrum)

Οι προετοιμασμένοι και κατεψυγμένοι σωλήνες (περιγράφονται στην ενότητα παραπάνω) αποψύχονται σε πάγο. Στη συνέχεια, υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση με τη χρήση φυγοκέντρου Eppendorf (30 δευτ. στη μέγ. ταχύτητα, σε θερμοκρασία δωματίου). Για την PCR, χρησιμοποιείται το διαυγές υπερκείμενο υγρό που έχει διαχωριστεί από το ίζημα. Πρέπει οπωσδήποτε να αποφεύγεται η μεταφορά κάθε ίχνους Chelex (εντοπίζεται στο ίζημα) στην αντίδραση PCR, επειδή αυτό παρεμβαίνει στη δράση της Taq πολυμεράσης. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται απευθείας ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο (στοις - 20 °C) και να υποβληθεί σε αρκετούς κύκλους επαναπόψυξης χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στο DNA προκειμένου να αναλυθεί αργότερα.

1. Παρασκευή του μείγματος αντίδρασης (25 μl ανά δείγμα):

| | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--------------------------------------------------|-------------|--------------------|
| Εκμαγείο DNA | 0,5 μl-2 μl | |
| 10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR με MgCl ₂ | 2,5 μl | 1x |
| Νουκλεοτίδια (καθένα από dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 4 μl (5 mM) | 200 μM |
| Πρόσθιος εκκινητής (10 μM) (βλ. 3-5 παρακάτω) | 0,5 μl | 200 nM |
| Αντίστροφος εκκινητής (10 μM) (βλ. 3-5 παρακάτω) | 0,5 μl | 200 nM |
| DMSO | 1,25 μl | 5 % |
| Νερό (βαθμού PCR) | έως 25 μl | |
| Taq E πολυμεράση | 0,3 μl | 1,5 U |

10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR με MgCl₂: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 στους 25 °C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, Tween 20 0,1 %

Για κάθε αντίδραση PCR (βλ. 3-5 παρακάτω), απαιτείται ένας ειδικός εκκινητής που είναι ένας νέος συνδυασμός του μείγματος αντίδρασης και της απαιτούμενης ποσότητας εκμαγείου DNA για κάθε δείγμα (βλ. παραπάνω). Οι αντίστοιχοι όγκοι μεταφέρονται με τη χρήση σιφωνίων σε καινούριους σωλήνες. Στη συνέχεια, όλοι οι σωλήνες πωματίζονται, αναδεύονται (περίπου 10 δευτ.) και υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση (10 δευτ., σε θερμοκρασία δωματίου). Τα αντίστοιχα προγράμματα PCR μπορούν πλέον να ξεκινήσουν. Επιπλέον, σε κάθε πρόγραμμα PCR χρησιμοποιείται ένας θετικός μάρτυρας (πρότυπο δείγμα DNA με γνωστή δράση και σαφή αποτελέσματα) και ένας αρνητικός μάρτυρας (1 μl απεσταγμένου H₂O).

2. Παρασκευή της πηκτής αгарόζης (1 %) — Κατά την εκτέλεση των προγραμμάτων PCR:

- 3 g αгарόζης διαλύονται σε 300 ml 1 × ρυθμιστικού διαλύματος TAE (πηκτή αгарόζης 1 %)
- Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να υποβάλλεται σε βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων (περίπου 2-3 λεπτά)
- Το θερμό διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό καλούπι, το οποίο είναι τοποθετημένο επάνω σε πάγο
- Μετά από περίπου 20 λεπτά, η πηκτή αгарόζης είναι έτοιμη για χρήση
- Η πηκτή αгарόζης φυλάσσεται σε 1 × ρυθμιστικού διαλύματος TAE μέχρι να ολοκληρωθούν τα προγράμματα PCR

3. Πρόγραμμα PCR της ακτίνης:

Σκοπός αυτής της αντίδρασης PCR είναι να καταδείξει ότι το DNA στο δείγμα δεν έχει υποστεί βλάβη.

- Ειδικός εκκινητής:

“Mact1 (άνω/πρόσθιος)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

“Mact2 (κάτω/αντίστροφος)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 °C

Κύκλος (35 φορές):

Αποδιάταξη του DNA → 45 δευτ. στους 95 °C

Πρόσδεση των εκκινητών → 45 δευτ. στους 56 °C

Επιμήκυνση των εκκινητών → 1 λεπτό στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

4. Πρόγραμμα PCR των X και Y γονιδίων:

Σε αυτό το πρόγραμμα PCR χρησιμοποιούνται δείγματα με άθικτο DNA για την ανίχνευση των X και Y γονιδίων. Το DNA των αρσενικών ατόμων αναμένεται να εμφανίζει μία διπλή ζώνη και το DNA των θηλυκών ατόμων αναμένεται να εμφανίζει μία μονή ζώνη (μετά από χρώση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή). Για αυτήν την εκτέλεση του προγράμματος, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας για τα αρσενικά άτομα (δείγμα XY) και ένας θετικός μάρτυρας για τα θηλυκά άτομα (δείγμα XX).

— Ειδικός εκκινητής:

“PG 17,5” (άνω/πρόσθιος) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

“PG 17,6” (κάτω/αντίστροφος) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 °C

Κύκλος (40 φορές):

Αποδιάταξη του DNA → 45 δευτ. στους 95 °C

Πρόσδεση των εκκινητών → 45 δευτ. στους 55 °C

Επιμήκυνση των εκκινητών → 1 λεπτό 30 δευτ. στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

5. Πρόγραμμα PCR του Y γονιδίου ως “μάρτυρας” για το πρόγραμμα PCR των X και Y γονιδίων:

Με αυτό το πρόγραμμα PCR επαληθεύονται τα αποτελέσματα του “προγράμματος PCR των γονιδίων X και Y”. Τα “δείγματα αρσενικών ατόμων” αναμένεται να εμφανίζουν μία ζώνη και τα “δείγματα θηλυκών ατόμων” δεν αναμένεται να εμφανίζουν καμία ζώνη (μετά από χρώση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή).

— Ειδικός εκκινητής:

“DMTYa (άνω/πρόσθιος)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

“DMTYd (κάτω/αντίστροφος)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Πρόγραμμα:

5 λεπτά στους 95 °C

Κύκλος (40 φορές):

Αποδιάταξη του DNA → 45 δευτ. στους 95 °C

Πρόσδεση των εκκινητών → 45 δευτ. στους 56 °C

Επιμήκυνση των εκκινητών → 1 λεπτό στους 68 °C

15 λεπτά στους 68 °C

6. Χρώση των δειγμάτων PCR:

Διάλυμα χρώσης:

Γλυκερόλη 50 %

EDTA 100 mM

SDS 1 %

Κυανό της βρωμοφαινόλης 0,25 %

Κυανόλη του ξυλενίου 0,25 %

Με σιφόνιο μεταφέρεται 1 μl του διαλύματος χρώσης σε κάθε σωλήνα

7. Έναρξη της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή:

— Η έτοιμη πηκτή αгарόζης 1 % μεταφέρεται σε θάλαμο ηλεκτροφόρησης σε πηκτή γεμάτο με 1x ρυθμιστικό διάλυμα TAE

— Σε κάθε υποδοχή της πηκτής αгарόζης μεταφέρονται με σιφόνιο 10-15 μl κάθε χρωσμένου δείγματος PCR

- Επίσης, σε μια ξεχωριστή υποδοχή μεταφέρονται με σιφόνιο 5-15 μl ενός “Ladder” 1kb (Invitrogen)
- Η ηλεκτροφόρηση εκκινείται στα 200 V
- Διακόπτεται μετά από 30-45 λεπτά

8. Καθορισμός των ζωνών:

- Η πηκτή αгарόζης καθαρίζεται σε απεσταγμένο H₂O
 - Στη συνέχεια, η πηκτή αгарόζης μεταφέρεται σε βρωμιούχο αιθίδιο για 15-30 λεπτά
 - Κατόπιν, φωτογραφίζεται η πηκτή αгарόζης σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας
 - Τέλος, τα δείγματα εξετάζονται σε σύγκριση με τη ζώνη (ή τις ζώνες) του θετικού μάρτυρα και το ladder
-

Προσάρτημα 10

Καθοδήγησή σχετικά με τη δειγματοληψία ιστού για τον προσδιορισμό του γενετικού φύλου με μέθοδο PCR στον τρικαντό ξαστερώστε**Δειγματοληψία ιστού και εκχύλιση DNA**

Η εκχύλιση του DNA μπορεί να πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων που διατίθενται στο εμπόριο και με αυτοματοποιημένα ή μη αυτοματοποιημένα συστήματα εκχύλισης. Παρακάτω περιγράφεται το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Cefas Weymouth και έχουν προστεθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις, κατά περίπτωση.

1. Με λεπτό ψαλίδι, αφαιρείται από κάθε ψάρι ένα μικρό κομμάτι ιστού (10-20 mg) από την οπισθοπλάγια περιοχή (μετά την αφαίρεση του κεφαλιού και της ουράς για ανάλυση VTG). Ο ιστός μεταφέρεται σε έναν σωλήνα και τοποθετείται απευθείας σε υγρό άζωτο (για αποθήκευση στους -80°C) ή συμπληρώνεται με αιθανόλη 70 % (για μεταφορά και επακόλουθη αποθήκευση στους 4°C). Το ψαλίδι καθαρίζεται μετά από τη χρήση σε κάθε ψάρι σε αιθανόλη 70 % και μετά σε απεσταγμένο νερό και, στη συνέχεια, στεγνώνεται με χαρτί.
2. Η αιθανόλη (εάν υπάρχει) αφαιρείται με αναρρόφηση και ο ιστός υφίσταται χώνευση όλη τη νύχτα με πρωτεΐνάση K σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL (Qiagen). Ένα κλάσμα (200 μl) του διαλύματος χώνευσης μεταφέρεται σε μπλοκ S των 96 βοθρίων (Qiagen) και το DNA εκχυλίζεται από τη διάταξη 96 βοθρίων μέσω του κιτ Qiagen Universal BioRobot και QIamp Investigator BioRobot. Το DNA εκλύεται σε 50 μl νερό απαλλαγμένο από DNAάση και RNAάση. Εάν το DNA εκχυλίζεται από σκληρούς ιστούς (όπως η ραχοκοκαλιά ή ένα θωρακικό περύγιο), μπορεί να χρειαστεί να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με τη χρήση ενός συστήματος λύσης ιστών FastPrep® ή ισοδύναμου συστήματος διάσπασης ιστών.

Εναλλακτικά,

- (α) ο ιστός υφίσταται χώνευση όλη τη νύχτα με πρωτεΐνάση K σε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης G2 (Qiagen) και το DNA εκχυλίζεται από 200 μl του διαλύματος χώνευσης με χρήση είτε του κιτ EZ-1 DNA Easy Tissue και του EZ-1 BioRobot είτε του κιτ DNA Easy Tissue Mini Kit. Το DNA εκλύεται σε όγκο 50 μl.
 - (β) Οι ιστοί υφίστανται κατεργασία με το αντιδραστήριο DNAzol. Τα δείγματα ιστού υφίστανται σύντομη λύση σε 1 ml DNAzol για 10 λεπτά σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml και, στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται στις 13 000 σ.α.λ. για 5 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων. Στη συνέχεια, το δείγμα που έχει υποστεί λύση μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml που περιέχει 500 μl αιθανόλη 100 % μοριακού βαθμού καθαρότητας και φυγοκεντρείται στις 13 000 σ.α.λ. για 10 λεπτά για να επιτευχθεί καθίζηση του DNA. Η αιθανόλη αφαιρείται και αντικαθίσταται από 400 μl αιθανόλης 70 % μοριακού βαθμού καθαρότητας, φυγοκεντρείται στις 13 000 σ.α.λ. για 5 λεπτά και το ίζημα DNA διαλύεται σε 50 μl νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας απαλλαγμένο από DNAάση και RNAάση. Παρομοίως, όταν χρησιμοποιούνται σκληροί ιστοί (θωρακικό περύγιο) μπορεί να χρειαστεί να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με τη χρήση ενός συστήματος λύσης ιστών FastPrep® ή ισοδύναμου συστήματος διάσπασης ιστών πριν από την εκχύλιση του DNA.
3. Το DNA αποθηκεύεται στους -20°C , όσο απαιτείται.

Σημαντική σημείωση: Η εκτέλεση των διαδικασιών πρέπει να πραγματοποιείται με γάντια.

Ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Πραγματοποιήθηκαν ενισχύσεις του DNA με χρήση 2,5 μl εκχυλίσματος DNA σε όγκο αντίδρασης 50 μl με εκκινητές για τη γενετική θέση Idh (όπως περιγράφηκε από τους Reichel κ.ά., 2004. *Current Biology* 1:1416-1424):

Πρόσθιος εκκινητής 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Αντίστροφος εκκινητής 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Υπάρχουν πολλοί προμηθευτές κατάλληλων αντιδραστηρίων PCR. Παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιείται επί του παρόντος στο εργαστήριο Cefas Weymouth.

1. Παρασκευή του μείγματος αντίδρασης (50 µl ανά δείγμα):

Το Mastermix παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παρακάτω. Μπορεί να παρασκευάζεται από πριν και να αποθηκεύεται κατεψυγμένο στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ όσο απαιτείται. Πρέπει να παρασκευάζεται επαρκής ποσότητα Mastermix για αρνητικό μάρτυρα (μόνο νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας).

| | Όγκος (συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης)/δείγμα | Τελική συγκέντρωση |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 5xGoTaq® | 10 µl | 1x |
| MgCl ₂ | 5 µl (25 mM) | 2,5 mM |
| Νουκλεοτιδία (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0,5 µl (25 mM έκαστο) | 250 µM έκαστο |
| Πρόσθιος εκκινητής | 0,5 µl (0,1 nmol/µl) | 2,0 µM |
| Αντίστροφος εκκινητής | 0,5 µl (0,1 nmol/µl) | 2,0 µM |
| Νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας | 30,75 µl | |
| Πολυμεράση GoTaq | 0,25 µl | 1,25 U |

- Διανέμονται 47,5 µl σε έναν επισημασμένο σωλήνα PCR με λεπτά τοιχώματα των 0,5 ml.
- Προστίθενται 2,5 µl κεκαθαρμένου DNA στον κατάλληλα επισημασμένο σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα και τον αρνητικό μάρτυρα.
- Προστίθενται στην επιφάνεια 2 σταγόνες ορυκτελαίου. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί θερμοκυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι.
- Κλείνονται τα καπάκια.
- Η αποδιάταξη των δειγμάτων πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή Peltier PTC-225 στους $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά και ακολουθούν 39 κύκλοι στους $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτό, στους $55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτό, στους $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 λεπτό και ένας τελικός κύκλος επέκτασης στους $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά.

2. Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης (2 %):

Κατά κανόνα, τα προϊόντα της PCR αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 20 % που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο.

Μπορούν ωστόσο να χρησιμοποιηθούν και συστήματα ηλεκτροφόρησης βασιζόμενα σε τριχοειδή.

- 2 g αγαρόζης προστίθενται σε 100 ml 1× ρυθμιστικού διαλύματος TAE.
- Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων (περίπου 2-3 λεπτά) για να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Προστίθενται 2 σταγόνες βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 µg/ml.
- Το θερμό διάλυμα μεταφέρεται στον εξοπλισμό χύτευσης της πηκτής.
- Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί.

3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή:

- Η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται στον εξοπλισμό ηλεκτροφόρησης και βυθίζεται σε 1× ρυθμιστικό διάλυμα TAE.
- 20 µl από κάθε δείγμα φορτώνονται σε κάθε βοθρίο και προστίθεται ένας δείκτης μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Promega) σε ένα εφεδρικό βοθρίο.
- Διεξάγεται ηλεκτροφόρηση στα 120 V για 30-45 λεπτά.

4. Οπτικοποίηση των προϊόντων ενίσχυσης

Εάν προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο στην πηκτή αгарόζης, όπως περιγράφεται ανωτέρω, τα προϊόντα DNA ανιχνεύονται κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Εναλλακτικά, γίνεται χρώση της πηκτής αгарόζης με κάλυψη της πηκτής με αραιό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 µg/ml σε νερό) για 30 λεπτά πριν από την οπτικοποίηση.

Προσάρτημα 11

Καθοδήγησή σχετικά με τη διαδικασία τεχνητής γονιμοποίησης για τον τρικαντό ξαστερόστε

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι η περιγραφή των διαδικασιών λήψης γονιμοποιημένων αυγών από τον τριάκανθο γαστερόστεο εν όψει της χρήσης τους στη δοκιμή FSDT.

Διαδικασίες

Λήψη σπέρματος από τα αρσενικά άτομα

1. Ένα αρσενικό άτομο με καλό χρωματισμό από τον επιθυμητό πληθυσμό υποβάλλεται σε ευθανασία.
2. Οι όρχεις διαχωρίζονται από την κάθε πλευρά του ψαριού. Οι όρχεις γενικά είναι ραβδοειδείς δομές έντονης χρώσης που είναι εύκολα αντιληπτοί στην πλευρική διάμεση γραμμή του σώματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις ακόλουθες μεθόδους:
3. Με ένα λεπτό ψαλίδι, ξεκινώντας από την αμάρα πραγματοποιείται τομή 1-1,5 cm με μία μοναδική περικοπή υπό γωνία περίπου 45 μοιρών.
4. Με ένα νυστέρι, πραγματοποιείται μια μικρή τομή στο πλάι του ψαριού λίγο πιο πίσω από την πύελο και ελαφρώς κοιλιακά των πλευρικών πλακών.
5. Οι όρχεις αφαιρούνται με μια λεπτή λαβίδα και τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο petri.
6. Κάθε όρχις καλύπτεται με 100 μl **τελικού διαλύματος Hank (*)** που έχει παρασκευαστεί προσφάτως.
7. Οι όρχεις τεμαχίζονται σε κύβους με μια λεπίδα ή ένα νυστέρι. Με αυτόν τον τρόπο, απελευθερώνεται το σπέρμα και το διάλυμα Hank αποκτά μια γαλακτώδη εμφάνιση.
8. Το υγρό που περιέχει το σπέρμα προστίθεται σε έναν σωλήνα με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η αναρρόφηση τμημάτων ιστών των όρχεων με το σιφόνιο.
9. Προστίθενται 800 μl τελικού διαλύματος Hank στον σωλήνα και το διάλυμα αναμειγνύεται καλά.
10. Εάν απαιτείται, το αρσενικό άτομο μπορεί να διατηρηθεί μέσω μονιμοποίησης σε αιθανόλη 100 % ή άλλο κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται εάν η μελέτη πρόκειται να εξετάσει τη γονική προέλευση των απογόνων.

(*) Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων Hank (Hank's Buffered Salt Solution — HBSS):

Το διάλυμα HBSS απαιτείται για τη διατήρηση του σπέρματος ενώ γίνεται προετοιμασία για τη γονιμοποίηση.

Σημαντική σημείωση: Ενώ σχεδόν όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης μπορούν να παρασκευάζονται εκ των προτέρων, **το διάλυμα παρακαταθήκης 5** και εν συνέχεια το **τελικό διάλυμα** θα πρέπει να είναι **προσφάτως** παρασκευασμένα την ημέρα της χρήσης.

Διάλυμα παρακαταθήκης 1

| | |
|-----------------------|--------|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,40 g |
| Απεσταγμένο νερό (DW) | 100 ml |

Διάλυμα παρακαταθήκης 2

| | |
|-------------------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ (άνυδρο) | 0,358 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,60 g |
| DW | 100 ml |

Διάλυμα παρακαταθήκης 3

| | |
|-------------------|--------|
| CaCl ₂ | 0,72 g |
| DW | 50 ml |

Διάλυμα παρακαταθήκης 4

MgSO₄·7H₂O 1,23 g

DW 50 ml

Διάλυμα παρακαταθήκης 5 (προσφάτως παρασκευασμένο)

NaHCO₃ 0,35 g

DW 10 ml

Σημείωση: Εάν ήδη υπάρχουν διαθέσιμα στο εργαστήριο μερικά από τα παραπάνω άλατα αλλά με διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό (δηλ. 2H₂O αντί για άνυδρο), μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά πρέπει πρώτα να προσαρμοστεί το βάρος βάσει του μοριακού βάρους.

Για το τελικό διάλυμα Hank προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής:

διάλυμα παρακαταθήκης 1 1,0 ml

διάλυμα παρακαταθήκης 2 0,1 ml

διάλυμα παρακαταθήκης 3 0,1 ml

DW 8,6 ml

διάλυμα παρακαταθήκης 4 0,1 ml

διάλυμα παρακαταθήκης 5 0,1 ml

Αναμειξτε καλά πριν από τη χρήση.

Γονιμοποίηση

1. Προσδιορίζονται τα μεγάλα, κυοφορούντα θηλυκά άτομα από τον πληθυσμό-στόχο. Τα θηλυκά άτομα είναι έτοιμα για σύμπτωση μόνο όταν φαίνονται αυγά να προεξέχουν από την αμάρα. Τα έτοιμα θηλυκά άτομα έχουν τη χαρακτηριστική στάση με το κεφάλι προς τα επάνω.
2. Περάστε απαλά το δάκτυλο ή τον αντίχειρα κατά μήκος της πλευρικής όψης του ψαριού προς την ουρά για να παρακινήσετε την αποβολή ενός σάκου αυγών σε ένα καινούριο τρυβλίο petri. Επαναλάβετε τη διαδικασία από την άλλη πλευρά και τοποθετήστε ξανά το ψάρι στη δεξαμενή του.
3. Τα αυγά απλώνονται (σχηματίζοντας μια μονή στιβάδα) με τη χρήση ενός λεπτού πινέλου. Είναι σημαντικό να εκτίθεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερος αριθμός αυγών στο σπέρμα, συνεπώς είναι χρήσιμο να μεγιστοποιείται η έκταση της επιφάνειας που καλύπτουν τα αυγά. Σημαντική σημείωση: Τα αυγά πρέπει να διατηρούνται υγρά με τοποθέτηση βρεγμένων χαρτομάντιλων γύρω από αυτά (είναι σημαντικό τα αυγά να μην έρχονται σε άμεση επαφή με το νερό, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει πρόωρη σκλήρυνση του χορίου αποτρέποντας τη γονιμοποίηση). Ο αριθμός των αυγών που μπορεί να παράγει κάθε θηλυκό παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, αλλά, κατά μέσο όρο, αναμένεται η εύκολη λήψη περίπου 150 αυγών από κάθε θηλυκό που κυοφορεί.
4. Με ένα πινέλο απλώνονται ομοιόμορφα 25μl σπέρματος στο μείγμα Hank καλύπτοντας ολόκληρη την επιφάνεια των αυγών. Τα αυγά θα σκληρύνουν και θα αλλάξουν χρώμα γρήγορα (εντός ενός λεπτού), μόλις γίνει έναρξη της γονιμοποίησης. Εάν ο εκτιμώμενος αριθμός αυγών είναι μεγαλύτερος από 150, η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κατά τον ίδιο τρόπο, εάν τα αυγά δεν σκληρύνουν εντός ενός λεπτού, προστίθεται λίγο ακόμη σπέρμα. Σημαντική σημείωση: Η προσθήκη επιπλέον σπέρματος δεν βελτιώνει οπωσδήποτε το ποσοστό γονιμοποίησης.
5. Τα αυγά και το διάλυμα σπέρματος παραμένουν σε ηρεμία για να “αλληλεπιδράσουν” επί τουλάχιστον 15 λεπτά και, στη συνέχεια, τα γονιμοποιημένα αυγά μεταφέρονται στα ενυδρεία έκθεσης εντός 1,5 ώρας μετά τη γονιμοποίηση.
6. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με ένα άλλο θηλυκό μέχρι να συλλεχθεί ο επιθυμητός αριθμός αυγών.
7. Λίγα αυγά από την τελευταία παρτίδα φυλάσσονται και μονιμοποιούνται σε οξικό οξύ 10 %.

Καταμέτρηση και κατανομή των αυγών στα ενυδρεία δοκιμής

1. Τα αυγά θα πρέπει να διανέμονται ομοιόμορφα μεταξύ κάθε επιπέδου αγωγής για την αποφυγή γενετικής μεροληψίας. Κάθε παρτίδα γονιμοποιημένων αυγών θα πρέπει να διαχωρίζεται σε ομάδες ίδιου μεγέθους (ίδιος αριθμός με τα επίπεδα αγωγής) με ένα αμβλύ εργαλείο (δηλ. λαβίδα εντομολογίας με πλατιά άκρα ή βρόχος εμβολιασμού). Εάν ο στόχος είναι 4 επαναλήψεις για κάθε αγωγή, με 20 αυγά σε κάθε επανάληψη, θα πρέπει να κατανεμηθούν 80 αυγά ανά ενυδρείο έκθεσης. Σημαντική σημείωση: Συνιστάται να προστίθεται επιπλέον ποσότητα 20 % (δηλ. 96 αυγά ανά επίπεδο αγωγής) μέχρι να διασφαλιστεί η επίτευξη ποσοστών γονιμοποίησης 100 %.
2. Τα αυγά του γαστερόστεου είναι πολύ ευαίσθητα σε λοιμώξεις από μύκητες όταν βρίσκονται εκτός της υπό πατρικής προστασίας φωλιάς. Για τον λόγο αυτό, η κατεργασία όλων των αυγών με κυανό του μεθυλενίου κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών της δοκιμής είναι εξαιρετικά σημαντική. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης κυανού του μεθυλενίου με συγκέντρωση 1 mg/ml και προστίθεται στα ενυδρεία έκθεσης για την επίτευξη μέγιστης τελικής συγκέντρωσης της τάξεως των 2,125 mg/l. Σημαντική σημείωση: Οι γαστερόστεοι δεν θα πρέπει να εκτίθενται σε κυανό του μεθυλενίου μετά την εκκόλαψη των αυγών, επομένως το σύστημα θα πρέπει να έχει απαλλαγεί από κυανό του μεθυλενίου μέχρι την 6η ημέρα.
3. Τα αυγά επιθεωρούνται καθημερινά και τυχόν νεκρά ή μη γονιμοποιημένα αυγά καταγράφονται ανάλογα. Σημαντική σημείωση: Τα αυγά δεν θα πρέπει ποτέ να παραμένουν εκτός νερού μέχρι την εκκόλαψή τους, ακόμη και για πολύ σύντομες χρονικές περιόδους.

Γ.42 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 306 του ΟΟΣΑ (1992). Όταν αναπτύχθηκαν οι αρχικές μέθοδοι δοκιμών, δεν ήταν γνωστό σε ποιο βαθμό θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στο θαλάσσιο περιβάλλον τα αποτελέσματα από τις δοκιμές διαλογής σχετικά με την άμεση βιοαποικοδομησιμότητα με χρήση γλυκών νερών και εκρών εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων ή ενεργοποιημένης ιλύος ως εμβολίου. Έχουν αναφερθεί διάφορα αποτελέσματα σχετικά με αυτό το θέμα (π.χ. (1)).
2. Πολλά βιομηχανικά απόβλητα, τα οποία περιέχουν πολλά είδη χημικών ουσιών, φτάνουν στη θάλασσα είτε μέσω άμεσης εισόδου είτε μέσω ποταμοκόλπων και ποταμών, στα οποία οι χρόνοι παραμονής είναι σύντομοι σε σχέση με τη χρονική περίοδο που απαιτείται για την πλήρη βιοαποικοδόμηση πολλών από τις χημικές ουσίες που υπάρχουν σε αυτά. Λόγω της αυξανόμενης συνειδητοποίησης της ανάγκης για προστασία του θαλάσσιου περιβάλλοντος από τα όλο και μεγαλύτερα φορτία των χημικών ουσιών, καθώς και της ανάγκης για εκτίμηση της πιθανής συγκέντρωσης των χημικών ουσιών στη θάλασσα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι δοκιμών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα σε θαλάσσιο νερό.
3. Οι μέθοδοι που περιγράφονται στο παρόν χρησιμοποιούν φυσικό θαλάσσιο νερό τόσο ως υδατική φάση όσο και ως πηγή μικροοργανισμών. Με στόχο τη συμμόρφωση προς τις μεθόδους άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας σε γλυκά νερά, διερευνήθηκε η χρήση υπερδιηθημένου και φυγοκεντρημένου θαλάσσιου νερού, καθώς και η χρήση θαλάσσιων ιζημάτων ως εμβόλια. Οι διερευνήσεις αυτές ήταν ανεπιτυχείς. Επομένως, το μέσο δοκιμής είναι το φυσικό θαλάσσιο νερό που έχει υποστεί προκατεργασία για την αφαίρεση χονδρόκοκκων σωματιδίων.
4. Προκειμένου να εκτιμηθεί η τελική βιοαποικοδομησιμότητα με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης, πρέπει να χρησιμοποιούνται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC). Αυτό με τη σειρά του καθιστά απαραίτητη την προσθήκη ανόργανων θρεπτικών συστατικών (N και P) στο θαλάσσιο νερό, η χαμηλή συγκέντρωση των οποίων, σε αντίθετη περίπτωση, θα περιόριζε την απομάκρυνση του DOC. Είναι επίσης απαραίτητη η προσθήκη των θρεπτικών συστατικών στη μέθοδο κλειστής φιάλης, λόγω της συγκέντρωσης της προστιθέμενης υπό δοκιμή χημικής ουσίας.
5. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι δεν αποτελούν δοκιμές άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας επειδή δεν προστίθεται εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Αλλά ούτε προσομοιώνουν το θαλάσσιο περιβάλλον, επειδή γίνεται προσθήκη των θρεπτικών συστατικών και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας είναι πάρα πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή που θα υπήρχε στη θάλασσα. Για τους λόγους αυτούς, οι μέθοδοι προτείνονται στο πλαίσιο μιας νέας υποενοτήτας που καλείται "Βιοαποικοδομησιμότητα σε θαλάσσιο νερό".

ΕΦΑΡΜΟΓΗ

6. Τα αποτελέσματα των δοκιμών, τα οποία εφαρμόζονται επειδή το σχήμα χρήσης και απόρριψης της εν λόγω ουσίας υποδεικνύει μια πορεία προς τη θάλασσα, δίνουν μια πρώτη εντύπωση της βιοαποικοδομησιμότητας σε θαλάσσιο νερό. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό (αφαίρεση DOC > 70 %, θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) >60 %), μπορεί να συναχθεί ότι υπάρχει δυνατότητα βιοαποικοδόμησης στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ωστόσο, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει ένα τέτοιο ενδεχόμενο, αλλά υποδεικνύει ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, για παράδειγμα με χρήση όσο το δυνατό χαμηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας.
7. Σε κάθε περίπτωση, εάν απαιτείται μια πιο οριστική τιμή για τον ρυθμό ή τον βαθμό βιοαποικοδόμησης στο θαλάσσιο νερό σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία, θα πρέπει να εφαρμοστούν άλλες πιο πολύπλοκες και εξειδικευμένες, και επομένως πιο δαπανηρές, μέθοδοι. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εφαρμοστεί μια δοκιμή προσομοίωσης με χρήση συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας που προσεγγίζει περισσότερο την πιθανή περιβαλλοντική συγκέντρωση. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μη εμπλουτισμένο θαλάσσιο νερό που δεν έχει υποστεί προκατεργασία, το οποίο λαμβάνεται από την τοποθεσία ενδιαφέροντος, καθώς και ειδικές χημικές αναλύσεις για την παρακολούθηση της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης. Σε ό,τι αφορά την τελική βιοαποικοδομησιμότητα, θα ήταν αναγκαία η χρήση ουσιών επισημασμένων με¹⁴C προκειμένου να μετρηθούν οι ρυθμοί εξαφάνισης του διαλυτού οργανικού¹⁴C και παραγωγής του¹⁴CO₂ σε περιβαλλοντικά ρεαλιστικές συνθήκες.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

8. Η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ο παρακάτω πίνακας παρέχεται για να βοηθήσει σε αυτήν την επιλογή. Ενώ οι ουσίες με υδατοδιαλυτότητα χαμηλότερη από το ισοδύναμο των 5 mg C/l περιπου δεν είναι δυνατόν να ελεγχθούν με τη μέθοδο ανακινούμενης φιάλης, τουλάχιστον, κατ' αρχήν, οι δυσδιάλυτες ουσίες μπορούν να ελεγχθούν με τη μέθοδο κλειστής φιάλης.

Πίνακας

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της δοκιμής ανακινούμενης φιάλης και της δοκιμής κλειστής φιάλης

| ΜΕΘΟΔΟΣ | ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ | ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ | <ul style="list-style-type: none"> — απλή συσκευή εκτός από τον αναλυτή C — η διάρκεια των 60 ημερών δεν δημιουργεί πρόβλημα — απουσία παρεμβολής από τη νιτροποίηση — δυνατότητα προσαρμογής για πτητικές ουσίες | <ul style="list-style-type: none"> — απαιτείται αναλυτής C — χρησιμοποιεί 5-40 mg DOC/l, μπορεί να έχει ανασταλτική επίδραση — ο προσδιορισμός DOC είναι δύσκολος σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο νερό (επίδραση χλωριδίων) — ο DOC είναι μερικές φορές υψηλός στο θαλάσσιο νερό |
| ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ | <ul style="list-style-type: none"> — απλή συσκευή — απλός τελικός προσδιορισμός — χρησιμοποιεί χαμηλή συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (2 mg/l), επομένως υπάρχει μικρότερη πιθανότητα αναστολής — δυνατότητα εύκολης προσαρμογής για πτητικές ουσίες | <ul style="list-style-type: none"> — πιθανώς δύσκολη η διατήρηση της αεροστεγανότητας των φιαλών — η ανάπτυξη βακτηρίων στα τοιχώματα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδείς τιμές — οι τιμές πρόσληψης O₂ από το τυφλό μπορεί να είναι υψηλές, ειδικά μετά από 28 ημέρες. Ωστόσο, αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με την παλαίωση του θαλάσσιου νερού — πιθανή παρεμβολή από την πρόσληψη O₂ μέσω νιτροποίησης |

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή με θαλάσσιο νερό της τροποποιημένης δοκιμής διαλογής του ΟΟΣΑ που περιγράφεται στο Κεφάλαιο Γ.4B του παρόντος παραρτήματος (2). Οριστικοποιήθηκε μετά από μια κυκλική δοκιμή που οργανώθηκε για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή από το Water Quality Institute της Δανίας (3).
2. Από κοινού με την αντίστοιχη θαλάσσια μέθοδο κλειστής φιάλης, τα αποτελέσματα από αυτήν τη δοκιμή δεν πρέπει να λαμβάνονται ως ενδείξεις άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα ουσιών σε θαλάσσια περιβάλλοντα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3. Μια προκαθορισμένη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας διαλύεται στο μέσο δοκιμής για να επιτευχθεί συγκέντρωση 5-40 mg διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC)/l. Εάν τα όρια ευαισθησίας των αναλύσεων οργανικού άνθρακα βελτιωθούν, ενδεχομένως να είναι πλεονεκτική η χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας, ιδιαίτερα για ανασταλτικές ουσίες. Το διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας στο μέσο δοκιμής επωάζεται υπό ανάδευση στο σκοτάδι ή στο διάχυτο φως κάτω από αερόβιες συνθήκες και σε σταθερή θερμοκρασία (με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C) η οποία θα κυμαίνεται, συνήθως, μεταξύ 15 και 20 °C. Σε περιπτώσεις όπου ο στόχος της μελέτης είναι η προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών, οι δοκιμές μπορούν να διεξάγονται εκτός αυτού του συνήθους εύρους θερμοκρασίας. Η συνιστώμενη μέγιστη διάρκεια της δοκιμής είναι περίπου 60 ημέρες. Μετά την αποικοδόμηση ακολουθούν μετρήσεις DOC (τελική αποικοδόμηση) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδική ανάλυση (πρωτογενής αποικοδόμηση).

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

4. Για να διαπιστωθεί εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε μια συγκεκριμένη ουσία, πρέπει να είναι γνωστές κάποιες ιδιότητες της ουσίας. Πρέπει να έχει προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα της ουσίας, η πτητικότητα της πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην προκύπτουν σημαντικές απώλειες κατά τη διάρκεια της δοκιμής και η υδατοδιαλυτότητά της θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το ισοδύναμο των 2.5-40 mg C/l. Επίσης, η υπό δοκιμή ουσία δεν θα πρέπει να προσροφάται σημαντικά σε γυάλινες επιφάνειες. Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών της υπό δοκιμή ουσίας.

5. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας για βακτήρια, για παράδειγμα σύμφωνα με μετρήσεις βραχυχρόνιων δοκιμών της ταχύτητας αναπνοής (4), μπορεί να είναι χρήσιμες κατά την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης. Ωστόσο, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής βιοαποικοδόμησης, δεν επαρκούν πάντα οι εν λόγω πληροφορίες και η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 18 είναι καταλληλότερη.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

6. Για τον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας του δείγματος θαλάσσιου νερού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό είναι το βενζοϊκό νάτριο, το οξικό νάτριο και η ανιλίνη. Οι ουσίες αναφοράς πρέπει να αποικοδομούνται σε ένα ευλόγως σύντομο χρονικό διάστημα, διαφορετικά συνιστάται να επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.
7. Στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής όπου τα δείγματα θαλάσσιου νερού ελήφθησαν από διαφορετικές τοποθεσίες και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέσα στο έτος (3), η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος για να επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 τοις εκατό (t_{50}), εξαιρώντας τη λανθάνουσα φάση, ήταν 1 έως 4 ημέρες και 1 έως 7 ημέρες αντίστοιχα για το βενζοϊκό νάτριο. Για την ανιλίνη, η t_L κυμαινόταν από 0 έως 10 ημέρες, ενώ ο χρόνος t_{50} κυμαινόταν από 1 έως 10 ημέρες.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8. Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου καθορίστηκε στην κυκλική δοκιμή (3). Η χαμηλότερη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας, για την οποία μπορεί να χρησιμοποιείται η παρούσα μέθοδος με την ανάλυση DOC, προσδιορίζεται κατά κύριο λόγο από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης οργανικού άνθρακα (περίπου 0,5 mg C/l, επί του παρόντος) και τη συγκέντρωση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα στο χρησιμοποιούμενο θαλάσσιο νερό (συνήθως της τάξεως των 3-5 mg/l για νερό από την ανοικτή θάλασσα). Η συγκέντρωση υποβάθρου του DOC δεν θα πρέπει να υπερβαίνει περίπου το 20 % της συνολικής συγκέντρωσης DOC μετά την προσθήκη της υπό δοκιμή ουσίας. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, η συγκέντρωση υποβάθρου του DOC μπορεί μερικές φορές να μειωθεί με την παλαίωση του θαλάσσιου νερού πριν από τη δοκιμή. Εάν η μέθοδος χρησιμοποιείται μόνο με ειδική χημική ανάλυση (με την οποία μετράται η πρωτογενής αποικοδόμηση), ο ερευνητής πρέπει να παράσχει επιπλέον πληροφορίες προκειμένου να τεκμηριώσει εάν μπορεί να αναμένεται τελική αποικοδόμηση. Οι εν λόγω επιπλέον πληροφορίες μπορεί να συμπεριλαμβάνουν αποτελέσματα από άλλες δοκιμές άμεσης ή εγγενούς βιοαποικοδομησιμότητας.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Συσκευές

9. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και:
- Συσκευή ανατάραξης που δέχεται φιάλες Erlenmeyer 0,5-2 λίτρων, η οποία διαθέτει αυτόματο έλεγχο θερμοκρασίας ή χρησιμοποιείται εντός θαλάμου σταθερής θερμοκρασίας 15-20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C,
 - Φιάλες Erlenmeyer 0,5-2 λίτρων με στενό στόμιο,
 - Συσκευή διήθησης με μεμβράνη ή φυγόκεντρος,
 - Διηθητικές μεμβράνες, 0,2-0,45 μm ,
 - Αναλυτής άνθρακα,
 - Εξοπλισμός για ειδική ανάλυση (προαιρετικός).

Θαλάσσιο νερό

10. Συλλέγεται ένα δείγμα θαλάσσιου νερού μέσα σε έναν επιμελώς καθαρισμένο περιέκτη, ο οποίος μεταφέρεται στο εργαστήριο, κατά προτίμηση εντός μίας ή δύο ημερών από τη συλλογή. Κατά τη μεταφορά, η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει σε σημαντικό βαθμό τη θερμοκρασία που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Η τοποθεσία δειγματοληψίας προσδιορίζεται με ακρίβεια και περιγράφεται όσον αφορά την κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών της. Ειδικά για παράκτια ύδατα, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον εν λόγω χαρακτηρισμό ο αριθμός των ετερότροφων μικροβιακών αποικιών και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων διαλυμένων νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων.

11. Για το ίδιο το δείγμα θαλάσσιου νερού, πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:
- ημερομηνία συλλογής,
 - βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,
 - εμφάνιση του δείγματος, π.χ. θολό κ.λπ.,
 - θερμοκρασία κατά τον χρόνο συλλογής,
 - αλατότητα,
 - DOC,
 - χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή.
12. Εάν η περιεκτικότητα σε DOC του δείγματος θαλάσσιου νερού αποδειχθεί υψηλή (παράγραφος 8), συνιστάται το θαλάσσιο νερό να υφίσταται παλαίωση για περίπου μία εβδομάδα πριν από τη χρήση. Η παλαίωση πραγματοποιείται με τη φύλαξη του δείγματος κάτω από αερόβιες συνθήκες στη θερμοκρασία δοκιμής, είτε στο σκοτάδι είτε σε διάχυτο φως. Εάν είναι απαραίτητο, εφαρμόζεται ήπιος αερισμός για τη διατήρηση των αερόβιων συνθηκών. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, η περιεκτικότητα της ευκόλως αποικοδομήσιμης οργανικής ύλης μειώνεται. Στην κυκλική δοκιμή (3), δεν αποδείχθηκε καμία διαφορά μεταξύ του δυναμικού αποικοδόμησης των παλαιωμένων και προσφάτως συλλεγμένων δειγμάτων θαλάσσιου νερού. Πριν από τη χρήση του δείγματος, το θαλάσσιο νερό υποβάλλεται σε προκατεργασία για την αφαίρεση των χονδρόκοκκων σωματιδίων, π.χ. με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού (όχι μεμβράνη ή φίλτρα GF-C) ή μέσω καθίζησης και μετάγγισης. Πρέπει να αναφέρεται η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε. Σε περίπτωση παλαίωσης, η διαδικασία προκατεργασίας διεξάγεται μετά την παλαίωση.

Διαλύματα παρακαταθήκης για ανόργανα θρεπτικά συστατικά

13. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης, με χρήση αντιδραστηρίων αναλυτικής καθαρότητας:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| (α) Δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| Μονόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| Διένυδρο μονόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl | 0,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |
| (β) Χλωριούχο ασβέστιο, CaCl_2 | 27,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |
| (γ) Επταένυδρο θεικό μαγνήσιο, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |
| (δ) Εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |

Μπορεί να αποτραπεί ο σχηματισμός ιζήματος στο διάλυμα (δ) με την προσθήκη μίας σταγόνας συμπυκνωμένου HCl ή 0,4 g αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, δινάτριο άλας) ανά λίτρο. Εάν σχηματιστεί ίζημα στο διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα.

Παρασκευή του μέσου δοκιμής

14. Προστίθεται 1 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα παρακαταθήκης ανά λίτρο προκατεργασμένου θαλάσσιου νερού.

Εμβόλιο

15. Δεν προστίθεται ειδικό εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Προσδιορίζεται (προαιρετικά) στο μέσο δοκιμής του θαλάσσιου νερού ο αριθμός των ετεροτρόφων που σχηματίζουν αποικίες (και κατά προτίμηση και στα αρχικά δείγματα θαλάσσιου νερού), π.χ. μέσω μέτρησης της περιεκτικότητας σε μικρόβια (plate count), με χρήση του θρεπτικού υλικού Marine Agar. Αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό για δείγματα από παράκτιες ή μολυσμένες περιοχές. Ελέγχεται η ετεροτροφική μικροβιακή δραστηριότητα στο θαλάσσιο νερό με τη διεξαγωγή μιας δοκιμής με ουσία αναφοράς.

Προετοιμασία των φιαλών

16. Πριν από τη χρήση, όλα τα γυάλινα σκεύη πρέπει να καθαρίζονται πάρα πολύ καλά, όχι απαραίτητως να αποστειρώνονται (π.χ. με τη χρήση αλκοολικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος), να εκπλένονται και να στεγνώνονται για την αποφυγή μόλυνσης από κατάλοιπα προηγούμενων δοκιμών. Οι φιάλες πρέπει επίσης να καθαρίζονται πριν από την πρώτη χρήση.
17. Οι υπό δοκιμή ουσίες αξιολογούνται ταυτόχρονα σε διπλές φιάλες, μαζί με μία φιάλη για την ουσία αναφοράς. Διεξάγεται μια δοκιμή τυφλού, εις διπλούν, που δεν περιέχει ούτε υπό δοκιμή ουσία ούτε ουσία αναφοράς για τον καθορισμό των τυφλών δειγμάτων της ανάλυσης. Οι υπό δοκιμή ουσίες διαλύονται στο μέσο της δοκιμής. Η προσθήκη τους μπορεί να γίνει με πρακτικό τρόπο μέσω ενός συμπτυκνωμένου διαλύματος παρακαταθήκης για να επιτευχθούν οι επιθυμητές αρχικές συγκεντρώσεις, κατά κανόνα, των 5-40 mg DOC/l. Διεξάγεται δοκιμή της ουσίας αναφοράς, κατά κανόνα, σε αρχική συγκέντρωση των 20 mg DOC/l. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς, πρέπει να διασφαλίζεται ότι δεν τροποποιείται σημαντικά η αλατότητα του μέσου του θαλάσσιου νερού.
18. Εάν αναμένονται ή δεν μπορούν να αποκλειστούν τοξικές επιδράσεις, ίσως θα ήταν σκόπιμο να συμπεριληφθεί ένα πείραμα αναστολής, εις διπλούν, στον σχεδιασμό της δοκιμής. Η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς προστίθενται στο ίδιο δοχείο, ενώ η συγκέντρωση της ουσίας αναφοράς είναι συνήθως ίδια με αυτήν της δοκιμής-μάρτυρα (δηλ. 20 mg DOC/l) ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.
19. Κατανέμονται επαρκείς ποσότητες των διαλυμάτων δοκιμής στις φιάλες Erlenmeyer (μια πρακτική ποσότητα είναι περίπου το μισό του όγκου της φιάλης) και, στη συνέχεια, κάθε φιάλη καλύπτεται με ένα χαλαρό κάλυμμα (π.χ. αλουμινοχαρτό) ώστε να είναι δυνατή η ανταλλαγή αερίων μεταξύ της φιάλης και του αέρα του περιβάλλοντος. (Τα βύσματα από υαλοβάμβακα δεν είναι κατάλληλα εάν διεξάγεται ανάλυση DOC). Τα δοχεία τοποθετούνται στο τάρακτρο και ακολουθεί συνεχής και ήπια ανάδευση (π.χ. στις 100 σ.α.λ.) καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής. Απαιτείται έλεγχος της θερμοκρασίας (15-20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 2 °C) και προστασία των δοχείων από το φως για την αποφυγή ανάπτυξης φυκών. Πρέπει να διασφαλίζεται ότι ο αέρας είναι απαλλαγμένος από τοξικά υλικά.

Φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας (προαιρετική)

20. Εάν υπάρχει υποψία αβιοτικής αποικοδόμησης ή μηχανισμών απώλειας, όπως υδρόλυση (αποτελεί πρόβλημα μόνο για ειδική ανάλυση), πτητικότητα ή προσρόφηση, θα ήταν σκόπιμη η διεξαγωγή ενός φυσικοχημικού πειράματος ελέγχου. Αυτό μπορεί να διεξαχθεί με την προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου (II) (HgCl₂) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) στα δοχεία με την υπό δοκιμή ουσία, προκειμένου να διακοπεί η μικροβιακή δραστηριότητα. Μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του DOC ή της ειδικής ουσίας στη φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρα υποδεικνύει την παρουσία αβιοτικών μηχανισμών απομάκρυνσης. (Εάν χρησιμοποιείται χλωριούχος υδράργυρος, θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις αλληλεπιδράσεις ή στη δηλητηρίαση από καταλύτη κατά την ανάλυση DOC.)

Αριθμός φιαλών

21. Σε μια τυπική εκτέλεση, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Φιάλες 1 και 2 | — περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία (εναιώρημα δοκιμής), |
| Φιάλες 3 και 4 | — περιέχουν μόνο θαλάσσιο νερό (τυφλό), |
| Φιάλη 5 | — περιέχει την ουσία αναφοράς (μάρτυρας διαδικασίας), |
| Φιάλη 6 | — περιέχει την υπό δοκιμή ουσία και την ουσία αναφοράς (μάρτυρας τοξικότητας) — προαιρετική, |
| Φιάλη 7 | — περιέχει την υπό δοκιμή ουσία και τον φορέα αποστείρωσης (στείρος αβιοτικός μάρτυρας) — προαιρετική. |

Ανάλυση DOC

22. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα δείγματα αποσύρονται σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα για την ανάλυση DOC (προσάρτημα 1). Τα δείγματα πρέπει πάντα να λαμβάνονται κατά την έναρξη της δοκιμής (ημέρα 0) και την 60η ημέρα. Απαιτούνται συνολικά τουλάχιστον πέντε δείγματα για να περιγραφεί η χρονική πορεία της αποικοδόμησης. Δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί πάγιο χρονοδιάγραμμα για τη δειγματοληψία, δεδομένου ότι η ταχύτητα βιοαποικοδόμησης ποικίλλει. Ο προσδιορισμός DOC πρέπει να διεξάγεται εις διπλούν σε κάθε δείγμα.

⁽¹⁾ Ο χλωριούχος υδράργυρος (II) (HgCl₂) είναι μια πολύ τοξική ουσία και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό του. Τα υδατικά απόβλητα που περιέχουν την εν λόγω χημική ουσία θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα. Δεν θα πρέπει να απορρίπτονται στο σύστημα επεξεργασίας λυμάτων.

Δειγματοληψία

23. Ο απαιτούμενος όγκος των δειγμάτων εξαρτάται από την αναλυτική μέθοδο (ειδική ανάλυση), τον αναλυτή άνθρακα που χρησιμοποιείται και τη διαδικασία (διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση) που επιλέγεται για την κατεργασία των δειγμάτων πριν από τον προσδιορισμό του άνθρακα (παράγραφος 25 και 26). Πριν από τη δειγματοληψία, πρέπει να διασφαλίζεται η καλή ανάμειξη του μέσου δοκιμής και η διάλυση ή διασπορά τυχόν υλικού που έχει προσκολληθεί στο τοίχωμα της φιάλης.
24. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία διεξάγεται διήθηση με μεμβράνη ή φυγοκέντρηση. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα που έχουν υποστεί διήθηση ή φυγοκέντρηση φυλάσσονται στους 2-4 °C για έως 48 ώρες ή κάτω από τους -18°C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (εάν είναι γνωστό ότι η ουσία δεν θα επηρεαστεί, εκτελείται οξίνιση σε pH 2 πριν από τη φύλαξη).
25. Οι διηθητικές μεμβράνες (0,2-0,45 μm) θεωρούνται κατάλληλες, εφόσον εξασφαλίζεται ότι δεν ελευθερώνουν άνθρακα ούτε προσροφούν την ουσία στο στάδιο της διήθησης, π.χ. διηθητικές μεμβράνες πολυανθρακικών πολυμερών. Μερικές διηθητικές μεμβράνες είναι εμποτισμένες με επιφανειοδραστικές ουσίες για υδροφιλική και ενδέχεται να ελευθερώνουν σημαντικές ποσότητες διαλυμένου άνθρακα. Τα εν λόγω φίλτρα προετοιμάζονται με βρασμό σε απιονισμένο νερό για τρεις διαδοχικές χρονικές περιόδους, διάρκειας μιας ώρας η κάθε μία. Μετά τον βρασμό, τα φίλτρα φυλάσσονται σε απιονισμένο νερό. Τα πρώτα 20 ml του διηθήματος απορρίπτονται.
26. Μπορεί να διεξαχθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων ως εναλλακτική επιλογή της διήθησης μέσω μεμβράνης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε 40 000 m.s⁻² (~ 4 000 g) για 15 λεπτά, κατά προτίμηση σε καταψυχόμενο φυγόκεντρο.

Σημείωση: Η διαφοροποίηση του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) έναντι του DOC (TOC/DOC) μέσω φυγοκέντρησης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική, αφού είτε δεν απομακρύνονται όλα τα βακτήρια είτε ο άνθρακας ως μέρος του βακτηριακού πλάσματος επαναδιαλύεται. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής (> 10 mg C ανά λίτρο), το σφάλμα φυγοκέντρησης φαίνεται να είναι σχετικά μικρό.

Συχνότητα της δειγματοληψίας

27. Εάν οι αναλύσεις πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη δειγματοληψία, ο χρόνος μέχρι την επόμενη δειγματοληψία εκτιμάται λαμβάνοντας υπόψη το αποτέλεσμα του αναλυτικού προσδιορισμού.
28. Εάν τα δείγματα διατηρούνται (παράγραφος 24) ώστε να αναλυθούν κάποια άλλη στιγμή, πρέπει να λαμβάνεται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων από τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό των πέντε δειγμάτων. Πρέπει να αναλύονται τα τελευταία δείγματα πρώτα και, ακολουθώντας μια στρατηγική σταδιακής επιλογής “προς τα πίσω” των κατάλληλων δειγμάτων προς ανάλυση, είναι δυνατό να εξασφαλιστεί μια καλή περιγραφή της καμπύλης βιοαποικοδόμησης με σχετικά μικρό αριθμό αναλυτικών προσδιορισμών. Εάν δεν έχει πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση μέχρι το τέλος της δοκιμής, δεν χρειάζεται να αναλυθούν άλλα δείγματα και, σε αυτήν την περίπτωση, η στρατηγική της “προς τα πίσω” επιλογής ενδέχεται να εξοικονομήσει σημαντικές δαπάνες για αναλύσεις.
29. Εάν παρατηρηθεί φάση οριζόντιωσης (σταθερή κατάσταση) στην καμπύλη αποικοδόμησης πριν από την 60ή ημέρα, η δοκιμή τερματίζεται. Εάν η έναρξη της αποικοδόμησης είναι εμφανής μέχρι την 60ή ημέρα, αλλά δεν έχει επιτευχθεί φάση οριζόντιωσης, το πείραμα παρατείνεται για μεγαλύτερη χρονική περίοδο.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

30. Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στο συνημμένο φύλλο δεδομένων (προσάρτημα 2) και υπολογίζονται οι τιμές βιοαποικοδόμησης τόσο για την υπό δοκιμή ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς βάσει της εξίσωσης:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

όπου:

D_t = αποικοδόμηση σε ποσοστιαία απομάκρυνση DOC ή ειδικής ουσίας κατά τον χρόνο t ,

C_0 = αρχική συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο μέσο δοκιμής,

C_t = συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο μέσο δοκιμής κατά τον χρόνο t ,

$C_{bl(0)}$ = αρχική συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο τυφλό,

$C_{bl(t)}$ = συγκέντρωση του DOC ή της ειδικής ουσίας στο τυφλό κατά τον χρόνο t .

31. Η αποικοδόμηση αναφέρεται ως ποσοστιαία απομάκρυνση DOC (τελική αποικοδόμηση) ή ποσοστιαία απομάκρυνση ειδικής ουσίας (πρωτογενής αποικοδόμηση) κατά τον χρόνο t . Οι συγκεντρώσεις DOC υπολογίζονται με ακρίβεια 0,1 mg ανά λίτρο και οι μέσες τιμές των τιμών D_t στρογγυλοποιούνται στο πλησιέστερο ακέραιο ποσοστό.
32. Η πορεία της αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος, όπως εμφανίζεται στο σχήμα της ενότητας “Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων”. Εάν υπάρχουν επαρκή δεδομένα, υπολογίζονται από την καμπύλη η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης από το τέλος της λανθάνουσας φάσης (t_{50}).

Έκθεση δοκιμής

33. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,
- στοιχεία ταυτότητας.

Συνθήκες δοκιμής:

- τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας, κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών (αριθμός αποικιών, συγκέντρωση νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων, εάν απαιτείται),
- χαρακτηριστικά του δείγματος (ημερομηνία δειγματοληψίας, βάθος, εμφάνιση, θερμοκρασία, αλατότητα, DOC (προαιρετικό), χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή),
- μέθοδος που χρησιμοποιείται (κατά περίπτωση) για την παλαίωση του θαλάσσιου νερού,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προκατεργασία (φιλτράρισμα/καθίζηση) του θαλάσσιου νερού,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του DOC,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για ειδική ανάλυση (προαιρετική),
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των ετεροτρόφων στο θαλάσσιο νερό [μέθοδος μέτρησης της περιεκτικότητας σε βακτήρια (plate count) ή εναλλακτική διαδικασία] (προαιρετική),
- άλλες μέθοδοι (προαιρετικές) που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του θαλάσσιου νερού (μετρήσεις ATP κ.λπ.).

Αποτελέσματα:

- αναφορά αναλυτικών δεδομένων σε φύλλο δεδομένων (προσάρτημα 2),
- η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος όπου παρουσιάζεται η λανθάνουσα φάση (t_L), η κλίση και ο χρόνος (ξεκινώντας από το τέλος της λανθάνουσας φάσης) μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης (t_{50}). Η λανθάνουσα φάση μπορεί να εκτιμηθεί γραφικά όπως εμφανίζεται στο σχήμα της ενότητας “Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων” ή μπορεί να θεωρηθεί ευκόλως ως ο χρόνος που απαιτείται για αποικοδόμηση της τάξεως του 10 τοις εκατό,
- ποσοστιαία αποικοδόμηση μετρηθείσα μετά από 60 ημέρες ή στο τέλος της δοκιμής.

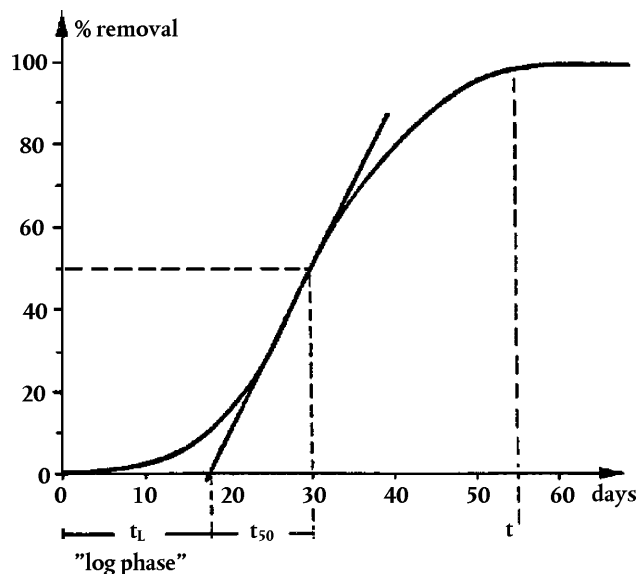
Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

34. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς, π.χ. βενζοϊκό νάτριο, οξικό νάτριο ή ανιλίνη, αναμένεται ότι θα είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στην κυκλική δοκιμή (3) (ανατρέξτε στην ενότητα “Ουσίες αναφοράς”, παράγραφος 7). Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς είναι ασυνήθιστα, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού. Παρότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών αναστολής μπορεί να μην είναι πάντα μια απλή διαδικασία λόγω της συνεισφοράς σε DOC από την υπό δοκιμή ουσία, μια σημαντική μείωση του συνολικού ρυθμού απομάκρυνσης DOC, σε σύγκριση με αυτόν του μάρτυρα, αποτελεί θετικό σημάδι τοξικών επιδράσεων.

35. Λόγω των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων δοκιμής που χρησιμοποιούνται σε σχέση με τα περισσότερα φυσικά συστήματα (και κατά συνέπεια της δυσμενούς αναλογίας μεταξύ των συγκεντρώσεων των υπό δοκιμή ουσιών και άλλων πηγών άνθρακα), η μέθοδος πρέπει να θεωρείται μια προκαταρκτική δοκιμή που μπορεί να χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν μια ουσία είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμη ή όχι. Αντίστοιχα, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητως ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη στα θαλάσσια περιβάλλοντα, αλλά υποδεικνύει ότι χρειάζεται περισσότερη εργασία προκειμένου να αποδειχθεί αυτό.

Στο παρακάτω σχήμα παρέχεται ένα παράδειγμα ενός πειράματος θεωρητικής αποικοδόμησης όπου απεικονίζεται ένας εφικτός τρόπος εκτίμησης της τιμής t_L (διάρκεια της "λανθάνουσας φάσης") και της τιμής t_{50} (διάστημα χρόνου, ξεκινώντας από t_L) που απαιτείται για να επιτευχθεί απομάκρυνση 50 τοις εκατό.



ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή σε θαλάσσιο νερό της δοκιμής κλειστής φιάλης (5) και οριστικοποιήθηκε μετά από μια κυκλική δοκιμή που οργανώθηκε για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή από το Water Quality Institute της Δανίας (3).
2. Από κοινού με την αντίστοιχη θαλάσσια μέθοδο ανακινούμενης φιάλης, τα αποτελέσματα από αυτήν τη δοκιμή δεν πρέπει να θεωρούνται ενδείξεις άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα ουσιών σε θαλάσσια περιβάλλοντα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3. Μια προκαθορισμένη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας διαλύεται στο μέσο δοκιμής συνήθως σε συγκέντρωση 2-10 mg υπό δοκιμή ουσίας ανά λίτρο (μπορούν να χρησιμοποιούνται μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις). Το διάλυμα διατηρείται σε μια γεμάτη κλειστή φιάλη στο σκοτάδι, εντός ενός λουτρού ή θαλάμου σταθερής θερμοκρασίας, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20 °C με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από ± 1 °C. Σε περιπτώσεις όπου ο στόχος της μελέτης είναι η προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών, οι δοκιμές μπορούν να διεξάγονται εκτός αυτού του συνήθους εύρους θερμοκρασίας, υπό την προϋπόθεση ότι πραγματοποιούνται κατάλληλες ρυθμίσεις για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Μετά την αποικοδόμηση διεξάγονται αναλύσεις οξυγόνου κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου 28 ημερών.
4. Από την κυκλική δοκιμή διαπιστώθηκε ότι εάν η δοκιμή παραταθεί πέραν των 28 ημερών, δεν είναι δυνατή η συλλογή χρήσιμων πληροφοριών, στις περισσότερες περιπτώσεις, λόγω σοβαρών παρεμβολών. Οι τιμές του βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) του τυφλού ήταν υπερβολικά υψηλές, πιθανώς λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων στο τοίχωμα που προκλήθηκε από την έλλειψη ανάδευσης, καθώς και της νιτροποίησης. Επομένως, η συνιστώμενη διάρκεια είναι 28 ημέρες, αλλά εάν η τιμή BOD του τυφλού διατηρείται εντός του ορίου του 30 τοις εκατό (παράγραφοι 15 και 40) η δοκιμή μπορεί να παραταθεί.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

5. Για να διαπιστωθεί εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί σε μια συγκεκριμένη ουσία, πρέπει να είναι γνωστές κάποιες ιδιότητες της ουσίας. Προκειμένου να υπολογιστεί το θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) απαιτείται ο εμπειρικός τύπος (βλ. προσάρτημα 3). Διαφορετικά, πρέπει να προσδιοριστεί το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) της ουσίας ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αναφοράς. Η χρήση του COD είναι λιγότερο ικανοποιητική επειδή μερικές ουσίες δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή COD.
6. Η διαλυτότητα της ουσίας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2 mg/l. Ωστόσο, κατ' αρχήν, μπορούν να υποβάλλονται σε δοκιμή λιγότερο διαλυτές ουσίες (π.χ. με κατεργασία με υπερήχους), καθώς και πτητικές ουσίες. Για την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν αυτά είναι οριακά, απαιτούνται στοιχεία για την καθαρότητα ή τις σχετικές αναλογίες των βασικών συστατικών της υπό δοκιμή ουσίας.
7. Οι πληροφορίες που αφορούν την τοξικότητα της ουσίας για βακτήρια, π.χ. σύμφωνα με μετρήσεις βραχυχρόνιων δοκιμών αναπνοής (4), μπορεί να είναι χρήσιμες κατά την επιλογή κατάλληλων συγκεντρώσεων δοκιμής και να έχουν ουσιαστική σημασία για την ορθή ερμηνεία χαμηλών τιμών βιοαποικοδόμησης. Ωστόσο, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής βιοαποικοδόμησης, δεν επαρκούν πάντα οι εν λόγω πληροφορίες και η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 27 είναι καταλληλότερη.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

8. Για τον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας του δείγματος θαλάσσιου νερού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες ουσίες αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιούνται (για παράδειγμα) η ανιλίνη, το οξικό νάτριο ή το βενζοϊκό νάτριο. Οι ουσίες αυτές πρέπει να αποικοδομούνται κατά τουλάχιστον 60 τοις εκατό (του ThOD τους) σε ένα ευλόγως σύντομο χρονικό διάστημα, διαφορετικά συνιστάται να επαναλαμβάνεται η δοκιμή με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.
9. Στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής όπου τα δείγματα θαλάσσιου νερού ελήφθησαν από διαφορετικές τοποθεσίες και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέσα στο έτος, η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος για να επιτευχθεί αποικοδόμηση κατά 50 τοις εκατό (t_{50}), μη συμπεριλαμβανομένης της λανθάνουσας φάσης, ήταν 0 έως 2 ημέρες και 1 έως 4 ημέρες αντίστοιχα για το βενζοϊκό νάτριο. Για την ανιλίνη, οι τιμές t_L και t_{50} ήταν 0 έως 7 και 2 έως 12 ημέρες αντίστοιχα.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

10. Η αναπαραγωγιμότητα των μεθόδων καθορίστηκε στην κυκλική δοκιμή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (3).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Συσκευές

11. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και τα εξής:
 - (α) Μπορούν να χρησιμοποιούνται φιάλες BOD των 250-300 ml με γυάλινα πώματα ή φιάλη με στενό στόμιο των 250 ml με γυάλινα πώματα,
 - (β) Μερικές φιάλες των 2-, 3- και 4- λίτρων με ενδείξεις που αντιστοιχούν στα λίτρα για τις διαδικασίες προετοιμασίας του πειράματος και για την πλήρωση των φιαλών BOD,
 - (γ) Υδατόλουτρο ή θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας για να διατηρούνται οι φιάλες σε σταθερή θερμοκρασία ($\pm 1^\circ$ C) μακριά από το φως.
 - (δ) Εξοπλισμός για την ανάλυση του διαλυμένου οξυγόνου,
 - (ε) Διηθητικές μεμβράνες, 0,2-0,45 μ m (προαιρετικές),
 - (στ) Εξοπλισμός για ειδική ανάλυση (προαιρετικός).

Θαλάσσιο νερό

12. Συλλέγεται ένα δείγμα θαλάσσιου νερού μέσα σε έναν επιμελώς καθαρισμένο περιέκτη, ο οποίος μεταφέρεται στο εργαστήριο, κατά προτίμηση εντός μίας ή δύο ημερών από τη συλλογή. Κατά τη μεταφορά, η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει σε σημαντικό βαθμό τη θερμοκρασία που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή.
13. Η τοποθεσία δειγματοληψίας προσδιορίζεται με ακρίβεια και περιγράφεται όσον αφορά την κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών της. Ειδικά για παράκτια ή μολυσμένα ύδατα, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στον εν λόγω χαρακτηρισμό ο αριθμός των ετερότροφων μικροβιακών αποικιών και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων διαλυμένων νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων.
14. Για το ίδιο το δείγμα θαλάσσιου νερού, πρέπει να παρέχονται οι ακόλουθες πληροφορίες:
- ημερομηνία συλλογής,
 - βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα,
 - εμφάνιση του δείγματος, π.χ. θολό κ.λπ.,
 - θερμοκρασία κατά τον χρόνο συλλογής,
 - αλατότητα,
 - διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC),
 - χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή.
15. Εάν η περιεκτικότητα σε DOC του δείγματος αποδειχθεί υψηλή ή εάν θεωρηθεί ότι η τιμή BOD του τυφλού μετά από 28 ημέρες θα είναι μεγαλύτερη από το 30 τοις εκατό σε σχέση με αυτήν των ουσιών αναφοράς, συνιστάται η παλαίωση του θαλάσσιου νερού για περίπου μία εβδομάδα πριν από τη χρήση.
16. Η παλαίωση του δείγματος πραγματοποιείται με τη φύλαξη του κάτω από αερόβιες συνθήκες στη θερμοκρασία δοκιμής, είτε στο σκοτάδι είτε σε διάχυτο φως. Εάν είναι απαραίτητο, εφαρμόζεται ήπιος αερισμός για τη διατήρηση των αερόβιων συνθηκών. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, η περιεκτικότητα της ευκόλως αποικοδομήσιμης οργανικής ύλης μειώνεται. Στην κυκλική δοκιμή (3), δεν αποδείχθηκε καμία διαφορά μεταξύ του δυναμικού αποικοδόμησης των παλαιωμένων και προσφάτως συλλεγμένων δειγμάτων θαλάσσιου νερού.
17. Πριν από τη χρήση του δείγματος, το θαλάσσιο νερό υποβάλλεται σε προκατεργασία για την αφαίρεση των χονδρόκοκκων σωματιδίων, π.χ. με διήθηση μέσω ηθμού νάιλον ή μέσω αδρού χάρτινου ηθμού (όχι μεμβράνη ή φίλτρα GF-C) ή μέσω καθίζησης και μετάγγισης. Πρέπει να αναφέρεται η διαδικασία που χρησιμοποιείται. Σε περίπτωση παλαίωσης, η διαδικασία προκατεργασίας διεξάγεται μετά την παλαίωση.

Διαλύματα παρακαταθήκης για ανόργανα θρεπτικά συστατικά

18. Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα παρακαταθήκης, με χρήση αντιδραστηρίων αναλυτικής καθαρότητας:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| (α) Δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| Μονόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| Διένυδρο μονόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| Χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl | 0,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |
| (β) Χλωριούχο ασβέστιο, CaCl_2 | 27,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |

- | | |
|--------------------------------------------------------------|---------|
| (γ) Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22,50 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |
| (δ) Εξάνυδρος χλωριούχος σίδηρος (III), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,25 g |
| Διαλύεται σε όγκο 1 λίτρου με απεσταγμένο νερό. | |

Μπορεί να αποτραπεί ο σχηματισμός ιζήματος στο διάλυμα (δ) με την προσθήκη μίας σταγόνας συμπυκνωμένου HCl ή 0,4 g αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA, δινάτριο άλας) ανά λίτρο. Εάν σχηματιστεί ίζημα στο διάλυμα παρακαταθήκης, παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα.

Παρασκευή του μέσου δοκιμής

19. Προστίθεται 1 ml από κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα παρακαταθήκης ανά λίτρο προκατεργασμένου θαλάσσιου νερού. Εκτελείται κορεσμός του μέσου δοκιμής με αέρα στη θερμοκρασία δοκιμής μέσω αερισμού με καθαρό πεπιεσμένο αέρα για περίπου 20 λεπτά. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου για να χρησιμεύσει σαν μάρτυρας. Η κορεσμένη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου σε συνάρτηση με την αλατότητα και τη θερμοκρασία μπορεί να προσδιοριστεί από το νομόγραμμα που εσωκλείεται σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών (προσάρτημα 4).

Εμβόλιο

20. Δεν προστίθεται ειδικό εμβόλιο επιπλέον των μικροοργανισμών που υπάρχουν ήδη στο θαλάσσιο νερό. Προσδιορίζεται (προαιρετικά) στο μέσο δοκιμής του θαλάσσιου νερού ο αριθμός των ετεροτρόφων που σχηματίζουν αποικίες (και κατά προτίμηση, και στο αρχικό δείγμα θαλάσσιου νερού) π.χ. μέσω μέτρησης της περιεκτικότητας σε μικρόβια (plate count), με χρήση του θρεπτικού υλικού Marine Agar. Αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό για δείγματα από παράκτιες ή μολυσμένες περιοχές. Ελέγχεται η ετεροτροφική μικροβιακή δραστηριότητα στο θαλάσσιο νερό με τη διεξαγωγή μιας δοκιμής με ουσία αναφοράς.

Παρασκευή των φιαλών δοκιμής

21. Πραγματοποιούνται όλες οι απαραίτητες διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της παλαιώσης και της προκατεργασίας του θαλάσσιου νερού στην επιλεγμένη θερμοκρασία δοκιμής μεταξύ 15 και 20 °C, ενώ εξασφαλίζεται η καθαρότητα, αλλά όχι η στεριότητα, όλων των γυάλινων σκευών.
22. Ετοιμάζονται ομάδες φιαλών BOD για τον προσδιορισμό του BOD της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε ταυτόχρονες πειραματικές σειρές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε διπλές φιάλες (τυφλά, ουσία αναφοράς και υπό δοκιμή ουσία), δηλ. ετοιμάζονται δύο φιάλες για κάθε προσδιορισμό. Οι αναλύσεις εκτελούνται τουλάχιστον τις ημέρες 0, 5, 15 και 28 (τέσσερις προσδιορισμοί). Για τις αναλύσεις οξυγόνου, οι τέσσερις προσδιορισμοί απαιτούν συνολικά $3 \times 2 \times 4 = 24$ φιάλες (τυφλό, ουσία αναφοράς και υπό δοκιμή ουσία) και συνεπώς περίπου 8 λίτρα μέσου δοκιμής (για μία συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας).
23. Παρασκευάζονται ξεχωριστά διαλύματα της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς σε μεγάλες φιάλες επαρκούς όγκου (παράγραφος 11), με αρχική προσθήκη στις μεγάλες φιάλες που είναι μερικώς γεμάτες της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς είτε απευθείας είτε με τη χρήση συμπυκνωμένου διαλύματος παρακαταθήκης. Προστίθεται περαιτέρω μέσο δοκιμής για να επιτευχθούν οι τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς, πρέπει να διασφαλίζεται ότι δεν τροποποιείται σημαντικά η αλατότητα του μέσου του θαλάσσιου νερού.
24. Οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των εξής:
 - (α) διαλυτότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο θαλάσσιο νερό στην επικρατούσα θερμοκρασία και αλατότητα της δοκιμής (βλ. το νομόγραμμα που εσωκλείεται, - προσάρτημα 4),
 - (β) BOD του τυφλού για το θαλάσσιο νερό και
 - (γ) αναμενόμενη βιοαποικοδομησιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας.
25. Στους 15 °C και στους 20 °C και με αλατότητα 32 τοις χιλίοις (ωκεάνιο νερό), η διαλυτότητα του διαλυμένου οξυγόνου είναι περίπου 8,1 και 7,4 mg/l αντίστοιχα. Η κατανάλωση οξυγόνου του ίδιου του θαλάσσιου νερού (αναπνοή τυφλού) μπορεί να είναι 2 mg O_2 /l ή μεγαλύτερη, εάν το θαλάσσιο νερό δεν είναι παλαιωμένο. Επομένως, προκειμένου να εξασφαλίζεται ότι η συγκέντρωση οξυγόνου που θα απομένει μετά την οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας θα είναι σημαντική, χρησιμοποιείται αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας περίπου 2-3 mg/l (ανάλογα με το ThOD) για τις ουσίες που αναμένεται ότι θα αποικοδομηθούν πλήρως υπό τις συνθήκες της δοκιμής (όπως οι ουσίες αναφοράς). Οι λιγότερο αποικοδομησιμες ουσίες ελέγχονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, έως περίπου 10 mg/l, με την προϋπόθεση ότι δεν προκύπτουν τοξικές επιδράσεις. Θα ήταν σκόπιμο να εκτελούνται παράλληλες δοκιμές με μια χαμηλή (περίπου 2 mg/l) και μια υψηλή (περίπου 10 mg/l) συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας.

26. Πρέπει να προσδιορίζεται παράλληλα και ένα τυφλό οξυγόνου σε φιάλες χωρίς υπό δοκιμή ουσία ή ουσία αναφοράς.
27. Εάν πρόκειται να προσδιοριστούν ανασταλτικές επιδράσεις, προετοιμάστε τις ακόλουθες σειρές διαλυμάτων σε ξεχωριστές μεγάλες φιάλες (παράγραφος 13):
- (α) 2 mg ανά λίτρο μιας εύκολα αποικοδομήσιμης ουσίας, π.χ. οποιαδήποτε από τις αναφερόμενες ουσίες αναφοράς,
 - (β) x mg ανά λίτρο της υπό δοκιμή ουσίας (το x συνήθως είναι 2),
 - (γ) 2 mg ανά λίτρο της εύκολα αποικοδομήσιμης ουσίας συν x mg ανά λίτρο της υπό δοκιμή ουσίας.

Φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας (προαιρετική)

28. Εάν χρησιμοποιείται η επιλογή των ειδικών αναλύσεων, μπορεί να διεξαχθεί ένα φυσικοχημικό πείραμα προκειμένου να ελεγχθεί εάν η υπό δοκιμή ουσία απομακρύνεται μέσω αβιοτικών μηχανισμών, όπως υδρόλυση ή προσρόφηση. Μια φυσικοχημική δοκιμή-μάρτυρας μπορεί να διεξαχθεί με την προσθήκη χλωριούχου υδραργύρου (II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) σε διπλές φιάλες με την υπό δοκιμή ουσία, προκειμένου να διακοπεί η μικροβιακή δραστηριότητα. Μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της ειδικής ουσίας κατά την πορεία της δοκιμής υποδεικνύει την παρουσία αβιοτικών μηχανισμών απομάκρυνσης.

Αριθμός φιαλών BOD σε μια τυπική εκτέλεση

29. Σε μια τυπική εκτέλεση, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες φιάλες:
- τουλάχιστον 8 που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία,
 - τουλάχιστον 8 που περιέχουν μόνο θαλάσσιο νερό ενισχυμένο με θρεπτικά συστατικά,
 - τουλάχιστον 8 που περιέχουν την ουσία αναφοράς, και όταν απαιτείται
 - 6 φιάλες που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία και την ουσία αναφοράς (μάρτυρας τοξικότητας).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

30. Μετά την παρασκευή, κάθε διάλυμα μεταφέρεται αμέσως με σιφόνιο που ξεκινά από το κατώτερο τέταρτο (όχι από τον πυθμένα) της κατάλληλης μεγάλης φιάλης, έτσι ώστε να πληρωθούν οι φιάλες BOD της αντίστοιχης ομάδας. Οι μηδενικοί μάρτυρες (χρόνος μηδέν) αναλύονται αμέσως ως προς το διαλυμένο οξυγόνο (παράγραφος 33) ή διατηρούνται για μετέπειτα χημική ανάλυση μέσω καθίζησης με MnCl_2 (χλωριούχο μαγγάνιο (II)) και NaOH (υδροξείδιο του νατρίου).
31. Οι υπόλοιπες παράλληλες φιάλες BOD επωάζονται στη θερμοκρασία δοκιμής (15-20 °C), διατηρούνται στο σκοτάδι, απομακρύνονται από τον θάλαμο επώασης σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα (π.χ. μετά από 5, 15 και 28 ημέρες τουλάχιστον) και αναλύονται ως προς το διαλυμένο οξυγόνο (παράγραφος 33).
32. Τα δείγματα για ειδικές αναλύσεις (προαιρετικές) διηθούνται μέσω μεμβρανών (0,2-0,45 μm) ή φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά. Εάν τα δείγματα δεν αναλυθούν αμέσως, φυλάσσονται για έως 48 ώρες στους 2-4 °C ή για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους στους - 18°C (εάν είναι γνωστό ότι δεν θα επηρεαστεί η υπό δοκιμή ουσία, εκτελείται οξίνιση σε pH 2 πριν από τη φύλαξη).

Προσδιορισμός διαλυμένου οξυγόνου

33. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου με τη χρήση χημικής ή ηλεκτροχημικής μεθόδου, η οποία είναι αναγνωρισμένη σε εθνικό ή διεθνές επίπεδο.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

34. Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στα συνημμένα φύλλα δεδομένων (προσάρτημα 5).

⁽¹⁾ Ο χλωριούχος υδράργυρος (II) (HgCl_2) είναι μια πολύ τοξική ουσία και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό του. Τα υδατικά απόβλητα που περιέχουν την εν λόγω χημική ουσία θα πρέπει να απορρίπτονται κατάλληλα. Δεν θα πρέπει να απορρίπτονται απευθείας στο σύστημα επεξεργασίας λυμάτων.

35. Υπολογίζεται το BOD ως διαφορά της ελάττωσης του οξυγόνου μεταξύ του τυφλού και ενός διαλύματος της υπό δοκιμή ουσίας κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής. Η καθαρή ελάττωση του οξυγόνου διαιρείται με τη συγκέντρωση (w/v) της ουσίας προκειμένου να εκφραστεί το BOD ως mg BOD/mg υπό δοκιμή ουσίας. Η αποικοδόμηση ορίζεται ως ο λόγος του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου, κατά προτίμηση, προς το θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (ThOD) ή προς το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) και εκφράζεται ως ποσοστό (βλ. παράγραφο 36).
36. Υπολογίζονται οι τιμές βιοαποικοδόμησης για κάθε χρόνο δειγματοληψίας τόσο για την υπό δοκιμή ουσία όσο και για την ουσία αναφοράς με χρήση μίας από τις δύο εξισώσεις:

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg O}_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg ThOD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg O}_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg COD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

όπου:

ThOD = θεωρητικά απαιτούμενο οξυγόνο (υπολογισμός, προσάρτημα 3)

COD = χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, προσδιορίζεται πειραματικά.

Σημείωση: Μερικές φορές οι δύο τρόποι υπολογισμού (ποσοστό του ThOD ή ποσοστό του COD) δεν δίνουν τα ίδια αποτελέσματα. Προτιμάται η χρήση του ThOD, επειδή μερικές ουσίες δεν οξειδώνονται πλήρως στη δοκιμή COD.

37. Η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος (βλ. παράδειγμα στην ενότητα "Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων"). Εάν υπάρχουν επαρκή δεδομένα, υπολογίζονται από την καμπύλη βιοαποικοδόμησης η λανθάνουσα φάση (t_L) και ο χρόνος (t_{50}) μέχρι την επίτευξη 50 τοις εκατό απομάκρυνσης από το τέλος της λανθάνουσας φάσης.
38. Εάν χρησιμοποιείται ειδική ανάλυση (προαιρετική), αναφέρεται το ποσοστό της πρωτογενούς αποικοδόμησης ως το ποσοστό απομάκρυνσης της ειδικής ουσίας εντός της περιόδου δοκιμής (διορθωμένο λαμβανομένων υπόψη των τυφλών δειγμάτων της ανάλυσης).

Έκθεση δοκιμής

39. Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες,
- στοιχεία ταυτότητας.

Συνθήκες δοκιμής:

- τοποθεσία και περιγραφή του σημείου δειγματοληψίας: κατάσταση ρύπανσης και θρεπτικών συστατικών (αριθμός αποικιών, συγκέντρωση νιτρικών, αμμωνιακών και φωσφορικών ιόντων, εάν απαιτείται),
- χαρακτηριστικά του δείγματος (ημερομηνία δειγματοληψίας, βάθος, εμφάνιση, θερμοκρασία, αλατότητα, DOC (προαιρετικό), χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της συλλογής και της χρήσης του δείγματος στη δοκιμή),
- μέθοδος που χρησιμοποιείται (κατά περίπτωση) για την παλαιώση του θαλάσσιου νερού,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προκατεργασία (φιλτράρισμα/καθίζηση) του θαλάσσιου νερού,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του COD (εάν διεξάγεται),
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις οξυγόνου,
- διαδικασία διασποράς για ουσίες που είναι δυσδιάλυτες κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής,
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των ετεροτρόφων στο θαλάσσιο νερό (μέθοδος μέτρησης της περιεκτικότητας σε βακτήρια (plate count) ή εναλλακτική διαδικασία),

- μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του DOC σε θαλάσσιο νερό (προαιρετική),
- μέθοδος που χρησιμοποιείται για ειδική ανάλυση (προαιρετική),
- άλλες προαιρετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό του θαλάσσιου νερού (μετρήσεις ATP κ.λπ.).

Αποτελέσματα:

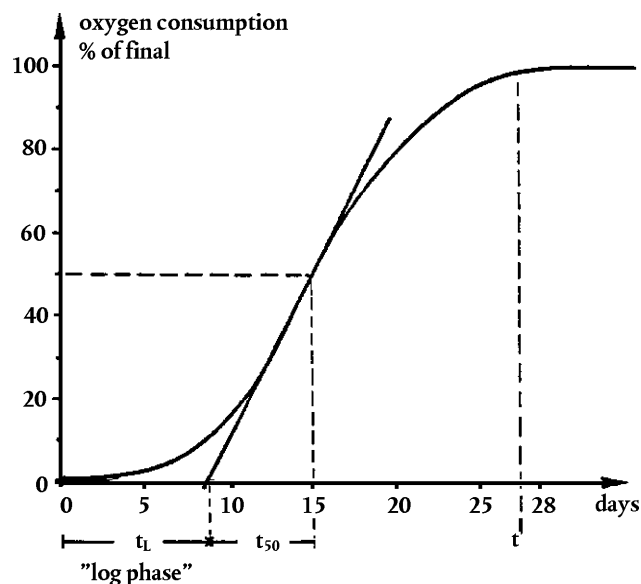
- αναφορά αναλυτικών δεδομένων σε φύλλο δεδομένων (σύμφωνα με το συνημμένο, προσάρτημα 5),
- η πορεία της δοκιμής αποικοδόμησης απεικονίζεται γραφικά σε μορφή διαγράμματος όπου παρουσιάζεται η λανθάνουσα φάση (t_L), η κλίση και ο χρόνος (ξεκινώντας από το τέλος της λανθάνουσας φάσης) μέχρι την επίτευξη του 50 τοις εκατό της τελικής πρόσληψης οξυγόνου που οφείλεται στην οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας (t_{50}). Η λανθάνουσα φάση μπορεί να εκτιμηθεί γραφικά όπως εμφανίζεται στο συνημμένο σχήμα ή μπορεί να θεωρηθεί ευκόλως ως ο χρόνος που απαιτείται για αποικοδόμηση της τάξεως του 10 τοις εκατό,
- ποσοστιαία αποικοδόμηση, μετρούμενη μετά από 28 ημέρες.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Εγκυρότητα και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

40. Η αναπνοή του τυφλού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30 τοις εκατό του οξυγόνου στη φιάλη δοκιμής. Εάν δεν είναι εφικτή η ικανοποίηση αυτού του κριτηρίου με χρήση προσφάτως συλλεγμένου θαλάσσιου νερού, το θαλάσσιο νερό πρέπει να υποστεί παλαιώση (σταθεροποίηση) πριν από τη χρήση.
41. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα να επηρεαστούν τα αποτελέσματα από ουσίες που περιέχουν άζωτο.
42. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς, βενζοϊκό νάτριο και ανιλίνη, αναμένεται να είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την κυκλική δοκιμή (3) (παράγραφος 9). Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις ουσίες αναφοράς είναι ασυνήθιστα, η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με χρήση άλλου δείγματος θαλάσσιου νερού.
43. Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να θεωρείται ότι ασκεί ανασταλτική δράση στα βακτήρια (στη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση), εάν το BOD του μείγματος της ουσίας αναφοράς και της υπό δοκιμή ουσίας είναι χαμηλότερο από το άθροισμα των BOD των ξεχωριστών διαλυμάτων των δύο ουσιών.
44. Λόγω των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων δοκιμής σε σχέση με τα περισσότερα φυσικά συστήματα, και κατά συνέπεια της δυσμενούς αναλογίας μεταξύ των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας και άλλων πηγών άνθρακα, η μέθοδος πρέπει να θεωρείται μια προκαταρκτική δοκιμή που μπορεί να χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν μια ουσία είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμη ή όχι. Αντίστοιχα, ένα χαμηλό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητως ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη στα θαλάσσια περιβάλλοντα, αλλά υποδεικνύει ότι χρειάζεται περισσότερη εργασία προκειμένου να αποδειχθεί αυτό.

Παρακάτω παρέχεται ένα παράδειγμα ενός πειράματος θεωρητικής αποικοδόμησης όπου απεικονίζεται ένας εφικτός τρόπος εκτίμησης της τιμής t_L (διάρκεια της “λανθάνουσας φάσης”) και της τιμής t_{50} , διάστημα χρόνου (ξεκινώντας από t_L) που απαιτείται για να επιτευχθεί το 50 % της τελικής πρόσληψης οξυγόνου που οφείλεται στην οξείδωση της υπό δοκιμή ουσίας:



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) de Kreuk J.F. και Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6), 561-573.
 - (2) Κεφάλαιο Γ.4-B του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός “άμεσης” βιοαποικοδομησιμότητας, Μέρος III, τροποποιημένη δοκιμή διαλογής του ΟΟΣΑ
 - (3) Nyholm N. και Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984–1985, Μάρτιος 1987, Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.
 - (4) Κεφάλαιο Γ.11 του παρόντος παραρτήματος: Βιοαποικοδόμηση — Δοκιμή αναστολής αναπνοής ενεργοποιημένης ιλύος.
 - (5) Κεφάλαιο Γ.4-E του παρόντος παραρτήματος: Προσδιορισμός “άμεσης” βιοαποικοδομησιμότητας, Μέρος VI. Δοκιμή κλειστής φιάλης.
-

Προσάρτημα 1

Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

Για τον προσδιορισμό του οργανικού άνθρακα ενός δείγματος νερού, οι οργανικές ενώσεις στο δείγμα οξειδώνονται προς διοξείδιο του άνθρακα μέσω γενικά μίας από τις ακόλουθες τρεις τεχνικές:

- υγρή οξείδωση μέσω υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας,
- υγρή οξείδωση μέσω υπερθειικού/αυξημένης θερμοκρασίας (116-130 °C),
- καύση.

Το εκλυόμενο CO₂ προσδιορίζεται ποσοτικά με την εφαρμογή υπέρυθρης φασματομετρίας ή ογκομετρίας. Εναλλακτικά, το CO₂ ανάγεται σε μεθάνιο, το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά σε ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).

Η μέθοδος υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση “καθαρού” νερού με χαμηλή περιεκτικότητα σε σωματίδια. Οι τελευταίες δύο μέθοδοι μπορούν να εφαρμόζονται στα περισσότερα είδη δειγμάτων νερού, με τη μέθοδο οξείδωσης μέσω υπερθειικού/αυξημένης θερμοκρασίας να είναι καταλληλότερη για δείγματα χαμηλού επιπέδου και την τεχνική καύσης να μπορεί να εφαρμοστεί για δείγματα με περιεκτικότητα σε μη πτητικό οργανικό άνθρακα (NVOC) πολύ πάνω από 1 mg C/l.

Παρεμβολές

Και οι τρεις μέθοδοι εξαρτώνται από την απομάκρυνση ή την αναπλήρωση του ανόργανου άνθρακα (IC) που υπάρχει στο δείγμα. Ο καθαρισμός του CO₂ από το δείγμα που έχει υποστεί οξίνιση αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την απομάκρυνση του IC. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει ως αποτέλεσμα και την απώλεια πτητικών οργανικών ενώσεων (1). Η πλήρης απομάκρυνση ή αναπλήρωση του IC πρέπει να εξασφαλίζεται για κάθε μήτρα δείγματος, ενώ πρέπει να προσδιορίζεται ο πτητικός οργανικός άνθρακας (VOC) επιπλέον του NVOC ανάλογα με τον τύπο του δείγματος.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις χλωριδίων έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα της οξείδωσης με τη μέθοδο υπερθειικού/UV (2). Η εφαρμογή ενός οξειδωτικού αντιδραστήριου τροποποιημένου με την προσθήκη νιτρικού υδραργύρου (II) ενδέχεται, ωστόσο, να απομακρύνει αυτή την παρεμβολή. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ο μέγιστος ανεκτός όγκος δείγματος για την αξιολόγηση κάθε τύπου δείγματος που περιέχει χλωριούχα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στο δείγμα που αναλύεται με τη μέθοδο καύσης μπορεί να προκαλέσουν επικάλυψη του καταλύτη με άλατα και υπερβολική διάβρωση του σωλήνα καύσης. Θα πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις σύμφωνα με το εγχειρίδιο του παρασκευαστή.

Δείγματα υψηλής θολερότητας, καθώς και δείγματα που περιέχουν σωματίδια, ενδέχεται να οξειδωθούν ατελώς όταν εφαρμόζεται η μέθοδος υπερθειικού/UV.

Παράδειγμα κατάλληλης μεθόδου

Ο μη πτητικός οργανικός άνθρακας προσδιορίζεται μέσω οξείδωσης με τη μέθοδο υπερθειικού/υπεριώδους ακτινοβολίας και επακόλουθο ποσοτικό προσδιορισμό του εκλυόμενου CO₂ με την εφαρμογή υπέρυθρης φασματομετρίας χωρίς διάχυση.

Το αντιδραστήριο οξείδωσης τροποποιείται σύμφωνα με τις υποδείξεις που δίνονται στο σημείο (2), όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο του παρασκευαστή:

- α) 8,2 g HgCl₂ και 9,6 g Hg(NO₃)₂ · H₂O διαλύονται σε μερικές εκατοντάδες χιλιοστόλιτρα νερού αντίδρασης χαμηλής συγκέντρωσης σε άνθρακα.
- β) 20 g K₂S₂O₈ διαλύονται στο διάλυμα υδραργυρικού αλάτος.
- γ) 5 ml HNO₃ (πυκνό) προστίθενται στο μείγμα.
- δ) το αντιδραστήριο διαλύεται στα 1 000 ml.

Η παρεμβολή από το χλωρίδιο απομακρύνεται με τη χρήση όγκου δείγματος 40 μl για το 10 τοις εκατό του χλωριδίου και όγκου δείγματος 200 μl για το 1,9 τοις εκατό του χλωριδίου. Δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις σε χλωρίδιο ή/και μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος μπορούν να αναλύονται σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, με την προϋπόθεση ότι αποτρέπεται η συσσώρευση χλωριδίων στο δοχείο οξείδωσης. Στη συνέχεια, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του πτητικού οργανικού άνθρακα, εφόσον ισχύει, για τον υπό εξέταση τύπο δείγματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 Ιανουαρίου 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16η έκδοση, 1985.

Ανάλογου ενδιαφέροντος (παρέχεται μια περιγραφή ενός συστήματος αυτοανάλυσης):

- (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.

—

Προσάρτημα 2

Βιοαποικοδομηση σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΚΙΝΟΥΜΕΝΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:**
2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ:**
3. **ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ:**

Όνομασία:

Συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης: mg/l ως ουσία

Αρχική συγκέντρωση στο μέσο, t_0 : mg/l ως ουσία

: mg DOC/l

4. **ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ:**

Πηγή:

Ημερομηνία συλλογής:

Βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα:

Εμφάνιση κατά τον χρόνο της συλλογής (π.χ. θολό κ.λπ.):

Αλατότητα κατά τη συλλογή: ‰

Θερμοκρασία κατά τη συλλογή: °C

DOC "x" ώρες μετά τη συλλογή: mg/l

Προκατεργασία πριν από τη δοκιμή (πχ. διήθηση, καθίζηση, παλαίωση κ.λπ.):

Αριθμός μικροβιακών αποικιών — αρχικό δείγμα: αποικίες/ml

— στην αρχή της δοκιμής: αποικίες/ml

Λοιπά χαρακτηριστικά:

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ:

Αναλυτής άνθρακα:

| | Αρ. φιάλης. | | DOC μετά από n ημέρες (mg/l) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 0 | n ₁ | n ₂ | n ₃ | n _x |
| Δοκιμή: θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά με την υπό δοκιμή ουσία | 1 | a ₁ | | | | | |
| | | a ₂ | | | | | |
| | | μέση τιμή, C _{a(t)} | | | | | |
| | 2 | b ₁ | | | | | |
| | | b ₂ | | | | | |
| | | μέση τιμή, C _{b(t)} | | | | | |
| Τυφλό: θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία | 1 | c ₁ | | | | | |
| | | c ₂ | | | | | |
| | | μέση τιμή, C _{c(t)} | | | | | |
| | 2 | d ₁ | | | | | |
| | | d ₂ | | | | | |
| | | μέση τιμή, C _{d(t)} | | | | | |
| | μέση τιμή, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΕΠΙΞΕΡΓΑΣΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ:

| Αρ. φιάλης | Υπολογισμός των αποτελεσμάτων | % αποικοδόμησης μετά από n ημέρες | | | | |
|---------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 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 | | | | |
| Μέση τιμή (*) | $D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Τα D₁ και D₂ δεν θα πρέπει να παράγουν μέσο όρο αν υπάρχει ανάμεσά τους σοβαρή διαφορά.

Σημείωση: Παρόμοιες διατάξεις μπορούν να χρησιμοποιούνται όταν μετά την αποικοδόμηση ακολουθεί ειδική ανάλυση, καθώς και για την ουσία αναφοράς και τους μάρτυρες τοξικότητας.

7. **ΑΒΙΟΤΙΚΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ (προαιρετική)**

| | Χρόνος (ημέρες) | |
|------------------------------------------|-----------------|------------|
| | 0 | t |
| Συγκέντρωση DOC (mg/l) σε στείρο μάρτυρα | $C_{s(0)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

Προσάρτημα 3

Υπολογισμός του θεωρητικά βιοχημικών απαιτούμενου οξυγόνου

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

Το ThOD της ουσίας $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ με μοριακό βάρος MW υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Ο υπολογισμός αυτός σημαίνει ότι ο C αναοργανοποιείται σε CO_2 , το H σε H_2O , ο P σε P_2O_5 και το Na σε Na_2O . Το αλογόνο απομακρύνεται ως υδραλογόνο και το άζωτο ως αμμωνία.

Παράδειγμα:

Γλυκόζη $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg } glucose$$

Τα μοριακά βάρη των αλάτων, πλην των αλκαλικών μετάλλων, υπολογίζονται με την υπόθεση ότι τα άλατα έχουν υδρολυθεί.

Το θείο θεωρείται ότι έχει οξειδωθεί στην κατάσταση + 6.

Παράδειγμα:

n-δωδεκαβενζολοσουλφονικό νάτριο $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg } substance$$

Στην περίπτωση ουσιών που περιέχουν άζωτο, το άζωτο μπορεί να απομακρύνεται ως αμμωνία, νιτρώδεις ενώσεις ή νιτρικές ενώσεις που αντιστοιχούν σε διαφορετικό θεωρητικά βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

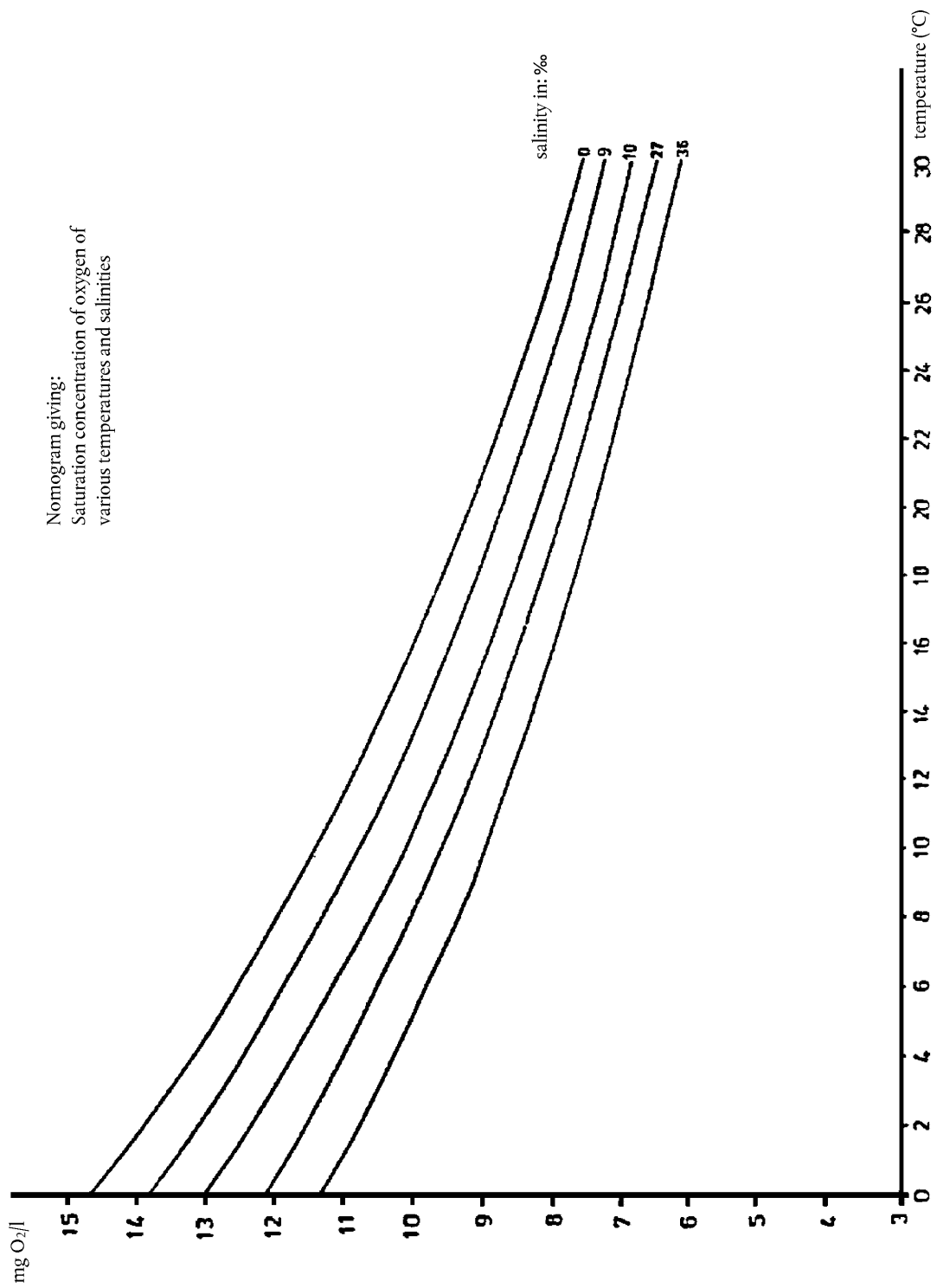
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Γίνεται η υπόθεση ότι παρατηρήθηκε μέσω ανάλυσης πλήρης σχηματισμός νιτρικών στην περίπτωση μιας δευτεροταγούς αμίνης:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg } substance$$

Προσάρτημα 4



Προσάρτημα 5

Βιοαποικοδόμηση σε θαλάσσιο ΝΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:**
2. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ:**
3. **ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ:**

Όνομασία:

Συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης: mg/l
 Αρχική συγκέντρωση στο μέσο θαλάσσιου νερού: mg/l
 ThOD ή COD: mg O₂/mg υπό δοκιμή ουσίας

4. **ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ:**

Πηγή:

Ημερομηνία συλλογής:

Βάθος από το οποίο έχει συλλεγεί το δείγμα:

Εμφάνιση κατά τον χρόνο της συλλογής (π.χ. θολό κ.λπ.):

Αλατότητα κατά τη συλλογή: ‰
 Θερμοκρασία κατά τη συλλογή: °C
 DOC "x" ώρες μετά τη συλλογή: mg/l

Προκατεργασία πριν από τη δοκιμή (πχ. διήθηση, καθίζηση, παλαίωση κ.λπ.):

Αριθμός μικροβιακών αποικιών — αρχικό δείγμα: αποικίες/ml
 — στην αρχή της δοκιμής: αποικίες/ml

Λοιπά χαρακτηριστικά:

5. **ΜΕΣΟ ΔΟΚΙΜΗΣ:**

Θερμοκρασία μετά τον αερισμό: °C

Συγκέντρωση O₂ μετά τον αερισμό και σε ηρεμία πριν από την έναρξη της δοκιμής: mg O₂/l

6. **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DO:**

Μέθοδος: Winkler/ηλεκτρόδιο

| | Αρ. φιάλης | | mg O ₂ /l μετά από n ημέρες | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------------------|---|----|----|
| | | | 0 | 5 | 15 | 28 |
| Δοκιμή: Θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά με την υπό δοκιμή ουσία | 1 | a ₁ | | | | |
| | 2 | a ₂ | | | | |
| | Μέση τιμή δοκιμής | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | |

| | Αρ. φιάλης | | mg O ₂ /l μετά από n ημέρες | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------------------------------|---|----|----|
| | | | 0 | 5 | 15 | 28 |
| Τυφλό: Θαλάσσιο νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικά συστατικά, αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία | 1 | c ₁ | | | | |
| | 2 | c ₂ | | | | |
| | Μέση τιμή τυφλού | $m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$ | | | | |

Σημείωση: Παρόμοια διάταξη μπορεί να χρησιμοποιείται για την ουσία αναφοράς και τους μάρτυρες τοξικότητας.

7. **ΕΛΑΤΤΩΣΗ DO: % ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ (%D):**

| | Ελάττωση DO μετά από n ημέρες | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----|----|
| | 5 | 15 | 28 |
| $(m_b - m_t)$ (l) | | | |
| $\%D = \frac{(m_b - m_t) (l)}{\text{test substance (mg /l)} \times \text{ThOD}} \times 100$ | | | |

(l) (Γίνεται υπόθεση ότι $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, όπου

$m_{b(0)}$ = τιμή τυφλού την ημέρα 0,

$m_{t(0)}$ = τιμή υπό δοκιμή ουσίας την ημέρα 0.

Εάν το $m_{b(0)}$ δεν ισούται με το $m_{t(0)}$, χρησιμοποιείται $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, όπου

$m_{b(x)}$ = τιμή τυφλού την ημέρα x,

$m_{t(x)}$ = τιμή υπό δοκιμή ουσίας την ημέρα x.

Γ.4.3. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΧΩΝΕΥΜΕΝΗ ΙΛΥ: ΜΕΣΩ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΕΡΙΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 311 του ΟΟΣΑ (2006). Υπάρχουν πολλές δοκιμές διαλογής για την εκτίμηση της αερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών (μέθοδοι δοκιμών Γ.4, Γ.9, Γ.10 και Γ.11 (1) και κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 302C του ΟΟΣΑ (2)) και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή τους έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για να προβλεφθεί η τύχη ουσιών στο αερόβιο περιβάλλον, ιδίως στα αερόβια στάδια της επεξεργασίας λυμάτων. Διάφορες αναλογίες αδιάλυτων στο νερό ουσιών, καθώς και των ουσιών που προσροφώνται σε στερεά λύματα, υπόκεινται επίσης σε αερόβια επεξεργασία, καθώς οι ουσίες αυτές υπάρχουν σε καθιζημένα λύματα. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα κλάσματα αυτών των ουσιών δεσμεύονται στην πρωτογενή καθιζημένη ιλύ, η οποία διαχωρίζεται από τα ανεπεξέργαστα λύματα στις δεξαμενές καθίζησης, πριν από την αερόβια επεξεργασία των καθιζημένων ή υπερκείμενων λυμάτων. Κατόπιν η ιλύς, η οποία περιέχει κάποιες από τις διαλυτές ουσίες στο διάμεσο υγρό, προωθείται σε θερμαινόμενα χωνευτήρια για αναερόβια επεξεργασία. Καθώς δεν υπάρχουν ακόμη δοκιμές σε αυτήν τη σειρά για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας σε αναερόβια χωνευτήρια και δεδομένου ότι στόχος αυτής της δοκιμής είναι να καλύψει αυτό το κενό, η παρούσα δοκιμή δεν εφαρμόζεται απαραίτητα σε άλλα ανοξικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα.
2. Για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς αναπνευσιομετρικές τεχνικές που μετρούν τις ποσότητες των παραγόμενων αερίων, κυρίως του μεθανίου (CH_4) και του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Οι Birch κ.α. (3) εξέτασαν αυτές τις διαδικασίες και κατέληξαν ότι η εργασία των Shelton και Tiedje (4), που βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (5)(6)(7), ήταν η πιο περιεκτική. Η μέθοδος (4), η οποία αναπτύχθηκε περαιτέρω από άλλους ερευνητές (8) και οδήγησε στα αμερικανικά πρότυπα (9) (10), δεν έδωσε λύση στα προβλήματα που σχετίζονται με τις διαφορετικές διαλυτότητες του CO_2 και του CH_4 στο μέσο δοκιμής και τον υπολογισμό της θεωρητικής παραγωγής αερίων μιας υπό δοκιμή ουσίας. Σύμφωνα με την έκθεση ECETOC (3), προτάθηκε να μετράται επιπλέον η περιεκτικότητα του υπερκείμενου υγρού σε διαλυμένο ανόργανο άνθρακα (DIC), γεγονός που κατέστησε δυνατή την εφαρμογή της τεχνικής σε ευρύτερο πεδίο. Η μέθοδος ECETOC υποβλήθηκε σε μια διεθνή διαδικασία βαθμονόμησης (ή κυκλική δοκιμή) και έγινε το πρότυπο ISO 11734 (11).
3. Αυτή η μέθοδος δοκιμών, που βασίζεται στο πρότυπο ISO 11734 (11), περιγράφει μια μέθοδο διαλογής για την αξιολόγηση της δυναμικής αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών υπό συγκεκριμένες συνθήκες (δηλ. σε ένα αναερόβιο χωνευτήριο σε μια δεδομένη χρονική στιγμή και περιοχή συγκέντρωσης μικροοργανισμών). Καθώς χρησιμοποιείται αραιωμένη ιλύς με σχετικά υψηλή συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας και η διάρκεια της δοκιμής είναι, κατά κανόνα, μεγαλύτερη από τον χρόνο παραμονής στα αναερόβια χωνευτήρια, οι συνθήκες της δοκιμής δεν ανταποκρίνονται απαραίτητα στις συνθήκες των αναερόβιων χωνευτηρίων, ούτε μπορεί να εφαρμοστεί η δοκιμή για την εκτίμηση της αναερόβιας βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ιλύς εκτίθεται στην υπό δοκιμή ουσία για έως 60 ημέρες, διάρκεια η οποία είναι μεγαλύτερη από τον κανονικό χρόνο παραμονής της ιλύος (25 έως 30 ημέρες) στα αναερόβια χωνευτήρια, ενώ σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις οι χρόνοι παραμονής ενδέχεται να είναι πολύ μεγαλύτεροι. Δεν είναι δυνατό να γίνουν προβλέψεις από τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής όσο πειστικά μπορούν να γίνουν στην περίπτωση της αερόβιας αποικοδόμησης, επειδή οι ενδείξεις που προκύπτουν για τη συμπεριφορά των υπό δοκιμή ουσιών σε "άμεσες" αερόβιες δοκιμές και δοκιμές προσομοίωσης, καθώς και για το αερόβιο περιβάλλον επαρκούν μόνο για να στηρίξουν με βεβαιότητα ότι υπάρχει μια σχέση. Παρόμοιες ενδείξεις για το αναερόβιο περιβάλλον είναι περιορισμένες. Μπορεί να θεωρηθεί ότι προέκυψε πλήρης αναερόβια βιοαποικοδόμηση εάν επιτευχθεί το 75 %-80 % της θεωρητικής παραγωγής αερίων. Οι υψηλές αναλογίες ουσίας προς βιομάζα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις δοκιμές σημαίνουν ότι μια διερχόμενη ουσία είναι πιο πιθανό να αποικοδομηθεί σε ένα αναερόβιο χωνευτήριο. Επιπλέον, οι ουσίες που δεν μετατρέπονται σε αέριο στη δοκιμή δεν είναι απαραίτητο ότι θα παραμείνουν σε πιο ρεαλιστικές περιβαλλοντικές αναλογίες ουσίας προς βιομάζα. Επίσης, λαμβάνουν χώρα άλλες αναερόβιες αντιδράσεις με τις οποίες οι ουσίες μπορεί να υποστούν τουλάχιστον μερική αποικοδόμηση, π.χ. μέσω αποχλωρίωσης, αλλά η παρούσα δοκιμή δεν ανιχνεύει τις εν λόγω αντιδράσεις. Ωστόσο, με την εφαρμογή ειδικών αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της υπό δοκιμή ουσίας, ενδέχεται να είναι δυνατή η παρακολούθηση της εξαφάνισής της (βλ. παραγράφους 6, 30, 44 και 53).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

4. Πλυμένη χωνευμένη ιλύς (¹), που περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις (< 10 mg/l) ανόργανου άνθρακα (IC), αραιώνεται κατά περίπου 10 φορές σε συγκέντρωση ολικών στερεών της τάξεως των 1 g/l έως 3 g/l και επωάζεται στους

(¹) Η χωνευμένη ιλύς είναι ένα μείγμα των καθιζημένων φάσεων των λυμάτων και της ενεργοποιημένης ιλύος, τα οποία έχουν επωαστεί σε αναερόβιο χωνευτήριο στους 35 °C περίπου για τη μείωση της βιομάζας και των προβλημάτων δυσωδίας, καθώς και για τη βελτίωση της δυνατότητας αφυδάτωσης της ιλύος. Αποτελείται από μια ομάδα αναερόβιων ζυμωτικών και μεθανογόνων βακτηρίων που παράγουν διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο (11).

35 °C ± 2 °C σε σφραγισμένα δοχεία με την υπό δοκιμή ουσία σε συγκέντρωση από 20 έως 100 mg C/l για έως 60 ημέρες. Παρέχεται η δυνατότητα μέτρησης της δραστηριότητας της ιλύος, με παράλληλη εκτέλεση τυφλών μαρτύρων με εμβόλιο ιλύος στο μέσο αλλά χωρίς την υπό δοκιμή ουσία.

5. Μετριέται η αύξηση της πίεσης του υπερκείμενου χώρου στα δοχεία που είναι το αποτέλεσμα της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα και μεθανίου. Ένα μεγάλο μέρος του παραγόμενου CO₂ θα διαλυθεί στην υγρή φάση ή θα μετατραπεί σε ανθρακικές ή όξινες ανθρακικές ενώσεις κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής. Αυτός ο ανόργανος άνθρακας μετράται στο τέλος της δοκιμής.
6. Η ποσότητα του άνθρακα (ανόργανος άνθρακας συν μεθάνιο) που προκύπτει από τη βιοαποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας υπολογίζεται από την καθαρή παραγωγή αερίου και τον καθαρό σχηματισμό IC στην υγρή φάση που υπερβαίνουν τις τιμές του τυφλού μάρτυρα. Ο βαθμός της βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται από το συνολικό IC και μεθάνιο-C που παράγεται ως ποσοστό της μετρηθείσας ή υπολογισθείσας ποσότητας άνθρακα που προστίθεται ως υπό δοκιμή ουσία. Η παρακολούθηση της πορείας της βιοαποικοδόμησης μπορεί να πραγματοποιείται μόνο με τη λήψη ενδιάμεσων μετρήσεων της παραγωγής αερίων. Επιπλέον, η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση μπορεί να προσδιορίζεται με ειδικές αναλύσεις στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

7. Για να είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά καθαρότητας, υδατοδιαλυτότητας, πτητικότητας και προσρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας. Η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (% w/w) της υπό δοκιμή ουσίας πρέπει να είναι γνωστή, είτε από τη χημική δομή της είτε με μέτρηση. Για πτητικές υπό δοκιμή ουσίες, είναι χρήσιμη η μέτρηση ή ο υπολογισμός της σταθεράς του Νόμου του Henry προκειμένου να αποφασίζεται εάν η δοκιμή μπορεί να εφαρμοστεί. Οι πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας στα αναερόβια βακτήρια είναι χρήσιμες για την επιλογή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης δοκιμής, καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν ανεπαρκή βιοαποικοδομησιμότητα. Συνιστάται να περιλαμβάνεται ο μάρτυρας αναστολής, εκτός εάν είναι γνωστό ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ανασταλτική στην αναερόβια μικροβιακή δραστηριότητα (βλ. παράγραφο 21 και ISO 13641-1 (12)).

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

8. Η μέθοδος δοκιμών μπορεί να εφαρμόζεται σε υδατοδιαλυτές ουσίες. Ωστόσο, μπορεί να εφαρμόζεται επίσης σε δυσδιάλυτες και αδιάλυτες ουσίες, υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται μια μέθοδος ακριβούς δοσολογίας π. χ. βλ. ISO 10634 (13). Γενικά, για πτητικές ουσίες η απόφαση λαμβάνεται κατά περίπτωση. Ενδεχομένως να πρέπει να τηρούνται ειδικά μέτρα, για παράδειγμα να μην εκλύεται αέριο κατά τη διάρκεια της δοκιμής.

ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9. Για τον έλεγχο της διαδικασίας, υποβάλλεται σε δοκιμή μια ουσία αναφοράς με την προετοιμασία κατάλληλων δοχείων τα οποία εκτελούνται παράλληλα ως μέρος των κανονικών εκτελέσεων της δοκιμής. Η φαινόλη, το βενζοϊκό νάτριο και η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 αποτελούν μερικά παραδείγματα και αναμένεται να αποικοδομούνται κατά περισσότερο από 60 % της θεωρητικής παραγωγής αερίου (δηλ. μεθανίου και ανόργανου άνθρακα) εντός 60 ημερών (3) (14).

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

10. Σε μια διεθνή κυκλική δοκιμή (14), η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων της πίεσης αερίου μεταξύ των τριπλών δοχείων ήταν καλή. Η σχετική τυπική απόκλιση (συντελεστής μεταβλητότητας, COV) ήταν κυρίως κάτω από 20 %, ωστόσο παρουσία τοξικών ουσιών ή προς το τέλος της περιόδου επώασης των 60 ημερών η τιμή αυτή συχνά παρουσίαζε αύξηση σε > 20 %. Υψηλότερες αποκλίσεις βρέθηκαν επίσης σε δοχεία με όγκο < 150 ml. Οι τελικές τιμές pH του μέσου δοκιμής ήταν από 6,5 έως 7,0.

11. Στην κυκλική δοκιμή λήφθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

| Υπό δοκιμή ουσία | Συνολικά δεδομένα n_1 | Μέση αποικοδόμηση (των συνολικών δεδομένων) (%) | Σχετική τυπική απόκλιση (των συνολικών δεδομένων) (%) | Έγκυρα δεδομένα n_2 | Μέση αποικοδόμηση (των έγκυρων δεδομένων) (%) | Σχετική τυπική απόκλιση (των έγκυρων δεδομένων) (%) | Δεδομένα > 60 % αποικοδόμηση σε έγκυρες δοκιμές n_3 |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Παλμιτικό οξύ | 36 | 68,7 ± 30,7 | 45 | 27 | 72,2 ± 18,8 | 26 | 19 = 70 % (*) |
| Πολυαιθυλενογλυκόλη 400 | 38 | 79,8 ± 28,0 | 35 | 29 | 77,7 ± 17,8 | 23 | 24 = 83 % (*) |

(*) Ποσοστό του n_2

12. Οι συντελεστές μεταβλητότητας της μέσης τιμής για όλες τις τιμές που ελήφθησαν με το παλμιτικό οξύ και την πολυαιθυλενογλυκόλη 400 ήταν υψηλοί έως 45 % ($n = 36$) και 35 % ($n = 38$) αντίστοιχα. Όταν παραλείπονταν οι τιμές < 40 % και > 100 % (η πρώτη τιμή θεωρείται οφειλόμενη σε μη βέλτιστες συνθήκες και η δεύτερη σε άγνωστα αίτια), οι COV μειώνονταν σε 26 % και 23 % αντίστοιχα. Τα ποσοστά των “έγκυρων” τιμών με τουλάχιστον 60 % αποικοδόμηση ήταν 70 % για το παλμιτικό οξύ και 83 % για την πολυαιθυλενογλυκόλη 400. Οι αναλογίες της ποσοστιαίας βιοαποικοδόμησης που προέκυψαν από τις μετρήσεις DIC ήταν σχετικά χαμηλές αλλά μεταβλητές. Για το παλμιτικό οξύ, το εύρος ήταν 0-35 %, η μέση τιμή 12 %, με COV 92 % και για την πολυαιθυλενογλυκόλη 400 το εύρος ήταν 0-40 %, η μέση τιμή 24 %, με COV 54 %.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Συσκευές

13. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και τα ακόλουθα:

- α) Επωαστήρας — ανθεκτικός στους σπινθήρες και με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- β) Γυάλινα δοχεία δοκιμής ανθεκτικά στην πίεση, κατάλληλου ονομαστικού μεγέθους ⁽¹⁾, εκ των οποίων το καθένα διαθέτει αεροστεγές διάφραγμα που αντέχει στα 2 bar περίπου. Ο όγκος του υπερκείμενου χώρου θα πρέπει να καταλαμβάνει περίπου το 10 % έως 30 % του συνολικού όγκου. Εάν εκλύεται βιοαέριο ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενδείκνυται ο υπερκείμενος χώρος να καταλαμβάνει περίπου το 10 %, ενώ εάν η έκλυση του αερίου πραγματοποιείται μόνο στο τέλος της δοκιμής ενδείκνυται να καταλαμβάνει το 30 %. Όταν η πίεση απελευθερώνεται σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, συνιστάται η χρήση γυάλινων φιαλών ορού με ονομαστικό όγκο 125 ml και συνολικό όγκο περίπου 160 ml, σφραγισμένων με διαφράγματα ⁽²⁾ και επιτώματα από αλουμίνιο,
- γ) Διάταξη μέτρησης της πίεσης ⁽³⁾ προσαρμοσμένη ώστε να παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης και εκτόνωσης του παραγόμενου αερίου, για παράδειγμα ένας χειροκατευθυνόμενος μετρητής πίεσης ακριβείας συνδεδεμένος σε κατάλληλη βελόνα σύριγγας. Μια τριοδική αεροστεγανή βαλβίδα διευκολύνει την απελευθέρωση της υπερπίεσης (προσάρτημα 1). Ο εσωτερικός όγκος της σωλήνωσης και της βαλβίδας του μεταδότη πίεσης πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό χαμηλότερος, ώστε τα σφάλματα που προκαλούνται λόγω μη υπολογισμού του όγκου του εξοπλισμού να είναι ασήμαντα,

⁽¹⁾ Το συνιστώμενο μέγεθος είναι από 0,1 έως 1 λίτρο.

⁽²⁾ Συνιστάται η χρήση αεροστεγούς διαφράγματος σιλικόνης. Συνιστάται επίσης να ελέγχεται η αεροστεγανότητα των πωμάτων, ιδίως των διαφραγμάτων από βουτυλοκαουτσούκ, επειδή ορισμένα διαφράγματα που διατίθενται στο εμπόριο δεν είναι επαρκώς αεροστεγή έναντι του μεθανίου και μερικά διαφράγματα δεν παραμένουν στεγανά όταν υφίστανται διάτρηση με βελόνα κάτω από τις συνθήκες της δοκιμής.

⁽³⁾ Η διάταξη θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να βαθμονομείται σε τακτά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εάν χρησιμοποιείται μετρητής πίεσης της προβλεπόμενης ποιότητας, π.χ. με περίβλημα από ατσάλινη μεμβράνη, δεν απαιτείται βαθμονόμηση στο εργαστήριο. Η ακρίβεια της βαθμονόμησης μπορεί να ελέγχεται στο εργαστήριο με τη μέτρηση ενός σημείου στα 1×10^5 Pa σε σύγκριση με έναν μετρητή πίεσης με μηχανική ένδειξη. Όταν το σημείο αυτό μετρηθεί με ακρίβεια, η γραμμικότητα θα είναι επίσης αμετάβλητη. Εάν χρησιμοποιούνται άλλες διατάξεις μέτρησης (χωρίς πιστοποιημένη βαθμονόμηση από τον κατασκευαστή), συνιστάται να διεξάγεται βαθμονόμηση στο σύνολο των διατάξεων ανά τακτά διαστήματα.

Σημείωση — Οι ενδείξεις πίεσης χρησιμοποιούνται απευθείας για τον υπολογισμό της ποσότητας του άνθρακα που παράγεται στον υπερκείμενο χώρο (παράγραφοι 42 έως 44). Εναλλακτικά, οι ενδείξεις πίεσης μπορούν να μετατρέπονται σε όγκους (στους 35° C, ατμοσφαιρική πίεση) παραγόμενου αερίου με τη χρήση ενός διαγράμματος μετατροπής. Το διάγραμμα αυτό δημιουργείται από δεδομένα που λαμβάνονται από την έγχυση γνωστών όγκων αερίου αζώτου σε μια σειρά από δοχεία δοκιμής (π.χ. φιάλες ορού) στους 35° +/- 2°C και την καταγραφή των σταθεροποιημένων ενδείξεων πίεσης που προκύπτουν (βλ. προσάρτημα 2). Ο υπολογισμός φαίνεται στη σημείωση της παραγράφου 44.

Προειδοποίηση — Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγονται οι τραυματισμοί από τη βελόνα κατά τη χρήση μικροσύριγγας.

- δ) Αναλυτής άνθρακα, κατάλληλος για τον άμεσο προσδιορισμό ανόργανου άνθρακα μεταξύ 1 mg/l και 200 mg/l,
- ε) Σύριγγες μεγάλης ακρίβειας για αέρια και υγρά δείγματα,
- στ) Μαγνητικοί αναδευτήρες και ράβδοι (προαιρετικά),
- ζ) Συσκευή με χειριστήρια (glove box) (συνιστάται).

Αντιδραστήρια

14. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας σε όλη τη δοκιμή.

Νερό

15. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (αποξυγονωμένο μέσω ψεκασμού με αέριο άζωτο με περιεκτικότητα σε οξυγόνο μικρότερη από 5 μl/l), που περιέχει διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC) λιγότερο από 2 mg/l.

Μέσο δοκιμής

16. Παρασκευάζεται το μέσο αραίωσης που περιλαμβάνει τα ακόλουθα συστατικά στις καθορισμένες ποσότητες:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Άνυδρο δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄) | 0,27 g |
| Δωδεκαένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O) | 1,12 g |
| Χλωριούχο αμμώνιο (NH ₄ Cl) | 0,53 g |
| Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂ × 2H ₂ O) | 0,075g |
| Εξάνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl ₂ × 6H ₂ O) | 0,10 g |
| Τετραένυδρος χλωριούχος σίδηρος (II) (FeCl ₂ × 4H ₂ O) | 0,02 g |
| Ρεσαζουρίνη (δείκτης οξυγόνου) | 0,001g |
| Θειούχο νάτριο εννεαυδρικό (Na ₂ S × 9H ₂ O) | 0,10 g |
| Διάλυμα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων (προαιρετικό, παράγραφος 18) | 10 ml |
| Προστίθεται αποξυγονωμένο νερό (παράγραφος 15) | μέχρι 1 λίτρο |

Σημείωση: Θα πρέπει να χρησιμοποιείται προσφάτως παρασκευασμένο θειούχο νάτριο ή να πλένεται και να στεγνώνεται πριν από τη χρήση, για να εξασφαλίζεται επαρκής αναγωγική ικανότητα. Η δοκιμή μπορεί να διεξάγεται χωρίς τη συσκευή με χειριστήρια (glove box) (βλ. παράγραφο 26). Σε αυτήν την περίπτωση, η τελική συγκέντρωση του θειούχου νατρίου στο μέσο θα πρέπει να αυξάνεται σε 0,20 g Na₂S × 9H₂O ανά λίτρο. Το θειούχο νάτριο μπορεί επίσης να προστίθεται από κατάλληλο αναερόβιο διάλυμα παρακαταθήκης μέσω του διαφράγματος των κλειστών

δοχείων δοκιμής, καθώς η διαδικασία αυτή μειώνει τον κίνδυνο οξείδωσης. Το θειούχο νάτριο μπορεί να αντικατασταθεί από κιτρικό τιτάνιο (III), το οποίο προστίθεται μέσω του διαφράγματος των κλειστών δοχείων δοκιμής σε τελική συγκέντρωση 0,8 έως 1,0 mmol/l. Το κιτρικό τιτάνιο (III) είναι ένα πολύ αποτελεσματικό αναγωγικό μέσο χαμηλής τοξικότητας, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: Διαλύονται 2,94 g διένυδρου κιτρικού τρινατρίου σε 50 ml αποξυγονωμένου νερού (για την επίτευξη διαλύματος 200 mmol/l) και προστίθενται 5 ml ενός διαλύματος χλωριούχου τιτανίου (III) 15 % (w/v). Εξουδετερώνεται σε pH $7 \pm 0,2$ με ανόργανο αλκάλιο και κατανέμεται σε κατάλληλο δοχείο υπό ρεύμα αζώτου. Η συγκέντρωση του κιτρικού τιτανίου (III) σε αυτό το διάλυμα παρακαταθήκης είναι 164 mmol/l.

17. Τα συστατικά του μέσου δοκιμής πλην του αναγωγικού μέσου (θειούχο νάτριο, κιτρικό τιτάνιο) αναμιγνύονται και το διάλυμα υποβάλλεται σε ψεκασμό με αέριο άζωτο για περίπου 20 λεπτά αμέσως πριν από τη χρήση για την απομάκρυνση του οξυγόνου. Κατόπιν προστίθεται κατάλληλος όγκος προσφάτως παρασκευασμένου διαλύματος αναγωγικού μέσου (παρασκευασμένο σε αποξυγονωμένο νερό) ακριβώς πριν από τη χρήση του μέσου δοκιμής. Το pH του μέσου ρυθμίζεται, εάν είναι απαραίτητο, με αραιό ανόργανο οξύ ή αλκάλιο σε $7 \pm 0,2$.

Διάλυμα παρακαταθήκης ιχνοστοιχείων (προαιρετικό)

18. Συνιστάται το μέσο δοκιμής να περιέχει τα ακόλουθα ιχνοστοιχεία για τη βελτίωση των διαδικασιών αναερόβιας αποικοδόμησης, ιδίως εάν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ. 1g/l) εμβολίου (11).

| | |
|-----------------------------------------------------------|---------------|
| Τετραένυδρο χλωριούχο μαγγάνιο ($MnCl_2 \times 4H_2O$) | 50 mg |
| Βορικό οξύ (H_3BO_3) | 5 mg |
| Χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$) | 5 mg |
| Χλωριούχος χαλκός (II) ($CuCl_2$) | 3 mg |
| Διένυδρο μολυβδαινικό νάτριο ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$) | 1 mg |
| Εξάνυδρο χλωριούχο κοβάλτιο ($CoCl_2 \times 6H_2O$) | 100 mg |
| Εξάνυδρο χλωριούχο νικέλιο ($NiCl_2 \times 6H_2O$) | 10 mg |
| Σεληνιώδες νάτριο (Na_2SeO_3) | 5 mg |
| Προστίθεται αποξυγονωμένο νερό (παράγραφος 15) | μέχρι 1 λίτρο |

Υπό δοκιμή ουσία

19. Προστίθεται η υπό δοκιμή ουσία ως διάλυμα παρακαταθήκης, εναιώρημα, γαλάκτωμα ή απευθείας σε στερεή ή υγρή μορφή, ή προσροφημένη σε φίλτρο από υαλοβάμβακα για να προκύψει συγκέντρωση μέχρι 100 mg/l οργανικού άνθρακα. Εάν χρησιμοποιούνται διαλύματα παρακαταθήκης, προετοιμάζεται ένα κατάλληλο διάλυμα με νερό (παράγραφος 15) (το οποίο έχει προηγουμένως αποξυγονωθεί μέσω ψεκασμού με αέριο άζωτο) του οποίου η περιεκτικότητα θα είναι τέτοια ώστε ο όγκος που προστίθεται να είναι μικρότερος από το 5 % του συνολικού όγκου του μείγματος αντίδρασης. Το pH του διαλύματος παρακαταθήκης ρυθμίζεται σε pH $7 \pm 0,2$, εάν είναι απαραίτητο. Για υπό δοκιμή ουσίες που δεν είναι επαρκώς διαλυτές στο νερό, ανατρέξτε στο ISO 10634 (13). Εάν χρησιμοποιείται διαλύτης, παρασκευάζεται ένας επιπλέον μάρτυρας ενώ ο διαλύτης προστίθεται μόνο στο εμβολιασμένο μέσο. Θα πρέπει να αποφεύγονται οργανικοί διαλύτες που είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή μεθανίου, όπως το χλωροφόρμιο και ο τετραχλωριούχος άνθρακας.

Προειδοποίηση — Πρέπει να επιδεικνύεται προσοχή κατά τον χειρισμό τοξικών υπό δοκιμή ουσιών, καθώς και ουσιών των οποίων οι ιδιότητες δεν είναι γνωστές.

Ουσίες αναφοράς

20. Για τον έλεγχο της διαδικασίας έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ουσίες αναφοράς, όπως το βενζοϊκό νάτριο, η φαινόλη και η πολυαιθυλενογλυκόλη 400, οι οποίες παρουσιάζουν βιοαποικοδόμηση πάνω από 60 % εντός 60 ημερών. Προετοιμάζεται ένα διάλυμα παρακαταθήκης (σε αποξυγονωμένο νερό) της επιλεγμένης ουσίας αναφοράς με τον ίδιο τρόπο όπως και για την υπό δοκιμή ουσία και το pH ρυθμίζεται στο $7 \pm 0,2$ εάν είναι απαραίτητο.

Μάρτυρας αναστολής (υπό όρους)

21. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της υπό δοκιμή ουσίας για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς ώστε να διαπιστωθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς προστίθενται σε ένα δοχείο που περιέχει το μέσο δοκιμής (βλ. παράγραφο 16), στην ίδια συγκέντρωση, ανά ουσία, με εκείνη που προστέθηκε, αντίστοιχα (βλ. παραγράφους 19 και 20, καθώς και το ISO 13641-1 (12)).

Χωνευμένη ιλύς

22. Συλλέγεται χωνευμένη ιλύς από ένα χωνευτήριο σε μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων που επεξεργάζεται, κατά κύριο λόγο, οικιακά λύματα. Η ιλύς θα πρέπει να χαρακτηρίζεται πλήρως, καθώς και να αναφέρονται τα βασικά στοιχεία της (βλ. παράγραφο 54). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί εμβόλιο που έχει εγκλιματιστεί στην ουσία, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρήσης χωνευμένης ιλύος από μονάδα επεξεργασίας βιομηχανικών λυμάτων. Χρησιμοποιούνται φιάλες με πλατύ στόμιο κατασκευασμένες από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ή παρόμοιο υλικό, το οποίο μπορεί να διαστέλλεται, για τη συλλογή της χωνευμένης ιλύος. Προστίθεται ιλύς έως περίπου 1 cm από το πάνω μέρος των φιαλών και οι φιάλες σφραγίζονται σφικτά, κατά προτίμηση με βαλβίδα ασφαλείας. Μετά τη μεταφορά στο εργαστήριο, η συλλεγμένη ιλύς μπορεί είτε να χρησιμοποιείται άμεσα είτε να τοποθετείται σε χωνευτήριο εργαστηριακής κλίμακας. Η περίσσια βιοαερίου εκλύεται με προσεκτικό άνοιγμα των φιαλών ιλύος. Εναλλακτικά, ως πηγή εμβολίου μπορεί να χρησιμοποιείται αναερόβια ιλύς που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο, όμως το φάσμα δράσης της ενδέχεται να έχει επηρεαστεί δυσμενώς.

Προειδοποίηση — Η χωνευμένη ιλύς παράγει εύφλεκτα αέρια τα οποία ενέχουν κινδύνους πρόκλησης πυρκαγιάς και έκρηξης. Επίσης, περιέχει δυνητικώς παθογόνους οργανισμούς, οπότε απαιτείται η λήψη κατάλληλων προφυλάξεων κατά τον χειρισμό της ιλύος. Για λόγους ασφαλείας, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται γυάλινα δοχεία για τη συλλογή της ιλύος.

23. Προκειμένου να μειωθεί η παραγωγή αερίων προερχόμενων από το περιβάλλον και να μειωθούν οι επιδράσεις των μαρτύρων τυφλού, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο η ιλύς να υποστεί προχώνευση. Εάν απαιτείται προχώνευση, η ιλύς θα πρέπει να αφήνεται να υποστεί χώνευση χωρίς την προσθήκη θρεπτικών συστατικών ή υποστρωμάτων στους 35 °C ± 2 °C για έως 7 ημέρες. Έχει διαπιστωθεί ότι η προχώνευση για περίπου 5 ημέρες συνήθως παρέχει βέλτιστη μείωση στην παραγωγή αερίων του τυφλού χωρίς μη αποδεκτές αυξήσεις στη λανθάνουσα φάση ή στη φάση επώασης κατά τη διάρκεια της φάσης δοκιμής ή απώλεια δράσης προς έναν μικρό αριθμό ουσιών που ελέγχθηκαν.
24. Για υπό δοκιμή ουσίες που είναι, ή αναμένεται να είναι, ανεπαρκώς βιοαποικοδομήσιμες, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο προέκθεσης της ιλύος στην υπό δοκιμή ουσία ώστε να ληφθεί ένα εμβόλιο που είναι καλύτερα εγκλιματισμένο. Σε αυτήν την περίπτωση, η υπό δοκιμή ουσία με περιεκτικότητα σε ανόργανο άνθρακα από 5 mg/l έως 20 mg/l προστίθεται στη χωνευμένη ιλύ και επωάζεται για έως 2 εβδομάδες. Η ιλύς που υποβάλλεται σε προέκθεση πλένεται προσεκτικά πριν από τη χρήση (βλ. παράγραφο 25) και στην έκθεση της δοκιμής αναφέρονται οι συνθήκες της προέκθεσης.

Εμβόλιο

25. Η ιλύς πλένεται (βλ. παραγράφους 22 έως 24) ακριβώς πριν από τη χρήση για να μειωθεί η συγκέντρωση IC κάτω από 10 mg/l στο τελικό εναιώρημα της δοκιμής. Η ιλύς φυγοκεντρείται σε σφραγισμένους σωλήνες (π.χ. 3 000 g για 5 λεπτά) και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Σχηματίζεται εναιώρημα του ιζήματος που προκύπτει σε αποξυγονωμένο μέσο (παραγράφοι 16 και 17), το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό. Εάν δεν έχει μειωθεί επαρκώς ο IC, η διαδικασία πλύσης της ιλύος μπορεί να επαναληφθεί μέχρι δύο φορές το μέγιστο. Η διαδικασία αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς τους μικροοργανισμούς. Τέλος, σχηματίζεται εναιώρημα του ιζήματος στον απαιτούμενο όγκο του μέσου δοκιμής και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών στερεών [π.χ. ISO 11923 (15)]. Η τελική συγκέντρωση των ολικών στερεών στα δοχεία δοκιμής θα πρέπει να κυμαίνεται από 1 g/l έως 3 g/l (ή περίπου στο 10 % της συγκέντρωσης σε μη αραιωμένη χωνευμένη ιλύ). Οι παραπάνω διαδικασίες πρέπει να διεξάγονται με τρόπο ώστε η ιλύς να έρχεται σε ελάχιστη επαφή με το οξυγόνο (π.χ. χρήση ατμόσφαιρας αζώτου).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

26. Πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αρχικές διαδικασίες με χρήση τεχνικών για τη διατήρηση της επαφής μεταξύ της χωνευμένης ιλύος και του οξυγόνου στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο, για παράδειγμα μπορεί να είναι απαραίτητο να γίνουν εργασίες εντός της συσκευής με χειριστήρια (glove box) σε ατμόσφαιρα αζώτου ή/και εκκένωση των φιαλών με άζωτο (4).

Προετοιμασία της δοκιμής και των δοκιμασιών-μαρτύρων

27. Προετοιμάζονται τουλάχιστον τριπλά δοχεία δοκιμής (βλ. παράγραφο 13-β) για την υπό δοκιμή ουσία, τους μάρτυρες τυφλού, την ουσία αναφοράς, τους μάρτυρες αναστολής (υπό όρους) και τους θαλάμους ελέγχου πίεσης (προαιρετική διαδικασία) (βλ. παραγράφους 7, 19 έως 21). Μπορούν να προετοιμαστούν επίσης επιπλέον δοχεία για το σκοπό της αξιολόγησης της πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης με χρήση ειδικών αναλύσεων για την υπό δοκιμή ουσία. Η ίδια ομάδα μαρτύρων τυφλού μπορεί να χρησιμοποιείται για αρκετές υπό δοκιμή ουσίες στην ίδια δοκιμή, εφόσον οι όγκοι του υπερκείμενου χώρου είναι συνεπείς.

28. Προετοιμάζεται το αραιωμένο εμβόλιο και προστίθεται στα δοχεία, π.χ. με ένα σιφόνιο με ευρύ στόμιο. Προστίθενται κλάσματα ενός καλά αναμειγμένου εμβολίου (παράγραφος 25), ώστε η συγκέντρωση των ολικών στερεών να είναι ίδια σε όλα τα δοχεία (από 1 g/l έως 3 g/l). Προστίθενται διαλύματα παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς μετά τη ρύθμισή τους σε pH $7 \pm 0,2$, εάν είναι απαραίτητο. Η υπό δοκιμή ουσία και η ουσία αναφοράς θα πρέπει να προστίθενται με χρήση της καταλληλότερης οδού χορήγησης (παράγραφος 19).
29. Η συγκέντρωση δοκιμής του οργανικού άνθρακα θα πρέπει κανονικά να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 100 mg/l (παράγραφος 4). Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι τοξική, η συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να μειώνεται σε 20 mg C/l ή σε ακόμη χαμηλότερο επίπεδο εάν πρόκειται να μετρηθεί μόνο η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση με ειδικές αναλύσεις. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής αυξάνεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δοκιμής.
30. Για δοχεία τυφλού, προστίθεται ισοδύναμη ποσότητα του φορέα που χρησιμοποιείται για τη δοσολογία της υπό δοκιμή ουσίας αντί ενός διαλύματος παρακαταθήκης, εναιωρήματος ή γαλακτώματος. Εάν η υπό δοκιμή ουσία έχει χορηγηθεί με φίλτρα από υαλοβάμβακα ή οργανικούς διαλύτες, προστίθεται στα τυφλά ένα φίλτρο ή διαλύτης ισοδύναμου όγκου που έχει εξατμιστεί. Προετοιμάζεται μια επιπλέον επανάληψη με την υπό δοκιμή ουσία για τη μέτρηση της τιμής του pH. Το pH ρυθμίζεται σε τιμή $7 \pm 0,2$, εάν είναι απαραίτητο, με μικρές ποσότητες αραιού ανόργανου οξέος ή αλκαλίου. Θα πρέπει να προστίθενται οι ίδιες ποσότητες παραγόντων εξουδετέρωσης σε όλα τα δοχεία δοκιμής. Οι προσθήκες αυτές δεν θα πρέπει να είναι αναγκαίο να γίνουν, καθώς η τιμή pH των διαλυμάτων παρακαταθήκης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς έχει ήδη ρυθμιστεί (βλ. παραγράφους 19 και 20). Εάν πρόκειται να μετρηθεί η πρωτογενής βιοαποικοδόμηση, θα πρέπει να ληφθεί κατάλληλο δείγμα από το δοχείο μάρτυρα pH ή από ένα επιπλέον δοχείο δοκιμής, και η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να μετρηθεί με χρήση ειδικών αναλύσεων. Μπορούν να προστεθούν επικαλυμμένοι μαγνήτες σε όλα τα δοχεία, εάν τα μείγματα αντίδρασης πρόκειται να αναδευτούν (προαιρετικά).
31. Διασφαλίζεται ότι ο συνολικός όγκος του υγρού V_1 και ο όγκος του υπερκείμενου χώρου V_h είναι ίδιοι σε όλα τα δοχεία. Σημειώνονται και καταγράφονται οι τιμές των V_1 και V_h . Κάθε δοχείο θα πρέπει να σφραγίζεται με διάφραγμα αερίου και να μεταφέρεται από τη συσκευή με χειριστήρια (glove box) (βλ. παράγραφο 26) στον επωαστήρα (βλ. παράγραφο 13-α).

Αδιάλυτες υπό δοκιμή ουσίες

32. Προστίθενται ζυγισμένες ποσότητες ουσιών, οι οποίες είναι δυσδιάλυτες στο νερό, απευθείας στα προετοιμασμένα δοχεία. Όταν απαιτείται η χρήση ενός διαλύτη (βλ. παράγραφο 19), το διάλυμα ή το εναιώρημα της υπό δοκιμή ουσίας μεταφέρεται σε άδεια δοχεία. Όπου είναι δυνατό, ο διαλύτης εξατμίζεται με τη διέλευση αερίου αζώτου μέσω των δοχείων και, στη συνέχεια, προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά, ήτοι αραιωμένη ιλύς (παράγραφος 25) και αποξηνογόμενο νερό, όπως απαιτείται. Θα πρέπει να παρασκευάζεται επίσης ένας επιπλέον μάρτυρας με διαλύτη (βλ. παράγραφο 19). Άλλες μέθοδοι προσθήκης αδιάλυτων ουσιών διατίθενται στο ISO 10634 (13). Η δοσολογία των υγρών υπό δοκιμή ουσιών μπορεί να χορηγείται με σύριγγα στα πλήρως προετοιμασμένα σφραγισμένα δοχεία, εάν αναμένεται ότι το αρχικό pH δεν θα υπερβεί την τιμή 7 ± 1 , διαφορετικά η δόση χορηγείται όπως περιγράφεται ανωτέρω (βλ. παράγραφο 19).

Επώαση και μετρήσεις πίεσης αερίου

33. Τα προετοιμασμένα δοχεία επωάζονται στους $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ για περίπου 1 ώρα, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση και έκλυση της περίσσιας αερίου στην ατμόσφαιρα, για παράδειγμα με ανακίνηση κάθε δοχείου με τη σειρά, εισαγωγή της βελόνας στον μετρητή πίεσης (παράγραφος 13-γ) μέσω της σφράγισης και άνοιγμα της βαλβίδας μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί. Εάν στο στάδιο αυτό ή κατά την πραγματοποίηση ενδιάμεσων μετρήσεων, η πίεση στον υπερκείμενο χώρο είναι μικρότερη από την ατμοσφαιρική πίεση, θα πρέπει να εισαχθεί αέριο άζωτο για να επιτευχθεί ξανά η ατμοσφαιρική πίεση. Κλείνεται η βαλβίδα (βλ. παράγραφο 13-γ) και συνεχίζεται η επώαση στο σκοτάδι, αφού διασφαλιστεί ότι όλα τα μέρη των δοχείων διατηρούνται στη θερμοκρασία χώνευσης. Τα δοχεία πρέπει να παρατηρούνται μετά την επώαση για 24 έως 48 ώρες. Τα δοχεία των οποίων το περιεχόμενο παρουσιάζει διακριτό ροζ χρωματισμό στο υπερκείμενο υγρό απορρίπτονται, εάν δηλ. η ρεσαζουρίνη (βλ. παράγραφο 16) έχει αλλάξει χρώμα υποδεικνύοντας την παρουσία οξυγόνου (βλ. παράγραφο 50). Ενώ μικρές ποσότητες οξυγόνου μπορεί να είναι ανεκτές από το σύστημα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να αναστείλουν σημαντικά την πορεία της αναερόβιας βιοαποικοδόμησης. Η περιστασιακή απόρριψη ενός δοχείου από μια ομάδα τριπλών δοχείων μπορεί να είναι αποδεκτή, αλλά εάν παρουσιαστούν περισσότερες αποτυχίες πρέπει να ακολουθήσει διερεύνηση των πειραματικών διαδικασιών, καθώς και επανάληψη της δοκιμής.

34. Τα περιεχόμενα κάθε δοχείου αναμιγνύονται προσεκτικά με ανάδευση ή ανακίνηση για λίγα λεπτά, τουλάχιστον 2 ή 3 φορές την εβδομάδα και λίγο πριν από κάθε μέτρηση πίεσης. Με την ανακίνηση γίνεται επανεναιώρηση του εμβολίου και διασφαλίζεται η εξισορρόπηση των αερίων. Όλες οι μετρήσεις πίεσης θα πρέπει να γίνονται γρήγορα, επειδή τα δοχεία δοκιμής μπορεί να υποβληθούν σε μείωση της θερμοκρασίας, πράγμα που οδηγεί σε ψευδείς ενδείξεις. Κατά τη μέτρηση της πίεσης, ολόκληρο το δοχείο δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του υπερκείμενου χώρου, θα πρέπει να διατηρείται στη θερμοκρασία χώνευσης. Μετριέται η πίεση αερίων, για παράδειγμα με την εισαγωγή μιας βελόνας σύριγγας μέσω του διαφράγματος (παράγραφος 13-γ) η οποία είναι συνδεδεμένη στον μετρητή παρακολούθησης της πίεσης. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποτρέπεται η είσοδος νερού στη βελόνα σύριγγας. Εάν συμβεί αυτό, τα υγρά μέρη θα πρέπει να στεγνώνονται και να προσαρμόζεται νέα βελόνα. Η πίεση θα πρέπει να μετριέται σε millibar (βλ. παράγραφο 42). Η πίεση αερίων στα δοχεία μπορεί να μετριέται περιοδικά, π.χ. εβδομαδιαίως, και η περίσσια αερίου να εκλύεται στην ατμόσφαιρα προαιρετικά. Εναλλακτικά, η πίεση μετριέται μόνο στο τέλος της δοκιμής για να προσδιοριστεί η ποσότητα του παραγόμενου βιοαερίου.
35. Συνιστάται να γίνονται ενδιάμεσες μετρήσεις της πίεσης αερίων, επειδή η αύξηση της πίεσης παρέχει καθοδήγηση σχετικά με το πότε μπορεί να τερματιστεί η δοκιμή και επιτρέπει την παρακολούθηση της κινητικής (βλ. παράγραφο 6).
36. Κανονικά, η δοκιμή τερματίζεται μετά από περίοδο επώασης 60 ημερών, εκτός εάν η καμπύλη βιοαποικοδόμησης που προκύπτει από τις μετρήσεις πίεσης έχει φτάσει τη φάση οριζοντίωσης νωρίτερα. Οριζοντίωση είναι η φάση κατά την οποία έχει επιτευχθεί η μέγιστη αποικοδόμηση και η καμπύλη βιοαποικοδόμησης έχει σταθεροποιηθεί. Εάν η τιμή οριζοντίωσης είναι μικρότερη από 60 %, η ερμηνεία παρουσιάζει προβλήματα επειδή υποδεικνύει ότι μόνο ένα μέρος του μορίου έχει ανοργανοποιηθεί ή ότι έχει προκύψει σφάλμα. Εάν στο τέλος της κανονικής περιόδου επώασης, παράγεται αέριο αλλά είναι εμφανές ότι δεν έχει επιτευχθεί φάση οριζοντίωσης, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο παράτασης της δοκιμής για να ελεγχθεί εάν θα επιτευχθεί η οριζοντίωση (> 60 %).

Μέτρηση ανόργανου άνθρακα

37. Στο τέλος της δοκιμής, μετά την τελευταία μέτρηση της πίεσης αερίου, η ιλύς αφήνεται να καθιζάνει. Κάθε δοχείο ανοίγεται με τη σειρά και λαμβάνεται αμέσως δείγμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (mg/l) ανόργανου άνθρακα (IC) στο υπερκείμενο υγρό. Δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται φυγοκέντρωση ή διήθηση στο υπερκείμενο υγρό, επειδή θα προέκυπτε μη αποδεκτή απώλεια διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα. Εάν το υγρό δεν είναι δυνατό να αναλυθεί κατά τη δειγματοληψία, φυλάσσεται σε σφραγισμένο φιαλίδιο χωρίς υπερκείμενο χώρο και ψύχεται περίπου στους 4 °C για έως 2 ημέρες. Μετά τη μέτρηση IC, μετράται και καταγράφεται η τιμή pH.
38. Εναλλακτικά, ο IC στο υπερκείμενο υγρό μπορεί να προσδιορίζεται έμμεσα από τον διαλυμένο IC που εκλύεται ως διοξείδιο του άνθρακα και μετράται στον υπερκείμενο χώρο. Μετά την τελευταία μέτρηση της πίεσης αερίου, η πίεση σε κάθε δοχείο δοκιμής προσαρμόζεται στην ατμοσφαιρική πίεση. Εκτελείται οξίνιση των περιεχομένων του κάθε δοχείου σε pH 1 περίπου με την προσθήκη συμπυκνωμένου ανόργανου οξέος (π.χ. H₂SO₄) μέσω του διαφράγματος των σφραγισμένων δοχείων. Τα δοχεία που έχουν ανακινηθεί επωάζονται στους 35 °C ± 2 °C για περίπου 24 ώρες και μετράται η πίεση αερίου που προκύπτει από το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα με χρήση του μετρητή πίεσης.
39. Πραγματοποιούνται παρόμοιες μετρήσεις για τα αντίστοιχα δοχεία του τυφλού, της ουσίας αναφοράς και, εάν συμπεριλαμβάνεται, του μάρτυρα αναστολής (βλ. παράγραφο 21).
40. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδίως εάν τα ίδια δοχεία μάρτυρα χρησιμοποιούνται για αρκετές υπό δοκιμή ουσίες, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο πραγματοποίησης μετρήσεων της ενδιάμεσης συγκέντρωσης IC στα δοχεία δοκιμής και μάρτυρα, κατά περίπτωση. Σε αυτήν την περίπτωση, θα πρέπει να προετοιμάζεται ένας επαρκής αριθμός δοχείων για όλες τις ενδιάμεσες μετρήσεις. Η διαδικασία αυτή προτιμάται από τη λήψη όλων των δειγμάτων μόνο από ένα δοχείο. Το τελευταίο μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εάν ο απαιτούμενος όγκος για την ανάλυση DIC δεν θεωρείται πολύ υψηλός. Η μέτρηση DIC θα πρέπει να πραγματοποιείται μετά τη μέτρηση της πίεσης αερίου χωρίς έκλυση περίσσιας αερίου, όπως περιγράφεται παρακάτω:

— λαμβάνεται όσο το δυνατό μικρότερος όγκος υπερκείμενων δειγμάτων με μια σύριγγα μέσω του διαφράγματος χωρίς να ανοίγονται τα δοχεία και προσδιορίζεται ο IC στο δείγμα,

— μετά τη λήψη του δείγματος, η περίσσια αερίου μπορεί να εκλύεται ή όχι,

- θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ακόμη και μια μικρή μείωση στον όγκο του υπερκείμενου υγρού (π.χ. περίπου 1 %) μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση στον όγκο αερίου του υπερκείμενου χώρου (V_h),
- οι εξισώσεις (βλ. παράγραφο 44) διορθώνονται με την αύξηση του V_h στην εξίσωση 3, όπως απαιτείται.

Ειδικές αναλύσεις

41. Εάν πρόκειται να προσδιοριστεί η πρωτογενής αναερόβια αποικοδόμηση (βλ. παράγραφο 30), λαμβάνεται ένας κατάλληλος όγκος δείγματος για ειδικές αναλύσεις από τα δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής. Εάν γίνει αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι οι όγκοι του υπερκείμενου χώρου (V_h) και του υγρού (V) θα αλλάξουν, γεγονός το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της παραγωγής αερίου. Εναλλακτικά, τα δείγματα μπορούν να λαμβάνονται για ειδικές αναλύσεις από επιπλέον μείγματα που έχουν ετοιμαστεί προηγουμένως για τον σκοπό αυτό (παράγραφος 30).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

42. Για πρακτικούς λόγους, η πίεση του αερίου μετριέται σε millibar ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ h Pa} = 10^2 \text{ Pa}$, $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), ο όγκος σε λίτρα και η θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου.

Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο

43. Καθώς 1 mol μεθανίου και 1 mol διοξειδίου του άνθρακα περιέχουν το καθένα 12 g άνθρακα, η μάζα του άνθρακα σε έναν δεδομένο όγκο εκλυόμενου αερίου μπορεί να εκφράζεται ως εξής:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Εξίσωση [1]}$$

όπου:

m = μάζα άνθρακα (mg) σε έναν δεδομένο όγκο εκλυόμενου αερίου,

12 = σχετική ατομική μάζα του άνθρακα,

n = αριθμός γραμμομορίων του αερίου σε έναν δεδομένο όγκο.

Εάν παράγεται άλλο αέριο εκτός από το μεθάνιο ή το διοξείδιο του άνθρακα (π.χ. N_2O) σε σημαντικές ποσότητες, η εξίσωση [1] θα πρέπει να τροποποιείται προκειμένου να περιγραφεί η πιθανότητα επιδράσεων από τα παραγόμενα αέρια.

44. Σύμφωνα με τους νόμους των αερίων, το n μπορεί να εκφράζεται ως εξής:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Εξίσωση [2]}$$

όπου:

p = πίεση του αερίου (Pascal),

V = όγκος του αερίου (m^3),

R = γραμμομοριακή σταθερά αερίου [$8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$],

T = θερμοκρασία επώασης (Kelvin).

Με τον συνδυασμό των εξισώσεων [1] και [2] και τον εξορθολογισμό ώστε να επιτρέπεται η παραγωγή αερίου του μάρτυρα τυφλού:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Εξίσωση [3]}$$

όπου:

m_h = μάζα καθαρού άνθρακα που παράγεται ως αέριο στον υπερκείμενο χώρο (mg),

Δp = μέση τιμή της διαφοράς μεταξύ της αρχικής και τελικής πίεσης στα δοχεία δοκιμής μείον την αντίστοιχη μέση τιμή των δοχείων τυφλού (millibar),

V_h = όγκος υπερκείμενου χώρου στο δοχείο (l),

0,1 = μετατροπή των newton/m² σε millibar και των m³ σε λίτρα.

Η εξίσωση [4] θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την κανονική θερμοκρασία επώασης των 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Εξίσωση [4]}$$

Σημείωση: Εναλλακτικός υπολογισμός του όγκου. Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μετατρέπονται σε ml του αερίου που παράγεται με χρήση της πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται από τη γραφική παράσταση του όγκου (ml) που εγχέεται συναρτήσει της ένδειξης του μετρητή (προσάρτημα 2). Ο αριθμός γραμμομορίων (n) του αερίου στον υπερκείμενο χώρο κάθε δοχείου υπολογίζεται με διαίρεση της αθροιστικής παραγωγής αερίου (ml) με 25.286 ml/mole, που είναι ο όγκος που καταλαμβάνεται από ένα γραμμομόριο αερίου στους 35 °C και σε τυπική ατμοσφαιρική πίεση. Καθώς 1 mole CH₄ και 1 mole CO₂ περιέχουν το καθένα 12 g άνθρακα, η ποσότητα του άνθρακα (mg) στον υπερκείμενο χώρο (m_h) δίνεται από την εξίσωση [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Εξίσωση [5]}$$

Εξορθολογισμός για να επιτραπεί η παραγωγή αερίου του μάρτυρα τυφλού:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad \text{Εξίσωση [6]}$$

όπου:

m_h = μάζα καθαρού άνθρακα που παράγεται ως αέριο στον υπερκείμενο χώρο (mg),

ΔV = μέση τιμή της διαφοράς μεταξύ του όγκου του αερίου που παράγεται στον υπερκείμενο χώρο των δοχείων δοκιμής και των δοχείων μάρτυρα τυφλού,

25 286 = όγκος που καταλαμβάνεται από 1 γραμμομόριο αερίου στους 35 °C, 1 atm.

45. Η παρακολούθηση της πορείας της βιοαποικοδόμησης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη γραφική παράσταση της αθροιστικής αύξησης της πίεσης Δp (millibar) συναρτήσει του χρόνου, κατά περίπτωση. Από την καμπύλη αυτή, αναγνωρίζεται και καταγράφεται η λανθάνουσα φάση (ημέρες). Η λανθάνουσα φάση είναι ο χρόνος από την έναρξη της δοκιμής μέχρι να ξεκινήσει σημαντική αποικοδόμηση (για παράδειγμα, βλ. προσάρτημα 3). Εάν έχουν ληφθεί και αναλυθεί ενδιάμεσα δείγματα υπερκείμενου υγρού (βλ. παραγράφους 40, 46 και 47), τότε μπορεί να παρασταθεί γραφικά ο συνολικός C που παράγεται (στο αέριο και στο υγρό μαζί) αντί της αθροιστικής πίεσης μόνο.

Άνθρακας στο υγρό

46. Η ποσότητα του μεθανίου στο υγρό δεν λαμβάνεται υπόψη, επειδή η διαλυτότητά του στο νερό είναι γνωστό ότι είναι πολύ μικρή. Υπολογίζεται η μάζα του ανόργανου άνθρακα στο υγρό των δοχείων δοκιμής με χρήση της εξίσωσης [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Εξίσωση [7]}$$

όπου:

m_l = μάζα ανόργανου άνθρακα στο υγρό (mg),

C_{net} = συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα στα δοχεία δοκιμής μείον τη συγκέντρωσή του στα δοχεία μάρτυρα στο τέλος της δοκιμής (mg/l),

V_l = όγκος υγρού στο δοχείο (l).

Ολικός αεριοποιημένος άνθρακας

47. Υπολογίζεται η συνολική μάζα του αεριοποιημένου άνθρακα στο δοχείο με χρήση της εξίσωσης [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Εξίσωση [8]}$$

όπου:

m_t = συνολική μάζα αεριοποιημένου άνθρακα (mg),

Τα m_h και m_l έχουν όπως ορίζεται παραπάνω.

Άνθρακας της υπό δοκιμή ουσίας

48. Υπολογίζεται η μάζα του άνθρακα στα δοχεία δοκιμής που προκύπτει από την προστιθέμενη υπό δοκιμή ουσία με χρήση της εξίσωσης [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Εξίσωση [9]}$$

όπου:

m_v = μάζα του άνθρακα της υπό δοκιμή ουσίας (mg),

C_c = συγκέντρωση του άνθρακα της υπό δοκιμή ουσίας στο δοχείο δοκιμής (mg/l)

V_l = όγκος του υγρού στο δοχείο δοκιμής (l).

Βαθμός της βιοαποικοδόμησης

49. Υπολογίζεται το ποσοστό της βιοαποικοδόμησης από το αέριο του υπερκείμενου χώρου με χρήση της εξίσωσης [10] και το συνολικό ποσοστό της βιοαποικοδόμησης με χρήση της εξίσωσης [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [11]}$$

όπου:

D_h = βιοαποικοδόμηση από το αέριο του υπερκείμενου χώρου (%),

D_t = συνολική βιοαποικοδόμηση (%),

Τα m_h , m_v και m_t έχουν όπως ορίζεται παραπάνω.

Ο βαθμός πρωτογενούς βιοαποικοδόμησης υπολογίζεται από τις (προαιρετικές) μετρήσεις της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή και στο τέλος της επώασης, με χρήση της εξίσωσης [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Εξίσωση [12]}$$

όπου:

D_p = πρωτογενής αποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας (%),

S_i = αρχική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (mg/l),

S_e = συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο τέλος της δοκιμής (mg/l).

Εάν η μέθοδος ανάλυσης υποδεικνύει σημαντικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο μη τροποποιημένο αναερόβιο εμβόλιο ιλύος, χρησιμοποιείται η εξίσωση [13]:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Εξίσωση [13]}$$

όπου:

D_p^1 = διορθωμένη πρωτογενής αποικοδόμηση της υπό δοκιμή ουσίας (%),

S_{ib} = αρχική “φαινόμενη” συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους μάρτυρες τυφλού (mg/l),

S_{eb} = “φαινόμενη” συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους μάρτυρες τυφλού στο τέλος της δοκιμής (mg/l).

Εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

50. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ενδείξεις πίεσης μόνο από δοχεία που δεν παρουσιάζουν ροζ χρωματισμό (βλ. παράγραφο 33). Η επιμόλυνση με οξυγόνο ελαχιστοποιείται με τη χρήση ορθών αναερόβιων τεχνικών χειρισμού.
51. Η δοκιμή θα πρέπει να θεωρείται έγκυρη εάν η ουσία αναφοράς φτάσει σε φάση οριζόντιωσης που αντιπροσωπεύει βιοαποικοδόμηση μεγαλύτερη από 60 % (1).
52. Εάν το pH στο τέλος της δοκιμής υπερβαίνει την τιμή 7 ± 1 και δεν έχει πραγματοποιηθεί επαρκής βιοαποικοδόμηση, η δοκιμή επαναλαμβάνεται με αύξηση της ρυθμιστικής ικανότητας του μέσου.

(1) Θα πρέπει να γίνεται επανεκτίμηση εάν συμπεριλαμβάνονται προσροφητικές και αδιάλυτες χημικές ουσίες αναφοράς.

Αναστολή της αποικοδόμησης

53. Η παραγωγή αερίου στα δοχεία που περιέχουν τόσο την υπό δοκιμή ουσία όσο και την ουσία αναφοράς θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ίση με αυτή στα δοχεία που περιέχουν μόνο την ουσία αναφοράς. Διαφορετικά, υποδεικνύεται αναστολή της παραγωγής αερίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παραγωγή αερίου σε δοχεία που περιέχουν την υπό δοκιμή ουσία χωρίς την ουσία αναφοράς θα είναι μικρότερη από αυτή στους μάρτυρες τυφλού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η υπό δοκιμή ουσία είναι ανασταλτική.

Έκθεση δοκιμής

54. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία:

- κοινή ονομασία, χημική ονομασία, αριθμός CAS, συντακτικός τύπος και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,
- καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής:

- όγκοι του αραιωμένου υγρού χωνευτηρίου (V_1) και του υπερκείμενου χώρου (V_h) στο δοχείο,
- περιγραφή των δοχείων δοκιμής, των κύριων χαρακτηριστικών της μέτρησης βιοαερίου (π.χ. τύπος μετρητή πίεσης) και του αναλυτή IC,
- εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς στο σύστημα δοκιμής: χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμής και κάθε χρήση διαλυτών,
- λεπτομέρειες του χρησιμοποιούμενου εμβολίου: ονομασία της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, περιγραφή της πηγής των λυμάτων που υπέστησαν επεξεργασία (π.χ. θερμοκρασία λειτουργίας, χρόνος παραμονής της ιλύος, κατά κύριο λόγο οικιακά λύματα κ.λπ.), συγκέντρωση, κάθε πληροφορία που απαιτείται για επιβεβαίωση και πληροφορίες σχετικά με τυχόν προκατεργασία του εμβολίου (π.χ. προχώνευση, προέκθεση),
- θερμοκρασία επώασης,
- αριθμός των επαναλήψεων.

Αποτελέσματα:

- τιμές pH και IC στο τέλος της δοκιμής,
- συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην αρχή και στο τέλος της δοκιμής, εάν έχει πραγματοποιηθεί ειδική μέτρηση,
- όλα τα μετρηθέντα δεδομένα που συλλέγονται στα δοχεία δοκιμής, τυφλού, ουσίας αναφοράς και μάρτυρα αναστολής, κατά περίπτωση [π.χ. πίεση σε millibar, συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα (mg/l)] σε μορφή πίνακα (τα μετρηθέντα δεδομένα για τον υπερκείμενο χώρο και το υγρό θα πρέπει να μετρώνται χωριστά),
- στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, διάρκεια δοκιμής και διάγραμμα της βιοαποικοδόμησης της υπό δοκιμή ουσίας, της ουσίας αναφοράς και του μάρτυρα αναστολής,
- ποσοστό βιοαποικοδόμησης της υπό δοκιμή ουσίας και της ουσίας αναφοράς,
- αιτιολογία οποιασδήποτε απόρριψης των αποτελεσμάτων των δοκιμών,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων.

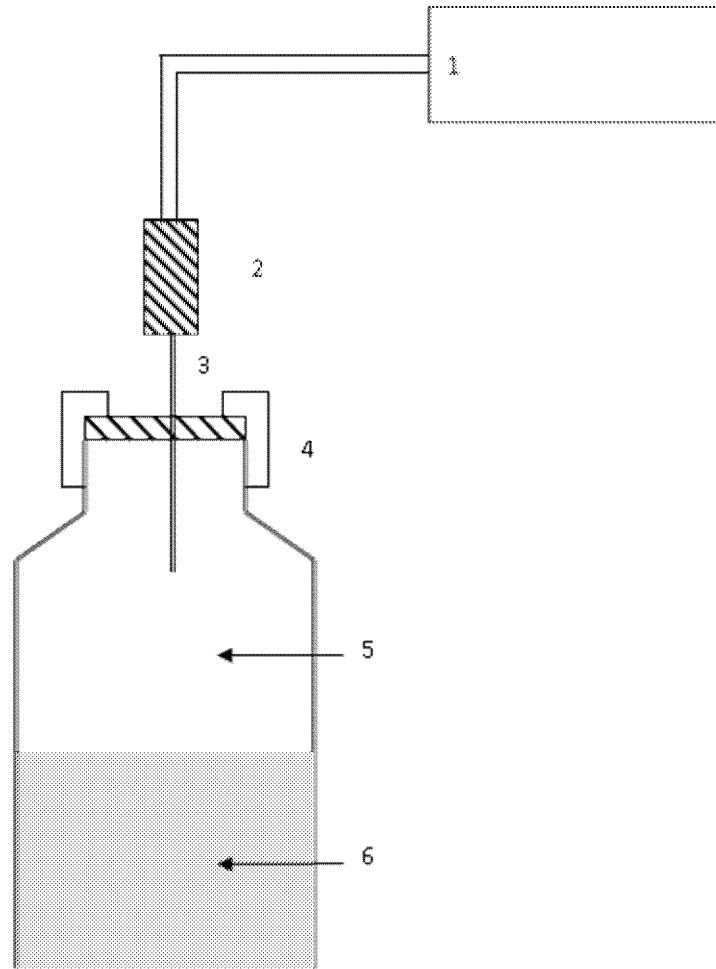
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:
- Γ.4, Προσδιορισμός της άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας,
- Γ.9, Βιοαποικοδόμηση — Δοκιμή Zahn-Wellens,
- Γ.10, Δοκιμή προσομοίωσης — Αερόβια επεξεργασία λυμάτων:
- A: Μονάδες ενεργοποιημένης ιλύος, B: Βιομεμβράνες
- Γ.11, Βιοαποικοδόμηση — Αναστολή αναπνοής ενεργοποιημένης ιλύος
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, Ap. 302C, ΟΟΣΑ, Παρίσι

- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. και Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Έχει εκδοθεί επίσης ως τεχνική έκθεση ECETOC Αρ. 28, Ιούνιος 1988).
 - (4) Shelton D.R. και 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. και McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. και 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. Έγγραφο εργασίας. Προσχέδιο 2 Αρ. 35.24. Αμερικανική εταιρεία δοκιμών υλικών, Φιλαδέλφεια.
 - (8) Battersby, N.S. και 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, Φιλαδέλφεια.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (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) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
 - (13) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (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. και Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Προσάρτημα 1

Παράδειγμα συσκευής για μέτρησή τη παράγωγης βιοαερίου μέσω τη πίεσης αέριου



Υπόμνημα:

- 1 — Μετρητής πίεσης
- 2 — Τριοδική αεροστεγανή βαλβίδα
- 3 — Βελόνα σύριγγας
- 4 — Αεροστεγανή σφράγιση (πώμα και διάφραγμα)
- 5 — Υπερκείμενος χώρος (V_h)
- 6 — Εμβόλιο χωνευμένης ιλύος (V_l)

Δοχεία δοκιμής σε περιβάλλον με θερμοκρασία $35\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$

Προσάρτημα 2

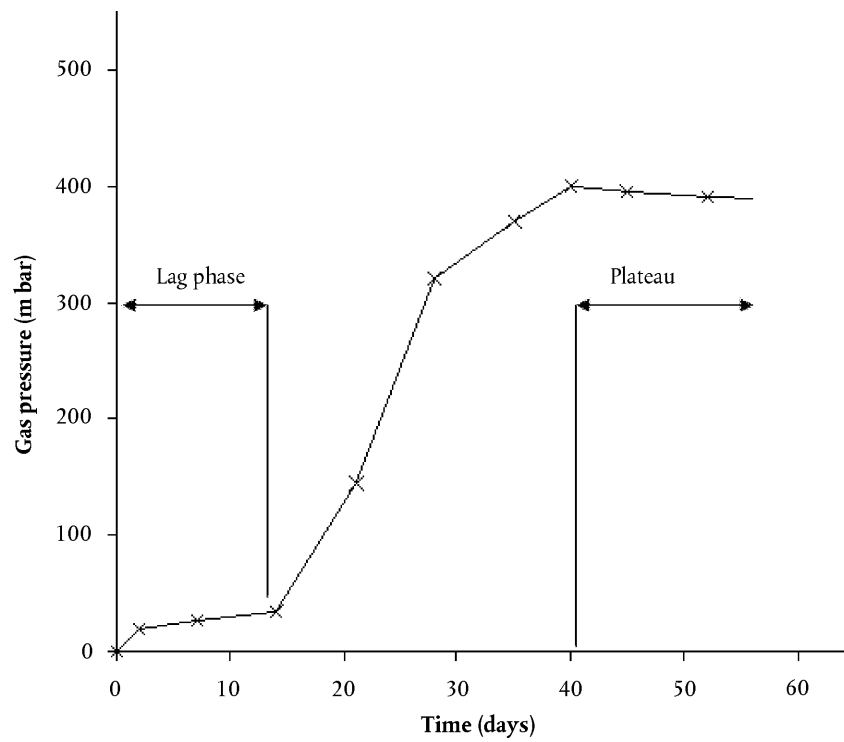
Μετατροπή του μετρητή πίεσης

Οι ενδείξεις του μετρητή πίεσης μπορεί να σχετίζονται με τους όγκους αερίου μέσω μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από την έγχυση γνωστών όγκων αέρα στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε φιάλες ορού που περιέχουν όγκο νερού ίσο με τον όγκο του μείγματος αντίδρασης, V_R :

- Διανέμονται κλάσματα νερού V_R ml, τα οποία διατηρούνται στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε πέντε φιάλες ορού. Οι φιάλες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε ένα υδατόλουτρο στους $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα για επίτευξη εξισορρόπησης,
- Ενεργοποιείται ο μετρητής πίεσης, αφήνεται να σταθεροποιηθεί και προσαρμόζεται στο μηδέν,
- Εισάγεται η βελόνα σύριγγας μέσω της σφράγισης σε μία από τις φιάλες, ανοίγεται η βαλβίδα μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί και μετά κλείνεται η βαλβίδα,
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τις υπόλοιπες φιάλες.
- Εγχέεται 1 ml αέρα στους $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε κάθε φιάλη. Εισάγεται η βελόνα (στον μετρητή) μέσω της σφράγισης σε μία από τις φιάλες και αφήνεται ώστε να σταθεροποιηθεί η ένδειξη πίεσης. Καταγράφεται η πίεση, ανοίγεται η βαλβίδα μέχρι η ένδειξη του μετρητή πίεσης να μηδενιστεί και μετά κλείνεται η βαλβίδα,
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες φιάλες,
- Επαναλαμβάνεται ολόκληρη η παραπάνω διαδικασία με χρήση 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml και 50 ml αέρα,
- Σχεδιάζεται μια καμπύλη μετατροπής της πίεσης (Pa) συναρτήσεως του όγκου αερίου που εγχύθηκε V_b (ml). Η ανταπόκριση του οργάνου είναι γραμμική στην περιοχή από 0 Pa έως 70 000 Pa και για παραγωγή αερίου από 0 ml έως 50 ml.

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα Καμπύλης βιοαποικοδνημησης (αθροιστική καθαρή αύξηση πίεσης)



Προσάρτημα 4

Παράδειγμά φύλλων δεδομένων για τη δοκιμή αναερόβιας βιοαποικοδομήσιμος — φύλλο δεδομένων για την ελεγχόμενη ουσία

Εργαστήριο: Υπό δοκιμή ουσία: Αρ. δοκιμής:
 Θερμοκρασία δοκιμής(°C): Όγκος υπερκείμενου χώρου (V_h):(l) Όγκος υγρού (V_l): (l)
 Άνθρακας στην υπό δοκιμή ουσία $C_{c,v}$:(mg/l) m_v (¹):..... (mg)

| Ημέρα | p_1 (δοκιμή) (mbar) | p_2 (δοκιμή) (mbar) | p_3 (δοκιμή) (mbar) | p (δοκιμή) μέση τιμή (mbar) | p_4 (τυφλό) (mbar) | p_5 (τυφλό) (mbar) | p_6 (τυφλό) (mbar) | p (τυφλό) μέση τιμή (mbar) | p (καθαρό) δοκιμή — τυφλό μέση τιμή (mbar) | Δp (καθαρό) Αθροιστικά στοιχεία (mbar) | m_h υπερκείμε- νος χώρος C (²) (mg) | D_h Βιοαποικο- δόμηση (³) (%) |
|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | $C_{IC,1}$ δοκιμή (mg) | $C_{IC,2}$ δοκιμή (mg) | $C_{IC,3}$ δοκιμή (mg) | C_{IC} μέση τιμή δοκιμής (mg) | $C_{IC,4}$ τυφλό (mg) | $C_{IC,5}$ τυφλό (mg) | $C_{IC,6}$ τυφλό (mg) | C_{IC} μέση τιμή τυφλού (mg) | $C_{IC,net}$ δοκιμή — τυφλό μέση τιμή (mg) | m_l υγρός C (⁴) (mg) | m_t συνολικός C (⁵) (mg) | D_t Βιοαποικο- δόμηση (⁶) (%) |
| IC (τέλος) | | | | | | | | | | | | |
| pH (τέλος) | | | | | | | | | | | | |

(¹) Άνθρακας στο δοχείο δοκιμής, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$
 (²) Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο, m_h (mg) σε κανονική θερμοκρασία επώασης (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$
 (³) Βιοαποικοδόμηση που υπολογίζεται από το αέριο του υπερκείμενου χώρου, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
 (⁴) Άνθρακας στο υγρό, ml (mg): $ml = C_{IC,net} \times V_l$
 (⁵) Συνολικός αεριοποιημένος άνθρακας, mt (mg): $mt = m_l + m_t$
 (⁶) Συνολική βιοαποικοδόμηση, Dt (%): $Dt = (mt \times 100) / m_v$

Εργαστήριο: Ουσία αναφοράς: Αρ. δοκιμής:
 Θερμοκρασία δοκιμής (°C): Όγκος υπερκείμενου χώρου (V_h): (l) Όγκος υγρού (V_l) (λίτρα):
 Άνθρακας στην ουσία αναφοράς $C_{c,v}$ (mg/l): m_v ⁽¹⁾ (mg):

| Ημέρα | p_1 (αναφ.) (mbar) | p_2 (αναφ.) (mbar) | p_3 (αναφ.) (mbar) | p (αναφ.) μέση τιμή (mbar) | p_4 (αναστ.) (mbar) | p_5 (αναστ.) (mbar) | p_6 (αναστ.) (mbar) | p (αναστ.) μέση τιμή (mbar) | p (αναφ.) αναφ. — τυφλό (mbar) | Δp (αναφ.) αθροιστικά στοιχεία (mbar) | m_h υπερκείμε- νος χώρος C ⁽²⁾ (mg) | D_h Βιοαποικο- δόμηση ⁽³⁾ (%) |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | $C_{ic,1}$ αναφ. (mg) | $C_{ic,2}$ αναφ. (mg) | $C_{ic,3}$ αναφ. (mg) | C_{ic} μέση τιμή αναφ. (mg) | $C_{ic,4}$ αναστ. (mg) | $C_{ic,5}$ αναστ. (mg) | $C_{ic,6}$ αναστ. (mg) | C_{ic} μέση τιμή αναστ. (mg) | $C_{ic,net}$ αναφ. — αναστ. (mg) | m_l υγρός C ⁽⁴⁾ (mg) | m_t συνολικός C ⁽⁵⁾ (mg) | D_t Βιοαποικο- δόμηση ⁽⁶⁾ (%) |
| IC (τέλος) | | | | | | | | | | | | |
| pH (τέλος) | | | | | | | | | | | | |

⁽¹⁾ Άνθρακας στο δοχείο δοκιμής, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

⁽²⁾ Άνθρακας στον υπερκείμενο χώρο, m_h (mg) σε κανονική θερμοκρασία επώασης (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Βιοαποικοδόμηση που υπολογίζεται από το αέριο του υπερκείμενου χώρου, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

⁽⁴⁾ Άνθρακας στο υγρό, m_l (mg): $m_l = C_{ic,net} \times V_l$

⁽⁵⁾ Συνολικός αεριοποιημένος άνθρακας, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Συνολική βιοαποικοδόμηση, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

Γ.44. ΑΠΟΠΛΥΣΗ ΣΕ ΣΤΗΛΕΣ ΕΔΑΦΟΥΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμική δοκιμών (TG) 312 του ΟΟΣΑ (2004). Οι ανθρωπογενείς χημικές ουσίες μπορεί να φτάσουν στο έδαφος άμεσα μέσω σκόπιμης εφαρμογής (π.χ. αγροχημικά προϊόντα) ή μέσω έμμεσων οδών (π.χ. μέσω λυμάτων → λυματολάσσης → εδάφους ή αέρα → υγρής/ξηρής εναπόθεσης). Για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος αυτών των χημικών ουσιών, είναι σημαντικό να υπολογιστεί το δυναμικό τους για μετατροπή στο έδαφος και για μετακίνηση (απόπλυση) στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους και εν τέλει στα υπόγεια ύδατα.
2. Υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές μέθοδοι για τη μέτρηση του δυναμικού απόπλυσης χημικών ουσιών στο έδαφος κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, δηλ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του εδάφους, χρωματογραφία παχιάς στιβάδας του εδάφους, χρωματογραφία στήλης του εδάφους και μετρήσεις προσρόφησης — εκρόφησης (1)(2). Για μη ιονισμένες χημικές ουσίες, ο συντελεστής κατανομής n -οκτανόλης/νερού (P_{ow}) επιτρέπει την πρόιμη εκτίμηση του δυναμικού προσρόφησης και απόπλυσής τους (3)(4)(5).
3. Η μέθοδος που περιγράφεται σε αυτήν τη μέθοδο δοκιμών βασίζεται στη χρωματογραφία στήλης του εδάφους σε διαταραγμένο έδαφος (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1). Διενεργούνται δύο είδη πειραμάτων για τον προσδιορισμό (i) του δυναμικού απόπλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και (ii) του δυναμικού απόπλυσης των προϊόντων μετατροπής (μελέτη με παλαιωμένα υπολείμματα) σε εδάφη κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες (1). Η μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. Σε συνάντηση εργασίας του ΟΟΣΑ για την επιλογή εδαφών/ίζημάτων, που πραγματοποιήθηκε στο Belgirate, στην Ιταλία, το 1995 (12) συμφωνήθηκε ο αριθμός και ο τύπος των προς χρήση εδαφών στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Επίσης διατυπώθηκαν συστάσεις σχετικά με τη συλλογή, τον χειρισμό και την αποθήκευση δειγμάτων εδάφους για πειράματα απόπλυσης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

5. Στήλες κατασκευασμένες από κατάλληλα αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, teflon, PVC κ.λπ.) συσκευάζονται με έδαφος και στη συνέχεια υποκείνται σε κορεσμό και εξισορρόπηση με διάλυμα “τεχνητής βροχής” (για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) και αφήνονται για αποστράγγιση. Κατόπιν, στην επιφάνεια κάθε στήλης εδάφους τοποθετείται η υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και παλαιωμένα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τεχνητή βροχή στις στήλες εδάφους και συλλέγεται το απόπλυμα. Μετά τη διαδικασία απόπλυσης, το έδαφος αφαιρείται από τις στήλες και χωρίζεται στον ανάλογο αριθμό τμημάτων με βάση τις πληροφορίες που απαιτούνται από τη μελέτη. Στη συνέχεια, κάθε τμήμα εδάφους καθώς και το απόπλυμα αναλύονται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής ή άλλων χημικών ουσιών ενδιαφέροντος.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

6. Η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται στις υπό δοκιμή χημικές ουσίες (μη επισημασμένες ή ραδιοσημασμένες: π.χ. ^{14}C) για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμη αναλυτική μέθοδος επαρκούς ακρίβειας και ευαισθησίας. Η μέθοδος δοκιμών δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται σε χημικές ουσίες που είναι πτητικές από το έδαφος και το νερό και επομένως δεν παραμένουν στο έδαφος ή/και στο απόπλυμα κάτω από τις πειραματικές συνθήκες αυτής της μεθόδου δοκιμών.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

7. Μπορούν να χρησιμοποιούνται μη επισημασμένες ή ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή χημικές ουσίες για τη μέτρηση της συμπεριφοράς απόπλυσης σε στήλες εδάφους. Για τη μελέτη της απόπλυσης των προϊόντων μετατροπής (παλαιωμένα υπολείμματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) και για προσδιορισμούς ισοζυγίων μάζας απαιτείται ραδιοσημασμένο υλικό. Συνιστάται η επισήμανση ^{14}C , πλην όμως η χρήση άλλων ισότοπων, όπως των ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη. Στο μέτρο του δυνατού, το ισότοπο πρέπει να τοποθετείται στο/στα σταθερότερο(-α) μέρος(-η) του μορίου. Η καθαρότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 95 %.
8. Οι περισσότερες χημικές ουσίες θα πρέπει να εφαρμόζονται ως μεμονωμένη ουσία. Ωστόσο, για δραστικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, μπορούν να χρησιμοποιούνται σκευάσματα για τη μελέτη της απόπλυσης της μητρικής υπό δοκιμή χημικής ουσίας, αλλά απαιτείται ιδιαίτερα να πραγματοποιούνται δοκιμές σε αυτά όταν το μείγμα είναι πιθανό να επηρεάσει τον ρυθμό αποδέσμευσης (π.χ. κοκκώδη σκευάσματα ή σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης). Σχετικά με τις ειδικές απαιτήσεις του μείγματος για τον σχεδιασμό της δοκιμής, ενδέχεται να είναι χρήσιμες οι διαβουλεύσεις με τη ρυθμιστική αρχή πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής. Για μελέτες απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η καθαρή μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία.

(1) Μελέτες απόπλυσης στήλης με φυτοπροστατευτικά προϊόντα ενδέχεται να παράσχουν πληροφορίες για την κινητικότητα μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής της, καθώς και να συμπληρώσουν ένα σύνολο μελετών ρόφησης.

9. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμών απόπλυσης σε στήλες εδάφους, θα πρέπει, κατά προτίμηση, να είναι διαθέσιμα τα ακόλουθα στοιχεία για την υπό δοκιμή χημική ουσία:
- (1) υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών A.6] (13),
 - (2) διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες,
 - (3) τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών A.4](13) και σταθερά του νόμου του Henry,
 - (4) συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης/νερού [μέθοδοι δοκιμών A.8 και A.24] (13),
 - (5) συντελεστής προσρόφησης (K_d , K_f ή K_{oc}) [μέθοδοι δοκιμών Γ.18 ή/και Γ.19] (13),
 - (6) υδρόλυση [μέθοδος δοκιμών Γ.7] (13),
 - (7) σταθερά διαστάσεως (pK_a) [κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 112 του ΟΟΣΑ] (25),
 - (8) αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος [μέθοδος δοκιμών Γ.23] (13)
- Σημείωση: Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν αυτές οι μετρήσεις θα πρέπει να αναφέρεται στις αντίστοιχες εκθέσεις της δοκιμής.

10. Η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους θα πρέπει να είναι επαρκής για να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση τουλάχιστον 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα. Για δραστικές χημικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται μπορεί να αντιστοιχεί στη μέγιστη συνιστώμενη αναλογία χρήσης (μία εφαρμογή).
11. Πρέπει να υπάρχει κατάλληλη αναλυτική μέθοδος γνωστής ακρίβειας (accuracy), πιστότητας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής της σε έδαφος και απόπλυμα. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστό το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των σημαντικών προϊόντων μετατροπής της (κανονικά τουλάχιστον όλα τα προϊόντα μετατροπής ≥ 10 % της εφαρμοζόμενης δόσης που παρατηρούνται στις μελέτες της οδού μετατροπής, αλλά κατά προτίμηση κάθε σχετικό προϊόν μετατροπής ενδιαφέροντος) (βλ. παράγραφο 17).

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

12. Για την αξιολόγηση της σχετικής κινητικότητας της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στο έδαφος, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες αναφοράς με γνωστή συμπεριφορά απόπλυσης, όπως η ατραζίνη ή το μονουρόν που μπορούν να θεωρούνται μέτριοι παράγοντες απόπλυσης στο έδαφος (1)(8)(11). Μια μη προσροφητική και μη αποικοδομήσιμη πολική χημική ουσία αναφοράς (π.χ. τρίτιο, βρωμίδιο, φλουορεσκεΐνη, ηωσίνη) για την παρακολούθηση της κίνησης του νερού στη στήλη ενδέχεται να είναι επίσης χρήσιμη για την επιβεβαίωση των υδροδυναμικών ιδιοτήτων της στήλης εδάφους.
13. Για τον χαρακτηρισμό ή/και την ταυτοποίηση προϊόντων μετατροπής που περιέχονται στα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα μέσω χρωματογραφικής, φασματοσκοπικής ή άλλης σχετικής μεθόδου ενδέχεται να είναι χρήσιμες και τυποποιημένες χημικές ουσίες ανάλυσης.

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

14. Βλέπε προσάρτημα 1.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ανάκτηση

15. Το άθροισμα των ποσοστών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που βρίσκεται στα τμήματα του εδάφους και στο απόπλυμα της στήλης μετά την απόπλυση παρέχει την ανάκτηση για ένα πείραμα απόπλυσης. Τα ποσοστά ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνονται από 90 έως 110 % για ραδιοσημασμένες χημικές ουσίες (11) και από 70 έως 110 % για μη επισημασμένες χημικές ουσίες (8).

Επαναληψιμότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου

16. Η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής μπορεί να ελέγχεται με μια δεύτερη ανάλυση του ίδιου εκχυλίσματος ενός τμήματος εδάφους ή ενός αποπλύματος (βλ. παράγραφο 11).

17. Το όριο ανίχνευσης (LOD) της αναλυτικής μεθόδου για την υπό δοκιμή χημική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ σε κάθε τμήμα εδάφους ή απόπλυμα (ως υπό δοκιμή χημική ουσία) ή 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα, όποια τιμή είναι χαμηλότερη. Θα πρέπει επίσης να προσδιορίζεται και το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

Σύστημα δοκιμής

18. Για τη δοκιμή χρησιμοποιούνται στήλες απόπλυσης (με ή χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα) κατασκευασμένες από κατάλληλα αδρανές υλικό (π.χ. γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, teflon, PVC κ.λπ.) με εσωτερική διάμετρο τουλάχιστον 4 cm και ελάχιστο ύψος 35 cm. Τα υλικά των στηλών θα πρέπει να ελέγχονται για πιθανές αλληλεπιδράσεις με την υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και τα προϊόντα μετατροπής της. Παραδείγματα κατάλληλων στηλών με ή χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα παρουσιάζονται στο προσάρτημα 2.
19. Για την πλήρωση και συσκευασία των στηλών εδάφους χρησιμοποιείται κουτάλι, έμβολο και συσκευή δόνησης.
20. Για την εφαρμογή τεχνητής βροχής στις στήλες εδάφους μπορούν να χρησιμοποιούνται εμβολοφόρες ή περισταλτικές αντλίες, κεφαλές κατάβρεξης, φιάλες Mariotte ή απλές σταγονομετρικές χροάνες.

Εργαστηριακός εξοπλισμός και χημικές ουσίες

21. Απαιτείται συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός, και ειδικότερα:
- (1) αναλυτικά όργανα, όπως συσκευές αέριας χρωματογραφίας υγρού-αέριου (GLC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), συμπεριλαμβανομένων κατάλληλων συστημάτων ανίχνευσης για την ανάλυση επισημασμένων ή μη επισημασμένων χημικών ουσιών ή για τη μέθοδο αντίστροφης αραίωσης ισοτόπων,
 - (2) όργανα ταυτοποίησης (π.χ. φασματομετρίας μάζας (MS), αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) κ.λπ.),
 - (3) μετρητής υγρού σπινθηρισμού για ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία,
 - (4) οξειδωτής για την καύση του επισημασμένου υλικού,
 - (5) συσκευή εκχύλισης (π.χ. σωλήνες φυγοκέντρου για ψυχρή εκχύλιση και συσκευή Soxhlet για συνεχή εκχύλιση υπό αναρροή),
 - (6) συσκευές για τη συμπύκνωση διαλυμάτων και εκχυλισμάτων (π.χ. περιστρεφόμενος εξατμιστήρας).
22. Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν: οργανικούς διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας, όπως ακετόνη, μεθανόλη κ.λπ., υγρό σπινθηρισμού, διάλυμα CaCl_2 0,01 M σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (= τεχνητή βροχή).

Υπό δοκιμή χημική ουσία

23. Για την εφαρμογή της υπό δοκιμή χημικής ουσίας στη στήλη εδάφους, η ουσία θα πρέπει να διαλύεται σε νερό (απιονισμένο ή απεσταγμένο). Εάν η υπό δοκιμή χημική ουσία είναι δυσδιάλυτη στο νερό, μπορεί να εφαρμόζεται είτε ως σκεύασμα (εάν είναι απαραίτητο, κατόπιν σχηματισμού εναιωρήματος ή γαλακτώματος σε νερό) ή μέσα σε οποιονδήποτε οργανικό διαλύτη. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης, θα πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο και να εξατμίζεται από την επιφάνεια της στήλης εδάφους πριν από την έναρξη της διαδικασίας απόπλυσης. Τα στερεά σκευάσματα, όπως κοκκία, θα πρέπει να εφαρμόζονται στη στερεά μορφή χωρίς νερό. Για την καλύτερη κατανομή σε ολόκληρη την επιφάνεια της στήλης εδάφους, το σκεύασμα μπορεί να αναμειγνύεται με μια μικρή ποσότητα χαλαζιακής άμμου (π.χ. 1 g) πριν από την εφαρμογή.
24. Η ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας που εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους θα πρέπει να είναι επαρκής για να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση τουλάχιστον 0,5 % της εφαρμοζόμενης δόσης σε οποιοδήποτε μεμονωμένο τμήμα. Για δραστικές χημικές ουσίες σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αυτή μπορεί να βασίζεται στη μέγιστη συνιστώμενη αναλογία χρήσης (αναλογία μίας εφαρμογής) και θα πρέπει να σχετίζεται με την επιφάνεια της στήλης εδάφους που χρησιμοποιείται, τόσο για την απόπλυση της μητρικής υπό δοκιμή χημικής ουσίας όσο και των παλαιωμένων υπολειμμάτων⁽¹⁾.

(¹) Η ποσότητα προς εφαρμογή σε κυλινδρικές στήλες εδάφους μπορεί να υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

όπου:

M = εφαρμοζόμενη ποσότητα ανά στήλη [μg]

A = αναλογία εφαρμογής [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = διάμετρος της στήλης εδάφους [cm]

π = 3,14

Χημική ουσία αναφοράς

25. Στα πειράματα απόπλυσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται μια χημική ουσία αναφοράς (βλ. παράγραφο 12). Θα πρέπει να εφαρμόζεται στην επιφάνεια της στήλης εδάφους με παρόμοιο τρόπο όπως και για την υπό δοκιμή χημική ουσία και σε κατάλληλη αναλογία η οποία επιτρέπει την επαρκή ανίχνευσή της είτε ως εσωτερικό πρότυπο μαζί με την υπό δοκιμή χημική ουσία στην ίδια στήλη εδάφους είτε ξεχωριστά σε άλλη στήλη εδάφους. Προτιμάται οι δύο χημικές ουσίες να εφαρμόζονται στην ίδια στήλη, εκτός εάν έχουν και οι δύο παρόμοια επισημάνση.

Εδάφη*Επιλογή εδάφους*

26. Για μελέτες απόπλυσης με τη μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 3 έως 4 εδάφη διαφορετικού pH, διαφορετικής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και διαφορετικής υφής (12). Καθοδήγηση για την επιλογή εδαφών για πειράματα απόπλυσης παρέχεται παρακάτω στον πίνακα 1. Για ιοντικές υπό δοκιμή χημικές ουσίες, τα επιλεγμένα εδάφη θα πρέπει να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος pH, προκειμένου να αξιολογείται η κινητικότητα της χημικής ουσίας στις ιοντικές και μη ιοντικές μορφές της. Τουλάχιστον 3 εδάφη θα πρέπει να έχουν pH στο οποίο η υπό δοκιμή χημική ουσία βρίσκεται στην κινητή μορφή της.

Πίνακας 1

Καθοδήγηση για την επιλογή εδαφών για μελέτες απόπλυσης

| Αρ. εδάφους | Τιμή pH | Οργανικός άνθρακας % | Περιεκτικότητα αργίλου % | Υφή (*) |
|-------------|-------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1 | > 7,5 | 3,5-5,0 | 20-40 | αργιλώδης πηλός |
| 2 | 5,5-7,0 | 1,5-3,0 | 15-25 | προσχωσιγενής άργιλος |
| 3 | 4,0-5,5 | 3,0-4,0 | 15-30 | πηλός |
| 4 | < 4,0-6,0 § | < 0,5-1,5 § ‡ | < 10-15 § | αργιλώδης άμμος |
| 5 | < 4,5 | > 10 # | < 10 | αργιλώδης άμμος/άμμος |

(*) Σύμφωνα με τα συστήματα FAO και USDA (14).

§ Οι αντίστοιχες μεταβλητές θα πρέπει, κατά προτίμηση, να έχουν τιμές μέσα στην προβλεπόμενη περιοχή. Εάν, εντούτοις, συναντώνται δυσκολίες στην ανεύρεση κατάλληλων εδαφών, είναι αποδεκτές και τιμές κάτω της υποδεικνυόμενης ελάχιστης τιμής.

‡ Εδάφη με λιγότερο από 0,3 % οργανικό άνθρακα μπορεί να διαταράξουν τη σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και προσρόφησης. Συνιστάται λοιπόν η χρήση εδαφών με περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα τουλάχιστον 0,3 %.

Τα εδάφη με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα (π.χ. > 10 %) ενδεχομένως να μην είναι νομικώς αποδεκτά, π.χ. για λόγους καταχώρισης φυτοφαρμάκων.

27. Ορισμένες φορές μπορεί να απαιτούνται άλλοι τύποι εδαφών ώστε να αντιπροσωπεύονται ψυχρότερες, εύκρατες και τροπικές περιοχές. Επομένως, εάν προτιμώνται άλλοι τύποι εδάφους, θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από τις ίδιες παραμέτρους και να παρουσιάζουν παρόμοιες διακυμάνσεις στις ιδιότητες με αυτές που περιγράφονται στην καθοδήγηση όσον αφορά την επιλογή εδαφών για μελέτες απόπλυσης (βλ. πίνακα 1 παραπάνω), ακόμη και εάν δεν ανταποκρίνονται στα κριτήρια επακριβώς.
28. Για μελέτες απόπλυσης με “παλαιωμένα υπολείμματα”, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα έδαφος (12). Θα πρέπει να έχει περιεκτικότητα άμμου > 70 % και περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα μεταξύ 0,5-1,5 % (π.χ. έδαφος αρ. 4 στον πίνακα 1). Ενδεχομένως να απαιτείται η χρήση περισσότερων τύπων εδάφους εάν τα δεδομένα για τα προϊόντα μετατροπής είναι σημαντικά.

29. Όλα τα εδάφη θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον όσον αφορά την υφή [% άμμου, % ιλύος, % αργίλου σύμφωνα με τα συστήματα ταξινόμησης FAO και USDA (14)], το pH, το δυναμικό ανταλλαγής κατιόντων, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, τη φαινόμενη πυκνότητα (για διαταραγμένα εδάφη) και την ικανότητα κατακράτησης ύδατος. Η μέτρηση της μικροβιακής βιομάζας απαιτείται μόνο για εδάφος που χρησιμοποιείται κατά την περίοδο παλαιώσης/επώασης, η οποία διεξάγεται πριν από το πείραμα απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, μπορεί να είναι χρήσιμες πληροφορίες για πρόσθετες ιδιότητες του εδάφους (π.χ. ταξινόμηση του εδάφους, ορυκτολογία αργίλου, ειδική έκταση επιφάνειας). Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των εδαφών, μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι που συνιστώνται στις παραπομπές (15)(16)(17)(18)(19).

Συλλογή και αποθήκευση εδαφών

30. Τα εδάφη θα πρέπει να λαμβάνονται από το ανώτερο στρώμα (ορίζοντας A) σε μέγιστο βάθος 20 cm. Τα υπολείμματα από βλάστηση, μικροπανίδα και πέτρες θα πρέπει να απομακρύνονται. Τα εδάφη (εκτός αυτών που χρησιμοποιούνται για την παλαιώση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας) ξηραίνονται στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου (κατά προτίμηση μεταξύ 20 και 25 °C). Τυχόν αποσυσσωμάτωση θα πρέπει να πραγματοποιείται με την ελάχιστη δυνατή δύναμη, έτσι ώστε η αρχική υφή του εδάφους να παραμένει κατά το δυνατόν αναλλοίωτη. Τα εδάφη κοσκινίζονται με κόσκινο ≤ 2 mm. Συνιστάται προσεκτική ομοιογενοποίηση, καθώς έτσι ενισχύεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Πριν από τη χρήση, τα εδάφη μπορούν να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και να διατηρούνται αερόξεηρα (12). Δεν προβλέπεται κάποιο χρονικό όριο στην αποθήκευση, τα εδάφη όμως που αποθηκεύονται για διάστημα μεγαλύτερο των 3 χρόνων θα πρέπει να επανυποβάλλονται, προτού χρησιμοποιηθούν, σε ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα και το pH.
31. Θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς πληροφορίες για το ιστορικό των τόπων απ' όπου συλλέγονται τα εδάφη δοκιμής. Οι λεπτομέρειες περιλαμβάνουν την ακριβή τοποθεσία [καθορίζεται επακριβώς από το UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ή τις γεωγραφικές συντεταγμένες], την κάλυψη της βλάστησης, τις αγωγές με φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες, τις αγωγές με οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, τις προσθήκες βιολογικών υλικών ή την τυχαία ρύπανση (12). Εάν το έδαφος έχει υποστεί κατεργασία με την υπό δοκιμή χημική ουσία ή δομικά της ανάλογα μέσα στα προηγούμενα τέσσερα χρόνια, αυτό το έδαφος δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για μελέτες απόπλυσης.

Συνθήκες δοκιμής

32. Κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής, οι στήλες απόπλυσης εδαφους θα πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εφόσον η θερμοκρασία αυτή δεν παρουσιάζει αποκλίσεις μεγαλύτερες από ± 2 °C. Οι συνιστώμενες θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 18 και 25 °C.
33. Στην επιφάνεια των στηλών εδαφους θα πρέπει να εφαρμόζεται συνεχώς τεχνητή βροχή (CaCl_2 0,01 M) με ρυθμό 200 mm για περίοδο 48 ωρών⁽¹⁾. Ο ρυθμός αυτός ισοδυναμεί με την εφαρμογή 251 ml για μια στήλη με εσωτερική διάμετρο 4 cm. Εάν απαιτείται για τον σκοπό της δοκιμής, μπορούν να χρησιμοποιούνται επιπλέον άλλοι ρυθμοί και μεγαλύτερες διάρκειες τεχνητής βροχοπτώσης.

Εκτέλεση της δοκιμής

Απόπλυση με μητρική υπό δοκιμή χημική ουσία

34. Συσκευάζονται τουλάχιστον διπλές στήλες απόπλυσης με μη κατεργασμένο, αερόξεηρο και κοσκινισμένο έδαφος (< 2 mm) σε ύψος μέχρι περίπου 30 cm. Για την επίτευξη ομοιομορφής συσκευασίας, το έδαφος προστίθεται στις στήλες σε μικρές ποσότητες με ένα κουτάλι και πιέζεται με ένα έμβολο υπό ταυτόχρονη ήπια δόνηση της στήλης μέχρι να μην είναι δυνατό να βυθιστεί περαιτέρω το επάνω μέρος της στήλης εδαφους. Η ομοιομορφή συσκευασία είναι απαραίτητη προκειμένου να λαμβάνονται αναπαραγόμενα αποτελέσματα από τις στήλες απόπλυσης. Για λεπτομέρειες σχετικά με τις τεχνικές συσκευασίας της στήλης, βλ. τις παραπομπές (20)(21) και (22). Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της διαδικασίας συσκευασίας, προσδιορίζεται το συνολικό βάρος του εδαφους που συσκευάζεται στις στήλες⁽²⁾. Τα βάρη των διπλών στηλών θα πρέπει να είναι παρόμοια.

⁽¹⁾ Με αυτόν τον τρόπο, προσομοιώνονται εξαιρετικά υψηλές βροχοπτώσεις. Η μέση ετήσια βροχοπτώση, για παράδειγμα, στην Κεντρική Ευρώπη είναι της τάξεως των 800-1 000 mm.

⁽²⁾ Παραδείγματα φαινόμενων πυκνοτήτων για διαταραγμένα εδάφη είναι τα εξής:
για αμμώδες έδαφος $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
για αργιλώδες αμμώδες έδαφος $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
για αργιλώδες έδαφος $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
για λασπώδες έδαφος $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

35. Μετά τη συσκευασία, οι στήλες εδάφους υφίστανται προδιαβροχή με τεχνητή βροχή (CaCl_2 0,01 M) από κάτω προς τα επάνω, προκειμένου το νερό να μετατοπίσει τον αέρα από τους πόρους του εδάφους. Στη συνέχεια, οι στήλες εδάφους αφήνονται για να επιτευχθεί εξισορρόπηση και η περίσσεια νερού αποστραγγίζεται μέσω της βαρύτητας. Μέθοδοι για τον κορεσμό της στήλης εξετάζονται στην παραπομπή (23).
36. Κατόπιν, η υπό δοκιμή χημική ουσία ή/και η χημική ουσία αναφοράς εφαρμόζεται στις στήλες εδάφους (βλ. επίσης παραγράφους 23-25). Για την επίτευξη ομοιόμορφης κατανομής, τα διαλύματα, τα εναιωρήματα ή τα γαλακτώματα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή/και της ουσίας αναφοράς θα πρέπει να εφαρμόζονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια των στηλών εδάφους. Εάν για την εφαρμογή μιας υπό δοκιμή χημικής ουσίας συνιστάται ενσωμάτωση στο έδαφος, αυτή θα πρέπει να αναμειγνύεται με μια μικρή ποσότητα (π.χ. 20 g) εδάφους και να προστίθεται στην επιφάνεια της στήλης εδάφους.
37. Κατόπιν, οι επιφάνειες των στηλών εδάφους καλύπτονται από δίσκο συντηγμένου γυαλιού, γυάλινους κόκκους, φίλτρα υαλοϊνών ή ένα στρογγυλό διηθητικό χαρτί για την ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής σε ολόκληρη την επιφάνεια και για την αποφυγή διαταραχής της επιφάνειας του εδάφους από τις σταγόνες της βροχής. Όσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος της στήλης, τόσο περισσότερη μέριμνα απαιτείται για την εφαρμογή της τεχνητής βροχής στις στήλες εδάφους, ώστε να διασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής στην επιφάνεια του εδάφους. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται τεχνητή βροχόπτωση στις στήλες εδάφους, υπό μορφή σταγόνων, με τη βοήθεια εμβολοφόρας ή περισταλτικής αντλίας ή σταγονομετρικής χοάνης. Κατά προτίμηση, τα αποπλύματα θα πρέπει να συλλέγονται σε κλάσματα και να καταγράφονται οι αντίστοιχοι όγκοι τους (1).
38. Μετά την απόπλυση και την αποστράγγιση των στηλών, οι στήλες εδάφους χωρίζεται στον κατάλληλο αριθμό τμημάτων, ανάλογα με τις πληροφορίες που απαιτείται να ληφθούν από τη μελέτη, τα τμήματα εκχυλίζονται με κατάλληλους διαλύτες ή μείγματα διαλυτών και αναλύονται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, των προϊόντων μετατροπής, της συνολικής ραδιενέργειας και της χημικής ουσίας αναφοράς. Τα αποπλύματα ή τα κλάσματα αποπλυμάτων αναλύονται άμεσα ή κατόπιν εκχύλισης για τα ίδια προϊόντα. Όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία, θα πρέπει να ταυτοποιούνται όλα τα κλάσματα που περιέχουν ≥ 10 % της εφαρμοζόμενης ραδιενέργειας.

Απόπλυση με παλαιωμένα υπολείμματα

39. Φρέσκο έδαφος (που δεν έχει ξηρανθεί προηγουμένως στον αέρα) υποβάλλεται σε κατεργασία με τη ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή χημική ουσία με ρυθμό που αντιστοιχεί στην έκταση επιφάνειας των στηλών εδάφους (βλ. παράγραφο 24) και επωάζεται κάτω από αερόβιες συνθήκες σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.23 (13). Η διάρκεια της περιόδου επώασης (παλαιώσης) θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να παράγονται σημαντικές ποσότητες προϊόντων μετατροπής. Συνιστάται περίοδος παλαιώσης διάρκειας ενός χρόνου ημιζωής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (2), η οποία όμως δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 120 ημέρες. Πριν από την απόπλυση, το παλαιωμένο έδαφος αναλύεται για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και των προϊόντων μετατροπής της.
40. Οι στήλες απόπλυσης συσκευάζονται σε ύψος έως 28 cm με το ίδιο έδαφος (αλλά αερόξηρο) με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα παλαιώσης, το οποίο περιγράφεται στην παράγραφο 34, και προσδιορίζεται επίσης το συνολικό βάρος των συσκευασμένων στηλών εδάφους. Κατόπιν, οι στήλες εδάφους υποβάλλονται σε προδιαβροχή, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 35.
41. Η υπό δοκιμή χημική ουσία και τα προϊόντα μετατροπής της εφαρμόζονται, στη συνέχεια, στην επιφάνεια των στηλών εδάφους με τη μορφή παλαιωμένων υπολειμμάτων εδάφους (βλ. παράγραφο 39) ως τμήμα εδάφους 2 cm. Το συνολικό ύψος των στηλών εδάφους (μη κατεργασμένο έδαφος + παλαιωμένο έδαφος) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει, κατά προτίμηση, τα 30 cm (βλ. παράγραφο 34).
42. Η διαδικασία απόπλυσης διεξάγεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 37.
43. Μετά την απόπλυση, τα τμήματα εδάφους και τα αποπλύματα αναλύονται, όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 38, για την ανίχνευση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής της και της μη εξαχθείσας ραδιενέργειας. Για να προσδιοριστεί πόση ποσότητα του παλαιωμένου υπολείμματος συγκρατείται στο ανώτερο στρώμα των 2 cm μετά την απόπλυση, το τμήμα αυτό θα πρέπει να αναλύεται ξεχωριστά.

(1) Οι τυπικοί όγκοι αποπλυμάτων κυμαίνονται από 230-260 ml, που αντιστοιχούν σε περίπου 92 έως 104 % της ολικής εφαρμοζόμενης τεχνητής βροχής (251 ml) όταν χρησιμοποιούνται στήλες εδάφους διαμέτρου 4 cm και μήκους 30 cm.

(2) Μπορεί να σχηματίζονται περισσότερα από ένα σημαντικά προϊόντα μετατροπής στο έδαφος, τα οποία μπορεί επίσης να εμφανίζονται σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μελέτης μετατροπής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί να διεξαχθούν μελέτες απόπλυσης με παλαιωμένα υπολείμματα διαφορετικής ηλικίας.

ΑΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

44. Οι ποσότητες της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής, των μη εξαχθέντων προϊόντων και, εάν περιλαμβάνεται, της χημικής ουσίας αναφοράς θα πρέπει να δίνονται σε % της εφαρμοζόμενης αρχικής δόσης για κάθε τμήμα εδάφους και κλάσμα αποπλύματος. Για κάθε στήλη θα πρέπει να παρέχεται μια γραφική παράσταση των ποσοστών που εντοπίζονται σε συνάρτηση με τα βάρη του εδάφους.
45. Όταν σε αυτές τις μελέτες απόπλυσης στήλης περιλαμβάνεται μια χημική ουσία αναφοράς, η απόπλυση μιας χημικής ουσίας μπορεί να αξιολογείται σε μια σχετική κλίμακα με χρήση παραγόντων σχετικής κινητικότητας (relative mobility factors, RMF, για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 3) (1)(11), γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα σύγκρισης των δεδομένων απόπλυσης για τις διάφορες χημικές ουσίες που λαμβάνονται από τους διαφορετικούς τύπους εδάφους. Παραδείγματα τιμών RMF για διάφορες φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες παρέχονται στο προσάρτημα 3.
46. Από τα αποτελέσματα απόπλυσης στήλης μπορούν επίσης να λαμβάνονται εκτιμήσεις του K_{oc} (κανονικοποιημένος συντελεστής προσρόφησης οργανικού άνθρακα) και του K_{om} (κανονικοποιημένος συντελεστής κατανομής οργανικής ύλης) με χρήση της μέσης απόστασης απόπλυσης ή καθιερωμένων συσχετισμών μεταξύ του RMF και του K_{om} και αντίστοιχα του K_{oc} (4) ή με την εφαρμογή απλής χρωματογραφικής θεωρίας (24). Ωστόσο, η τελευταία μέθοδος θα πρέπει να χρησιμοποιείται με επιφύλαξη, ιδίως όταν λαμβάνεται υπόψη ότι στη διαδικασία απόπλυσης δεν ισχύουν αποκλειστικά συνθήκες κορεσμένης ροής, αλλά μάλλον μη κορεσμένα συστήματα.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

47. Οι μελέτες απόπλυσης στήλης που περιγράφονται σε αυτήν τη μέθοδο επιτρέπουν τον προσδιορισμό του δυναμικού απόπλυσης ή κινητικότητας στο έδαφος της υπό δοκιμή χημικής ουσίας (στη μελέτη απόπλυσης μητρικής ουσίας) ή/και των προϊόντων μετατροπής της (στη μελέτη απόπλυσης παλαιωμένων υπολειμμάτων). Οι δοκιμές αυτές δεν προβλέπουν ποσοτικά τη συμπεριφορά απόπλυσης υπό τις συνθήκες της υπαίθρου, αλλά μπορούν να χρησιμοποιούνται για να συγκρίνεται η "αποπλυσιμότητα" μίας χημικής ουσίας σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες γνωστής συμπεριφοράς απόπλυσης (24). Παρομοίως, δεν μετρούν ποσοτικά το ποσοστό της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας που ενδεχομένως φτάνει στα υπόγεια ύδατα (11). Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τις μελέτες απόπλυσης στήλης ενδέχεται να βοηθήσουν στη λήψη απόφασης σχετικά με το εάν πρέπει να διεξαχθούν πρόσθετες δοκιμές προσομοίωσης υπαίθρου ή δοκιμές στην ύπαιθρο για χημικές ουσίες που εμφανίζουν υψηλό δυναμικό κινητικότητας σε εργαστηριακές δοκιμές.

Έκθεση δοκιμής

48. Η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Υπό δοκιμή χημική ουσία και χημική ουσία αναφοράς (όταν χρησιμοποιείται):

- κοινή ονομασία, χημική ονομασία (ονοματολογία κατά IUPAC και CAS), αριθμός CAS, χημική δομή (που υποδεικνύει τη θέση της σήμανσης όταν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένο υλικό) και σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητες,
- καθαρότητα (ξένες προσμείξεις) της υπό δοκιμή χημικής ουσίας,
- ραδιοχημική καθαρότητα της επισημασμένης χημικής ουσίας και ειδική ραδιενέργεια (κατά περίπτωση).

Εδάφη δοκιμής:

- στοιχεία για τον τόπο συλλογής,
- ιδιότητες των εδαφών, όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και άργιλο, υφή και φαινόμενη πυκνότητα (για διαταραγμένο έδαφος),
- μικροβιακή δραστηριότητα εδάφους (μόνο για εδάφη που χρησιμοποιούνται για την παλαιώση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας),
- διάρκεια αποθήκευσης εδάφους και συνθήκες αποθήκευσης.

Συνθήκες δοκιμής:

- ημερομηνίες διενέργειας των μελετών,
- μήκος και διάμετρος των στηλών απόπλυσης,
- συνολικό βάρος εδάφους των στηλών εδάφους,
- ποσότητα της υπό δοκιμή χημικής ουσίας και, κατά περίπτωση, της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας αναφοράς,

- ποσότητα, συχνότητα και διάρκεια εφαρμογής της τεχνητής βροχής,
- θερμοκρασία πειράματος,
- αριθμός επαναλήψεων (τουλάχιστον δύο),
- μέθοδοι ανάλυσης της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, των προϊόντων μετατροπής και, κατά περίπτωση, της χημικής ουσίας αναφοράς στα διάφορα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα,
- μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής στα τμήματα εδάφους και στα αποπλύματα.

Αποτελέσματα της δοκιμής:

- πίνακες των αποτελεσμάτων που εκφράζονται ως συγκεντρώσεις και % της εφαρμοζόμενης δόσης για τμήματα εδάφους και αποπλύματα,
- ισοζύγιο μάζας, κατά περίπτωση,
- όγκοι αποπλύματος,
- αποστάσεις απόπλυσης και, κατά περίπτωση, παράγοντες σχετικής κινητικότητας,
- γραφική απεικόνιση του % που εντοπίζεται στα τμήματα εδάφους έναντι του βάθους του τμήματος εδάφους,
- συζήτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. και 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, Τόμος 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts και P.C. Kearney, εκδ.). 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. και 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) Παράρτημα I της οδηγίας 95/36/EK της Επιτροπής, της 14ης Ιουλίου 1995, για τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ΕΕ L 172 της 22.7.1995, σελ. 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, Italia, 18-20 Ιανουαρίου 1995.

- (13) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:
- Κεφάλαιο Α.4, Τάση ατμών
 - Κεφάλαιο Α.6, Υδατοδιαλυτότητα
 - Κεφάλαιο Α.8, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος ανακινούμενης φιάλης
 - Κεφάλαιο Α.24, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC
 - Κεφάλαιο Γ.7, Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση συναρτήσεως του pH
 - Κεφάλαιο Γ.18, Προσρόφηση/εκρόφηση με μέθοδο εξισορρόπησης κατά παρτίδα
 - Κεφάλαιο Γ.23, Αερόβια και αναερόβια μετατροπή στο έδαφος
- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Συμπλ. 1 (1985) και *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- (15) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller και D. R. Kelney, εκδ.). *Agronomy Series Ap.* 9, 2η έκδοση.
- (16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller και D. R. Kelney, εκδ.). *Agronomy Series Ap.* 9, 2η έκδοση.
- (17) *ISO Standard Compendium Environment* (1994). *Soil Quality — General aspects, chemical and physical methods of analysis, biological methods of analysis*. Πρώτη έκδοση.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. και Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. και Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2η έκδοση (B. Truelove, εκδ.). *Soc. Weed Sci.*, Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J. και Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3η έκδοση (N. D. Camper, εκδ.). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliviera, κ.ά. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. 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, εκδ.), 115-133. Plenum Press, Νέα Υόρκη.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Ap. 4112, ΟΟΣΑ, Παρίσι
-

Προσάρτημα 1

Ορισμοί και μονάδες

Απόπλυμα: Υδατική φάση που έχει διυλιστεί μέσω μιας εδαφικής κατατομής ή στήλης εδάφους (1).

Απόπλυση: Διεργασία με την οποία μια χημική ουσία μετακινείται προς τα κάτω μέσω της εδαφικής κατατομής ή μιας στήλης εδάφους (1).

Απόσταση απόπλυσης: Το βαθύτερο τμήμα εδάφους στο οποίο εντοπίζεται $\geq 0,5$ % της εφαρμοζόμενης υπό δοκιμή χημικής ουσίας ή του παλαιωμένου υπολείμματος μετά τη διαδικασία απόπλυσης (ισοδυναμεί με το βάθος διείσδυσης).

Έδαφος: Μείγμα ανόργανων και οργανικών χημικών συστατικών, όπου στα τελευταία περιλαμβάνονται ενώσεις υψηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα και άζωτο και υψηλού μοριακού βάρους, στο οποίο εμφανίζεται ζωή με τη μορφή μικρών (κυρίως μικρο-) οργανισμών. Το έδαφος μπορεί να χρησιμοποιείται υπό δύο καταστάσεις:

αδιατάρακτο, όπως έχει διαμορφωθεί με τον καιρό, σε χαρακτηριστικά στρώματα διαφόρων τύπων εδαφών,· διαταραγμένο, όπως συνήθως βρίσκεται σε αρώσιμες εκτάσεις ή όπως εμφανίζεται όταν λαμβάνονται δείγματα με σκάψιμο και χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών (2).

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μέση απόσταση απόπλυσης: Κάτω μέρος του τμήματος εδάφους όπου βρίσκεται η αθροιστική ανακτημένη χημική ουσία = 50 % της συνολικής ανακτημένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας [κανονικό πείραμα απόπλυσης] ή (κάτω μέρος του τμήματος εδάφους όπου βρίσκεται η αθροιστική ανακτημένη χημική ουσία = 50 % της συνολικής ανακτημένης υπό δοκιμή χημικής ουσίας) — (πάχος του στρώματος παλαιωμένου υπολείμματος)/2 [μελέτη απόπλυσης παλαιωμένου υπολείμματος]

Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ): Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση της ταυτότητας της χημικής ουσίας από τις αναλυτικές τεχνικές ενδείξεις. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) είναι η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας κάτω από την οποία δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης με αποδεκτή ακρίβεια.

Παράγοντας σχετικής κινητικότητας RMF: (απόσταση απόπλυσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (cm)) / (απόσταση απόπλυσης χημικής ουσίας αναφοράς (cm))

Προϊόντα μετατροπής: Όλες οι χημικές ουσίες που προκύπτουν από αντιδράσεις βιοτικής ή αβιοτικής μετατροπής της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, συμπεριλαμβανομένου του CO₂ και προϊόντων που δεσμεύονται σε υπολείμματα.

Τεχνητή βροχή: Διάλυμα CaCl₂ 0,01 M σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Υπόλειμμα παλαιωμένου εδάφους: Υπό δοκιμή χημική ουσία και προϊόντα μετατροπής που υπάρχουν στο έδαφος μετά την εφαρμογή και κατόπιν μιας χρονικής περιόδου επαρκούς διάρκειας ώστε οι διεργασίες μεταφοράς, προσρόφησης, μεταβολισμού και διασποράς να τροποποιήσουν την κατανομή και τη χημική φύση κάποιου μέρους της εφαρμοζόμενης χημικής ουσίας (1).

— Χημική ουσία

— μια ουσία ή ένα μείγμα.

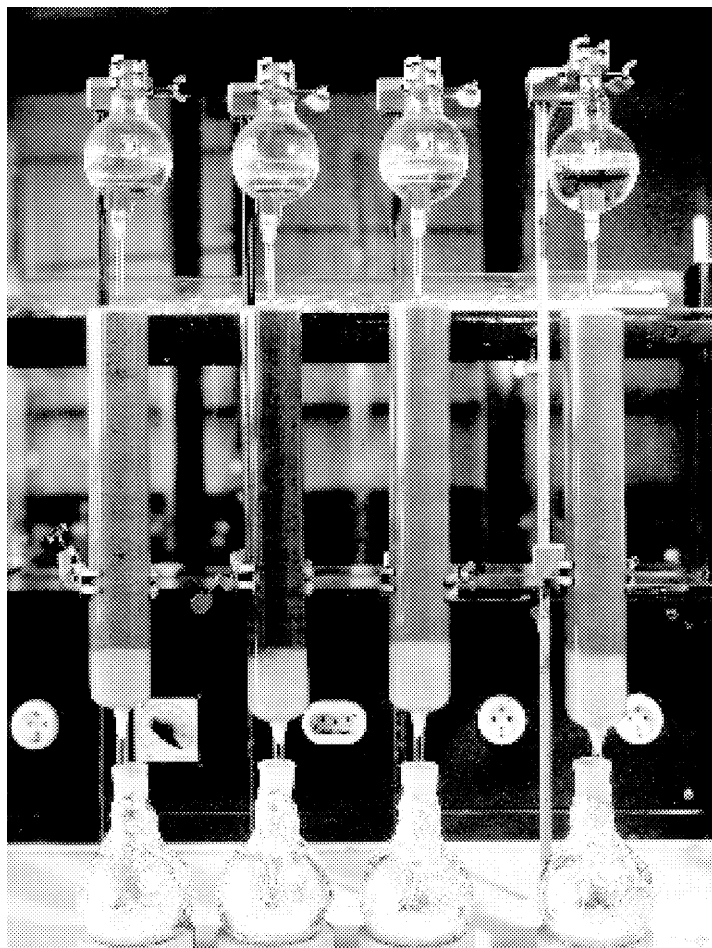
(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (εκδόθηκε στις 12 Μαΐου 1981).

Προσάρτημα 2

Σχήμα 1:

Παράδειγμα γυάλινων στηλών απόπλυσης χωρίς δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα, μήκους 35 cm και εσωτερικής διαμέτρου 5 cm (1)



← Σταγονομετρικές χοάνες για την εφαρμογή τεχνητής βροχής

← Δίσκος συντηγμένου γυαλιού για την αποφυγή διαταραχής της επιφάνειας του εδάφους και για την ομοιόμορφη κατανομή της τεχνητής βροχής

← Γυάλινη στήλη γεμισμένη με το έδαφος δοκιμής (κατά τη δοκιμή προϊόντων που είναι ασταθή παρουσία φωτός, οι στήλες θα πρέπει να τυλιγονται με αλουμινόχαρτο)

← Στρώμα χαλαζιακής άμμου

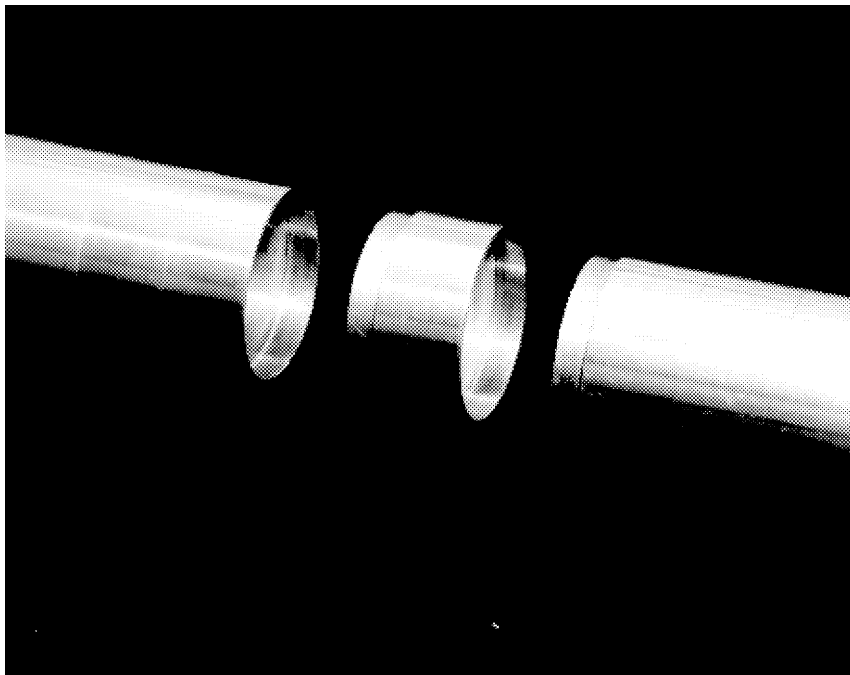
← Πώμα υαλοβάμβακα για τη διατήρηση του εδάφους εντός της στήλης

← Φιάλη με σφαιρικό πυθμένα για τη συλλογή του αποπλύματος, τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή φωτόλυσης

- (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.

Σχήμα 2:

Παράδειγμα μεταλλικής στήλης με δυνατότητα διαχωρισμού σε τμήματα, εσωτερικής διαμέτρου 4 cm (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. και Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. *Environmental Quality and Safety*, Συμπλ. Τόμος III, 203-213.

—

Προσάρτημα 3

Παραδείγματα παραγόντων σχετικής κινητικότητας (*) (RMF) για διάφορες φυτοπροστατευτικές χημικές ουσίες (1)(2) και αντίστοιχες τάξεις κινητικότητας +

| RMF-Εύρος | Χημική ουσία (RMF) | Τάξη κινητικότητας |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| ≤ 0,15 | Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15) | I μη κινητές |
| 0,15-0,8 | Profenophos (0,18), Propiconazole (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazine (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazine (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68) | II ελαφρώς κινητές |
| 0,8-1,3 | Monuron (**) (1,00), Atrazine (1,03), Simazine (1,04), Fluometuron (1,18) | III μέτρια κινητές |
| 1,3-2,5 | Prometon (1,67), Cyanazine (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98) | IV σχετικά κινητές |
| 2,5-5,0 | Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33) | V κινητές |
| > 5,0 | Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0) | VI πολύ κινητές |

(*) Ο παράγοντας σχετικής κινητικότητας προκύπτει ως εξής (3):

$$RMF = \frac{\text{απόσταση απόπλυσης υπό δοκιμή χημικής ουσίας (cm)}}{\text{απόσταση απόπλυσης χημικής ουσίας αναφοράς (cm)}}$$

(**) Χημική ουσία αναφοράς

+ Άλλα συστήματα ταξινόμησης της κινητικότητας μιας χημικής ουσίας στο έδαφος βασίζονται σε τιμές R_f από χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του εδάφους (4) και σε τιμές K_{oc} (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment." Canterbury, HB, 1-3 Ιουλίου 1985.
- (2) Guth, J.A. και 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. και 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.

**Γ.45. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΚΠΟΜΠΩΝ ΑΠΟ ΞΥΛΟ ΚΑΤΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ:
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΞΥΛΙΝΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΚΑΛΥΜΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΡΧΟΝΤΑΙ
ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΓΛΥΚΟ ΝΕΡΟ Η ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΝΕΡΟ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 313 του ΟΟΣΑ (2007). Πρέπει να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά στο περιβάλλον, για να είναι δυνατή η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από το κατεργασμένο ξύλο. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιγράφει μια εργαστηριακή μέθοδο για την εκτίμηση των εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά σε δύο περιπτώσεις κατά τις οποίες οι εκπομπές μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον:
 - Εκπομπές από κατεργασμένο ξύλο σε επαφή με γλυκό νερό. Οι εκπομπές από την επιφάνεια του κατεργασμένου ξύλου μπορούν να εισέλθουν στο νερό.
 - Εκπομπές από κατεργασμένο ξύλο σε επαφή με θαλάσσιο νερό. Οι εκπομπές από την επιφάνεια του κατεργασμένου ξύλου μπορούν να εισέλθουν στο θαλάσσιο νερό.
2. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών προορίζεται για τη δοκιμή εκπομπών από ξύλο και ξυλίνα αντικείμενα που δεν είναι καλυμμένα και έρχονται σε επαφή με γλυκό νερό ή θαλάσσιο νερό. Οι κατηγορίες χρήσης χρησιμοποιούνται διεθνώς και ταξινομούν τον βιολογικό κίνδυνο στον οποίο θα υποβάλλεται το κατεργασμένο αντικείμενο. Οι κατηγορίες χρήσης ορίζουν επίσης την κατάσταση στην οποία χρησιμοποιείται το κατεργασμένο αντικείμενο και προσδιορίζουν τα περιβαλλοντικά διαμερίσματα (αέρας, νερό, έδαφος) που διατρέχουν δυνητικά κίνδυνο από το κατεργασμένο με συντηρητικά ξύλο.
3. Η μέθοδος δοκιμών είναι μια εργαστηριακή διαδικασία για τη λήψη δειγμάτων (με εκπομπές -emissate) από νερό που χρησιμοποιείται για την εμβάπτιση του κατεργασμένου ξύλου, σε αυξανόμενα διαστήματα χρόνου μετά την έκθεση. Η ποσότητα των εκπομπών στο δείγμα με τις εκπομπές (emissate) σχετίζεται με την έκταση επιφάνειας του ξύλου και τη διάρκεια της έκθεσης, προκειμένου να εκτιμηθεί η ροή σε $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ημέρα}$. Συνεπώς μπορεί να εκτιμηθεί η ροή (ρυθμός απόπλυσης) μετά από αυξανόμενες περιόδους έκθεσης.
4. Η ποσότητα των εκπομπών μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από το κατεργασμένο ξύλο.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

5. Η φύση και η σοβαρότητα του μηχανισμού απόπλυσης στην επιφάνεια του ξύλου από το γλυκό νερό δεν θεωρούνται πανομοιότυπες με αυτές της απόπλυσης στην επιφάνεια του ξύλου από το θαλάσσιο νερό. Συνεπώς, για συντηρητικά προϊόντα ξύλου ή μείγματα για την κατεργασία του ξύλου το οποίο χρησιμοποιείται σε θαλάσσια περιβάλλοντα, απαιτείται μια μελέτη απόπλυσης ξύλου για το θαλάσσιο νερό.
6. Στην περίπτωση ξύλου κατεργασμένου με συντηρητικό, το ξύλο θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό ενός ξύλου εμπορικής χρήσης. Θα πρέπει να υφίσταται κατεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή του συντηρητικού και να συμμορφώνεται με τα κατάλληλα πρότυπα και τις προδιαγραφές. Οι παράμετροι που ισχύουν για τον εγκλιματισμό του ξύλου που έχει υποστεί κατεργασία πριν από την έναρξη της δοκιμής θα πρέπει να αναφέρονται.
7. Τα δείγματα ξύλου που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά των χρησιμοποιούμενων αντικειμένων (π.χ. σε ό,τι αφορά το είδος, την πυκνότητα και άλλα χαρακτηριστικά).
8. Η δοκιμή μπορεί να εφαρμόζεται σε ξύλο με τη χρήση διεισδυτικής διεργασίας ή επιφανειακής εφαρμογής ή σε κατεργασμένο ξύλο στο οποίο έχει εφαρμοστεί επιπλέον υποχρεωτική επιφανειακή κατεργασία (π.χ. μπογιά που εφαρμόζεται ως απαίτηση για εμπορική χρήση).
9. Η σύνθεση, η ποσότητα, το pH και η φυσική μορφή του νερού είναι σημαντικοί παράγοντες για τον προσδιορισμό της ποσότητας, της περιεκτικότητας και της φύσης των εκπομπών από το ξύλο.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΩΝ

10. Τα δείγματα δοκιμής του ξύλου που έχει υποστεί κατεργασία με συντηρητικό εμβαπτίζονται σε νερό. Το νερό (δείγμα με εκπομπές -emissate) συλλέγεται και υποβάλλεται σε χημική ανάλυση πολλές φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης ώστε να υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την εκτέλεση στατιστικών υπολογισμών. Από τα αναλυτικά αποτελέσματα υπολογίζονται οι ρυθμοί εκπομπής σε $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ημέρα}$. Οι περίοδοι δειγματοληψίας θα πρέπει να καταγράφονται. Οι δοκιμές με μη κατεργασμένα δείγματα μπορούν να διακόπτονται εάν δεν ανιχνευτεί υπόβαθρο στα πρώτα τρία σημεία δεδομένων.

11. Η συμπερίληψη δειγμάτων μη κατεργασμένου ξύλου επιτρέπει τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου για δείγματα με εκπομπές από ξύλο χωρίς το συντηρητικό που χρησιμοποιείται.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ακρίβεια

12. Η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου δοκιμών όσον αφορά την αξιολόγηση των εκπομπών εξαρτάται από το εάν τα δείγματα της δοκιμής είναι αντιπροσωπευτικά του εμπορικά κατεργασμένου ξύλου, κατά πόσο το νερό είναι αντιπροσωπευτικό του πραγματικού νερού και κατά πόσο το πρόγραμμα έκθεσης είναι αντιπροσωπευτικό των φυσικών συνθηκών.
13. Η ακρίβεια (accuracy), η πιστότητα (precision) και η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να προσδιορίζονται πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής.

Αναπαραγωγιμότητα

14. Τρία δείγματα νερού συλλέγονται και αναλύονται και ως τιμή εκπομπών εκλαμβάνεται η μέση τιμή. Η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων εντός ενός εργαστηρίου και μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων εξαρτάται από το πρόγραμμα εμφύσησης και το ξύλο που χρησιμοποιείται για τα δείγματα της δοκιμής.

Αποδεκτό εύρος αποτελεσμάτων

15. Σε αυτήν τη δοκιμή ένα εύρος αποτελεσμάτων όπου οι ανώτερες και κατώτερες τιμές διαφέρουν κατά λιγότερο από μία τάξη μεγέθους είναι αποδεκτό.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Νερό

16. Σενάρια απόπλυσης με γλυκό νερό: Όταν πρόκειται να αξιολογηθεί ξύλο που εκτίθεται σε γλυκό νερό, συνιστάται η χρήση απιονισμένου νερού (π.χ. ASTM D 1193 τύπου II) στη δοκιμή απόπλυσης. Η θερμοκρασία του νερού θα είναι 20 °C +/- 2 °C και στην έκθεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται το pH και η θερμοκρασία νερού που μετρήθηκαν. Η ανάλυση των δειγμάτων του χρησιμοποιούμενου νερού, τα οποία λαμβάνονται πριν από την εμφύσηση των κατεργασμένων δειγμάτων, επιτρέπει την εκτίμηση των χημικών ουσιών που αναλύονται στο νερό. Αυτό αποτελεί έναν μάρτυρα για τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου χημικών ουσιών, οι οποίες στη συνέχεια υποβάλλονται σε χημική ανάλυση.
17. Σενάρια απόπλυσης με θαλάσσιο νερό: Όταν πρόκειται να αξιολογηθεί ξύλο που εκτίθεται σε θαλάσσιο νερό, συνιστάται η χρήση συνθετικού θαλάσσιου νερού (π.χ. υποκατάστατο ωκεάνιου νερού ASTM D 1141, δίχως βαρέα μέταλλα). Η θερμοκρασία του νερού θα είναι 20 °C +/- 2 °C και στην έκθεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται το pH και η θερμοκρασία νερού που μετρήθηκαν. Η ανάλυση των δειγμάτων του χρησιμοποιούμενου νερού, τα οποία λαμβάνονται πριν από την εμφύσηση των κατεργασμένων δειγμάτων, επιτρέπει την εκτίμηση των χημικών ουσιών που αναλύονται στο νερό. Αυτό αποτελεί έναν μάρτυρα για την ανάλυση των επιπέδων υποβάθρου σημαντικών χημικών ουσιών.

Δείγματα ξύλου της δοκιμής

18. Για τη δοκιμή αποτελεσματικότητας των συντηρητικών ξύλου, τα είδη ξύλου θα πρέπει να είναι τυπικά των χρησιμοποιούμενων ειδών. Τα συνιστώμενα είδη είναι το *Pinus sylvestris* L. (Σκωτσέζικο πεύκο), το *Pinus resinosa* Ait. (κόκκινο πεύκο) ή το *Pinus spp* (νότιο πεύκο). Μπορούν να διεξαχθούν επιπλέον δοκιμές με χρήση άλλων ειδών.
19. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ξύλο με ευθύγραμμες βέννες (“νερά”) και χωρίς ρόζους. Θα πρέπει να αποφεύγεται υλικό με ρητινώδη εμφάνιση. Το ξύλο θα πρέπει να είναι τυπικό ενός εμπορικά διαθέσιμου ξύλου. Η πηγή, η πυκνότητα και ο αριθμός των ετήσιων δακτυλίων ανά 10 mm θα πρέπει να καταγράφονται.
20. Συνιστάται τα δείγματα ξύλου της δοκιμής να είναι σε ομάδες των πέντε σύμφωνα με τα μπλοκ μεγέθους EN 113 (διαστάσεις 25 mm × 50 mm × 15 mm) με τις διαμήκεις προσόψεις παράλληλες προς την ίνα του ξύλου. Ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες διαστάσεις, όπως 50 mm, επί 150 mm, επί 10 mm. Το δείγμα δοκιμής θα πρέπει να εμφύσηται πλήρως στο νερό. Τα δείγματα της δοκιμής θα αποτελούνται από 100 % σομφό ξύλο. Κάθε δείγμα επισημαίνεται με μοναδικό τρόπο για να είναι δυνατή η ταυτοποίησή του καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.
21. Όλα τα δείγματα της δοκιμής θα πρέπει να ροκανίζονται ή να κόβονται με πλάνη, ενώ οι επιφάνειες δεν θα πρέπει να λειαινούνται.

22. Ο αριθμός των ομάδων των δειγμάτων ξύλου της δοκιμής που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση είναι τουλάχιστον πέντε: οι τρεις ομάδες δειγμάτων υφίστανται κατεργασία με συντηρητικό, η μία ομάδα δειγμάτων δεν υφίσταται κατεργασία και η μία ομάδα δειγμάτων χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ξηράς εκ κλιβάνου περιεκτικότητας σε υγρασία των δειγμάτων δοκιμής πριν από την κατεργασία. Προετοιμάζονται επαρκή δείγματα δοκιμής για να είναι δυνατή η επιλογή τριών ομάδων δειγμάτων τα οποία βρίσκονται εντός του 5 % της μέσης τιμής παραμονής του συντηρητικού των συνενωμένων δειγμάτων δοκιμής.
23. Όλα τα δείγματα της δοκιμής υφίστανται σφράγιση άκρων με μια χημική ουσία που αποτρέπει τη διείσδυση του συντηρητικού μέσα στο ξύλο από το σόκορο (end grain) ή αποτρέπει την απόπλυση των δειγμάτων μέσω του ξύλου από το σόκορο. Για την εφαρμογή του σφραγιστικού υλικού άκρων είναι απαραίτητο να γίνεται διάκριση μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για επιφανειακή εφαρμογή και για διαδικασίες διείσδυσης. Η εφαρμογή του σφραγιστικού υλικού άκρων πρέπει να πραγματοποιείται πριν από την κατεργασία μόνο στην περίπτωση της επιφανειακής εφαρμογής.
24. Το σόκορο πρέπει να είναι ανοικτό για κατεργασίες μέσω διαδικασιών διείσδυσης. Επομένως, τα δείγματα πρέπει να υφίστανται σφράγιση άκρων στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού. Η εκπομπή πρέπει να υπολογίζεται μόνο για τη διαμήκη έκταση της επιφάνειας. Τα σφραγιστικά υλικά θα πρέπει να επιθεωρούνται και να εφαρμόζονται εκ νέου, εάν απαιτείται, πριν από την έναρξη της απόπλυσης και δεν θα πρέπει να εφαρμόζονται εκ νέου μετά την έναρξη της απόπλυσης.

Περιέκτης εμβάπτισης

25. Ο περιέκτης είναι κατασκευασμένος από αδρανές υλικό και είναι αρκετά μεγάλος ώστε να συγκρατεί 5 δείγματα ξύλου σύμφωνα με το πρότυπο EN113 σε 500 ml νερού, με αποτέλεσμα η αναλογία της έκτασης επιφάνειας προς τον όγκο του νερού να είναι 0,4 cm²/ml.

Διάταξη δοκιμής δείγματος

26. Τα δείγματα της δοκιμής στηρίζονται σε μια διάταξη που επιτρέπει σε όλες τις εκτεθειμένες επιφάνειες του δείγματος να έρχονται σε επαφή με το νερό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟ

Προετοιμασία των κατεργασμένων δειγμάτων της δοκιμής

27. Το δείγμα ξύλου της δοκιμής που θα υποστεί κατεργασία με το υπό δοκιμή συντηρητικό υφίσταται κατεργασία με τη μέθοδο που ορίζεται για το συντηρητικό, η οποία μπορεί να είναι μια διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας ή μια διαδικασία επιφανειακής εφαρμογής, που ενδέχεται να διεξάγεται με εμβάπτιση, ψεκάσμο ή επικάλυψη.

Συντηρητικά προς εφαρμογή μέσω διαδικασίας διεισδυτικής κατεργασίας

28. Θα πρέπει να παρασκευάζεται ένα διάλυμα του συντηρητικού που θα επιτυγχάνει την καθορισμένη πρόσληψη ή παραμονή κατά την εφαρμογή με τη διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας. Το δείγμα ξύλου της δοκιμής ζυγίζεται και μετρώνται οι διαστάσεις του. Η διαδικασία διεισδυτικής κατεργασίας θα πρέπει να είναι σύμφωνη με όσα ορίζονται για την εφαρμογή του συντηρητικού στο ξύλο για χρήση στην κατηγορία χρήσης 4 ή 5. Το δείγμα ζυγίζεται ξανά μετά την κατεργασία και υπολογίζεται η παραμονή του συντηρητικού (kg/m³) από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{\text{Μάζα μετά την κατεργασία (kg)} - \text{Μάζα πριν από την κατεργασία (kg)}}{\text{Όγκος δείγματος της δοκιμής (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Συγκέντρωση διαλύματος (\% μάζας/ μάζα)}}{100}$$

29. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτήν τη δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιείται ξυλεία που υφίσταται κατεργασία σε μια βιομηχανική εγκατάσταση κατεργασίας (π.χ. μέσω εμποτισμού σε πίεση κενού). Οι χρησιμοποιούμενες διαδικασίες θα πρέπει να καταγράφονται και η παραμονή του υλικού που υφίσταται κατεργασία με αυτόν τον τρόπο πρέπει να αναλύεται και να καταγράφεται.

Συντηρητικά προς εφαρμογή μέσω διαδικασιών επιφανειακής εφαρμογής

30. Η διαδικασία επιφανειακής εφαρμογής περιλαμβάνει την εμβάπτιση, τον ψεκάσμο ή την επάλειψη των δειγμάτων ξύλου της δοκιμής. Η διαδικασία και ο ρυθμός εφαρμογής (π.χ. λίτρα/m²) θα πρέπει να είναι σύμφωνα με όσα ορίζονται για την επιφανειακή εφαρμογή του συντηρητικού.

31. Σημειώνεται επίσης ότι σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιείται ξυλεία που έχει υποστεί κατεργασία σε βιομηχανική εγκατάσταση κατεργασίας. Οι χρησιμοποιούμενες διαδικασίες θα πρέπει να καταγράφονται και η παραμονή του υλικού που υφίσταται κατεργασία με αυτόν τον τρόπο πρέπει να αναλύεται και να καταγράφεται.

Εγκλιματισμός των δειγμάτων της δοκιμής μετά την κατεργασία

32. Μετά την κατεργασία, τα κατεργασμένα δείγματα της δοκιμής θα πρέπει να υποβάλλονται σε εγκλιματισμό σύμφωνα με τις συστάσεις του προμηθευτή του υπό δοκιμή συντηρητικού βάσει των απαιτήσεων της ετικέτας του συντηρητικού ή σύμφωνα με τις εμπορικές πρακτικές κατεργασίας ή με το πρότυπο EN 252.

Προετοιμασία και επιλογή δειγμάτων δοκιμής

33. Μετά τον εγκλιματισμό που ακολουθεί την κατεργασία, υπολογίζεται η μέση παραμονή της ομάδας των δειγμάτων δοκιμής και επιλέγονται τυχαία για τις μετρήσεις απόπλυσης τρεις αντιπροσωπευτικές ομάδες δειγμάτων με παραμονή εντός του 5 % της μέσης τιμής για την ομάδα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΚΠΟΜΠΩΝ ΤΟΥ ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΟΥ

Μέθοδος εμβάπτισης

34. Τα δείγματα δοκιμής ζυγίζονται και, στη συνέχεια, εμβάπτιζονται πλήρως στο νερό, ενώ καταγράφεται η ημερομηνία και η ώρα. Ο περιέκτης καλύπτεται για τη μείωση της εξάτμισης.
35. Το νερό αντικαθίσταται στα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: 6 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες, 8 ημέρες, 15 ημέρες, 22 ημέρες, 29 ημέρες (σημείωση: αυτοί είναι συνολικοί χρόνοι και όχι χρονικά διαστήματα). Η ώρα και η ημερομηνία της αλλαγής του νερού, καθώς και η μάζα του νερού που ανακτάται από τον περιέκτη, θα πρέπει να καταγράφονται.
36. Μετά από κάθε αλλαγή νερού, διατηρείται ένα δείγμα νερού στο οποίο έχει εμβάπτιστεί η ομάδα των δειγμάτων δοκιμής για επακόλουθη χημική ανάλυση.
37. Η διαδικασία δειγματοληψίας επιτρέπει τον υπολογισμό του προφίλ της ποσότητας εκπομπών έναντι του χρόνου. Τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται υπό συνθήκες στις οποίες διατηρείται η προσδιοριζόμενη ουσία π.χ. σε ψυγείο, στο σκοτάδι, για τη μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης στο δείγμα πριν από την ανάλυση.

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΚΠΟΜΠΩΝ

Κατεργασμένα δείγματα

38. Το συλλεγμένο νερό υποβάλλεται σε χημική ανάλυση για την ανίχνευση της δραστικής ουσίας ή/και των σχετικών προϊόντων αποικοδόμησης/μετατροπής, κατά περίπτωση.

Μη κατεργασμένα δείγματα

39. Η συλλογή νερού (δείγμα με εκπομπές -emissate) σε αυτό το σύστημα και η επακόλουθη ανάλυση για την ανίχνευση χημικών ουσιών που αποπλύθηκαν από τα μη κατεργασμένα δείγματα ξύλου επιτρέπουν την εκτίμηση του πιθανού ρυθμού εκπομπής του συντηρητικού από μη κατεργασμένο ξύλο. Η συλλογή και ανάλυση του δείγματος με εκπομπές (emissate) μετά από αυξανόμενες χρονικές περιόδους έκθεσης επιτρέπουν την εκτίμηση του ρυθμού με τον οποίο αλλάζει ο ρυθμός εκπομπής συναρτήσει του χρόνου. Η ανάλυση αυτή είναι μια διαδικασία ελέγχου για τον προσδιορισμό των επιπέδων υποβάθρου της υπό δοκιμή χημικής ουσίας σε μη κατεργασμένο ξύλο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται ότι το ξύλο που χρησιμοποιείται ως πηγή δειγμάτων δεν έχει προηγουμένως υποστεί κατεργασία με το συντηρητικό.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Χημικές αναλύσεις

40. Το συλλεγμένο νερό υποβάλλεται σε χημική ανάλυση και το αποτέλεσμα της ανάλυσης του νερού εκφράζεται στις κατάλληλες μονάδες, π.χ. mg/l.

Αναφορά των δεδομένων

41. Όλα τα αποτελέσματα καταγράφονται. Στο προσάρτημα παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ενός προτεινόμενου εντύπου καταγραφής για μία ομάδα κατεργασμένων δειγμάτων δοκιμής και ο συνοπτικός πίνακας για τον υπολογισμό των μέσων τιμών εκπομπών σε κάθε διάστημα δειγματοληψίας.
42. Η ημερήσια ροή εκπομπών σε $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ημέρα}$ υπολογίζεται με λήψη της μέσης τιμής των τριών μετρήσεων από τις τρεις επαναλήψεις και διαίρεσή της με τον αριθμό των ημερών εμβάπτισης.

Έκθεση δοκιμής

43. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:
 - Όνομα του προμηθευτή του υπό δοκιμή συντηρητικού,
 - Ειδική και μοναδική ονομασία ή κωδικός του υπό δοκιμή συντηρητικού,
 - Εμπορική ή κοινή ονομασία των δραστικών συστατικών με μια γενική περιγραφή των βοηθητικών ουσιών (π.χ. συνδιαλύτης, ρητίνη) και της περιεκτικότητας σε % m/m των συστατικών,
 - Σχετική παραμονή ή πλήρωση (σε kg/m^3 ή l/m^2 , αντίστοιχα) που ορίζεται για ξύλο που χρησιμοποιείται σε επαφή με νερό,
 - Είδος του χρησιμοποιούμενου ξύλου, πυκνότητα και ρυθμός ανάπτυξης του σε δακτυλίους ανά 10 mm,
 - Πλήρωση ή παραμονή του υπό δοκιμή συντηρητικού και τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της παραμονής, εκφρασμένα ως l/m^2 ή kg/m^3 ,
 - Μέθοδος εφαρμογής του συντηρητικού, με προσδιορισμό του προγράμματος κατεργασίας που χρησιμοποιείται για τη διεσδυτική διαδικασία και της μεθόδου εφαρμογής εάν χρησιμοποιείται επιφανειακή κατεργασία,
 - Ημερομηνία εφαρμογής του συντηρητικού και εκτίμηση της περιεκτικότητας σε υγρασία των δειγμάτων της δοκιμής, εκφραζόμενη ως ποσοστό,
 - Διαδικασίες εγκλιματισμού που χρησιμοποιούνται, με προσδιορισμό του τύπου, των συνθηκών και της διάρκειας,
 - Προσδιορισμός του σφραγιστικού υλικού άκρων που χρησιμοποιείται και του αριθμού των εφαρμογών,
 - Προσδιορισμός κάθε επακόλουθης κατεργασίας του ξύλου, π.χ. προσδιορισμός του προμηθευτή, του τύπου, των χαρακτηριστικών και της προσθήκης μιας βαφής,
 - Ώρα και ημερομηνία κάθε συμβάντος εμβάπτισης, ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται για την εμβάπτιση των δειγμάτων δοκιμής σε κάθε συμβάν και ποσότητα του νερού που προσροφάται από το ξύλο κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης,
 - Οποιαδήποτε παραλλαγή της περιγραφόμενης μεθόδου και τυχόν παράγοντες που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) Ευρωπαϊκό πρότυπο, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) Ευρωπαϊκό πρότυπο, 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*, Τόμος 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*, Τόμος 11.01.
-

Προσάρτημα 1

Έντυπο καταγραφής για τη μέθοδο δοκιμών

Εκτίμηση εκπομπών από ξύλο κατεργασμένο με συντηρητικά στο περιβάλλον: Εργαστηριακή μέθοδος για ξύλινα αντικείμενα που δεν είναι καλυμμένα και έρχονται σε επαφή με γλυκό νερό ή θαλάσσιο νερό

| | |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Οίκος δοκιμών | |
| Συντηρητικό ξύλου | |
| Προμηθευτής του συντηρητικού | |
| Ειδική και μοναδική ονομασία ή κωδικός του συντηρητικού | |
| Εμπορική ή κοινή ονομασία του συντηρητικού | |
| Βοηθητικές ουσίες | |
| Σχετική παραμονή για ξύλο που χρησιμοποιείται σε επαφή με νερό | |
| Εφαρμογή | |
| Τρόπος εφαρμογής | |
| Ημερομηνία εφαρμογής | |
| Τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της παραμονής: | |
| Διαδικασία εγκλιματισμού | |
| Διάρκεια εγκλιματισμού | |
| Σφραγιστικό υλικό άκρων / αριθμός εφαρμογών | |
| Επακόλουθη κατεργασία | εάν ισχύει |
| Δείγματα της δοκιμής | |
| Είδος ξύλου | |
| Πυκνότητα του ξύλου | (ελάχιστη ... μέση τιμή ... μέγιστη) |
| Ρυθμός ανάπτυξης (δακτύλιοι ανά 10 mm) | (ελάχιστη ... μέση τιμή ... μέγιστη) |
| Περιεκτικότητα σε υγρασία | |

| Διατάξεις δοκιμής (*) | Παραμονή (π.χ. kg/m³) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Κατεργασμένο "x" | Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα |
| Κατεργασμένο "y" | Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα |
| Κατεργασμένο "z" | Μέση τιμή και τυπική απόκλιση ή εύρος για 5 δείγματα |
| Μη κατεργασμένο | |
| Παραλλαγή των παραμέτρων της μεθόδου δοκιμών | π.χ. ποιότητα νερού, διαστάσεις των δειγμάτων δοκιμής κ.λπ. |

(*) Τα x, y, z αντιπροσωπεύουν τα τρία δείγματα επανάληψης

| Χρόνος | Αλλαγή νερού | Μάζα δείγματος | | Πρόσληψη νερού | | Δείγμα νερού | | | | |
|-----------|--------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------|--------------|----|----|----|
| | | Κατεργασμένο (μέση τιμή) | Μη κατεργασμένο | Κατεργασμένο (μέση τιμή) | Μη κατεργασμένο | | Νερό δοκιμής | x | y | z |
| | Ημερομηνία | g | g | g | g | αρ. | pH | pH | pH | pH |
| έναρξη | | | | | | | | | | |
| 6 ώρες | | | | | | 1 | | | | |
| 24 ώρες | | | | | | 2 | | | | |
| 2 ημέρες | | | | | | 3 | | | | |
| 4 ημέρες | | | | | | 4 | | | | |
| 8 ημέρες | | | | | | 5 | | | | |
| 15 ημέρες | | | | | | 6 | | | | |
| 22 ημέρες | | | | | | 7 | | | | |
| 29 ημέρες | | | | | | 8 | | | | |

Προετοιμάζονται ξεχωριστοί πίνακες για κάθε δραστικό συστατικό

| Χρόνος | Αλλαγή νερού | Αναλυτικά αποτελέσματα | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|------|-----------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | | Μη κατεργασμένα δείγματα | | | Κατεργασμένα δείγματα | | | | | | | | | | | |
| | | Συγκέντρωση δραστικού συστατικού στο νερό mg/l | Εκπεμπόμενη ποσότητα mg/m ² | Ρυθμός εκπομπής mg/m ² /ημέρα | Συγκέντρωση δραστικού συστατικού στο νερό | | | | Εκπεμπόμενη ποσότητα | | | | Ρυθμός εκπομπής | | | |
| | x | | | | y | z | Μέση τιμή | x | y | z | Μέση τιμή | x | y | z | Μέση τιμή | |
| Ημερομηνία | | | | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | mg/m ² | mg/m ² | mg/m ² | mg/m ² | mg/m ² /ημέρα | mg/m ² /ημέρα | mg/m ² /ημέρα | mg/m ² /ημέρα | |
| 6 ώρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 ώρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 ημέρες | | | | | | | | | | | | | | | | |

Σημείωση: Επειδή ενδέχεται να πρέπει να χρησιμοποιηθούν αποτελέσματα από μη κατεργασμένα δείγματα για τη διόρθωση των ρυθμών εκπομπής από κατεργασμένα δείγματα, τα αποτελέσματα των μη κατεργασμένων δειγμάτων θα πρέπει να προηγούνται και όλες οι τιμές για τα κατεργασμένα δείγματα θα είναι “διορθωμένες τιμές”. Μπορεί επίσης να γίνει διόρθωση για την αρχική ανάλυση νερού.

*Προσάρτημα 2***Ορισμοί**

Χημική ουσία: Μια ουσία ή ένα μείγμα.

Υπό δοκιμή χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Γ.46. ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΣΕ ΒΕΝΘΙΚΟΥΣ ΟΛΙΓΟΧΑΙΤΟΥΣ ΠΟΥ ΔΙΑΒΙΟΥΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμική δοκιμών (TG) 315 του ΟΟΣΑ (2008). Οι ενδοβενθικοί οργανισμοί που καταναλώνουν ιζήματα ενδέχεται να εκτίθενται σε δεσμευμένες σε ιζήματα ουσίες (1). Μεταξύ αυτών των καταναλωτών ιζημάτων, οι υδρόβιοι ολιγόχαιτοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον πυθμένα των υδατικών συστημάτων. Διαβιούν στα ιζήματα και είναι συχνά ένα από τα είδη με τη μεγαλύτερη αφθονία ιδιαίτερα σε οικοσυστήματα όπου επικρατούν περιβαλλοντικές συνθήκες δυσμενείς προς άλλους οργανισμούς. Με τη βιοανάδευση (bioturbation) του ιζήματος και λειτουργώντας ως λεία, τα ζώα αυτά μπορούν να ασκούν ισχυρή επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των εν λόγω ουσιών για άλλους οργανισμούς, π.χ. βενθοφάγα ψάρια. Σε αντίθεση με τους επιβενθικούς οργανισμούς, οι ενδοβενθικοί υδρόβιοι ολιγόχαιτοι φωλιάζουν εντός του ιζήματος και καταναλώνουν σωματίδια ιζήματος που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια του ιζήματος. Για τον λόγο αυτό, οι εν λόγω οργανισμοί εκτίθενται σε ουσίες μέσω πολλών οδών πρόσληψης, περιλαμβανομένης της άμεσης επαφής, της κατάποσης μολυσμένων σωματιδίων ιζήματος, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού. Ορισμένα είδη βενθικών ολιγοχαιτών που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφονται στο προσάρτημα 6.
2. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τη βιοσυσσώρευση μιας ουσίας περιλαμβάνουν, καταρχάς, τον συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BAF), τη σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_i) και τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e). Οι λεπτομερείς ορισμοί αυτών των παραμέτρων παρέχονται στο προσάρτημα 1.
3. Για να εκτιμηθεί γενικά το δυναμικό βιοσυσσώρευσης ουσιών και να διερευνηθεί η βιοσυσσώρευση ουσιών που τείνουν να κατανέμονται μέσα ή επάνω σε ιζήματα, απαιτείται μια ειδική για το διαμέρισμα μέθοδος δοκιμών (1)(2)(3)(4).
4. Σκοπός της παρούσας μεθόδου δοκιμών είναι η εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα σε ενδοβενθικούς ολιγόχαιτους σκώληκες. Η υπό δοκιμή ουσία εμβολιάζεται στο ιζήμα. Η χρήση εμβολιασμένου ιζήματος σκοπό έχει να προσομοιώσει μολυσμένο ιζήμα.
5. Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε υφιστάμενες μεθόδους δοκιμών τοξικότητας και βιοσυσσώρευσης ιζήματος (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Άλλα χρήσιμα έγγραφα είναι οι συζητήσεις και τα αποτελέσματα μιας διεθνούς συνάντησης εργασίας (11) και το αποτέλεσμα μιας διεθνούς κυκλικής δοκιμής (12).
6. Η παρούσα δοκιμή εφαρμόζεται σε σταθερές, ουδέτερες οργανικές ουσίες, που τείνουν να συσχετίζονται με ιζήματα. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί επίσης να μετρηθεί η βιοσυσσώρευση σταθερών οργανο-μεταλλικών ενώσεων που σχετίζονται με ιζήματα (12). Δεν εφαρμόζεται σε μέταλλα και άλλα ιχνοστοιχεία (11) χωρίς τροποποίηση του σχεδιασμού δοκιμής όσον αφορά τους όγκους υποστρώματος και νερού, και πιθανώς το μέγεθος δείγματος ιστού.

ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΟΥΣΙΑ

7. Επί του παρόντος υπάρχουν διαθέσιμες μόνο λίγες καλά καθιερωμένες ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) που αφορούν τις διαδικασίες βιοσυσσώρευσης (14). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σχέση είναι η συσχέτιση μεταξύ της βιοσυσσώρευσης και της βιοσυγκέντρωσης σταθερών οργανικών ενώσεων και της λιποφιλίας τους (εκφραζόμενη ως λογάριθμος του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού ($\log K_{ow}$), για τον ορισμό βλ. προσάρτημα 1), αντίστοιχα, η οποία έχει αναπτυχθεί για την περιγραφή της κατανομής μιας ουσίας μεταξύ του νερού και των ψαριών. Έχουν επίσης καθιερωθεί συσχετίσεις για το διαμέρισμα ιζήματος με χρήση αυτής της σχέσης (15)(16)(17)(18). Η συσχέτιση $\log K_{ow}$ - $\log BCF$ ως βασική σχέση QSAR μπορεί να είναι χρήσιμη για μια πρώτη προκαταρκτική εκτίμηση του δυναμικού βιοσυσσώρευσης ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα. Ωστόσο, ο BAF ενδέχεται να επηρεάζεται από το λιπιδικό περιεχόμενο του οργανισμού δοκιμής και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα του ιζήματος. Επομένως, ο συντελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα-νερού (K_{oc}) μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται ως βασικός καθοριστικός παράγοντας της βιοσυσσώρευσης οργανικών ουσιών που σχετίζονται με ιζήματα.
8. Η δοκιμή αυτή εφαρμόζεται σε:
 - σταθερές, οργανικές ουσίες με τιμές $\log K_{ow}$ που κυμαίνονται μεταξύ 3,0 και 6,0 (5)(19) και υπερλιπόφιλες ουσίες που εμφανίζουν $\log K_{ow}$ μεγαλύτερο από 6,0 (5),
 - ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών ουσιών που είναι γνωστές για το δυναμικό βιοσυσσώρευσής τους σε ζωτανούς οργανισμούς, π.χ. επιφανειοδραστικές ή εξαιρετικά προσροφητικές ουσίες (π.χ. υψηλό K_{oc}).

9. Πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή ουσία, όπως οι προφυλάξεις ασφαλείας, οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης και η σταθερότητα, καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης. Καθοδήγηση για τις δοκιμές ουσιών με φυσικοχημικές ιδιότητες που δυσχεραίνουν τη διεξαγωγή της δοκιμής παρέχεται στα σημεία (20) και (21). Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής για τη βιοσυσσώρευση με υδρόβιους ολιγόχαιτους, θα πρέπει να είναι γνωστές οι ακόλουθες πληροφορίες σχετικά με την υπό δοκιμή ουσία:
- κοινή ονομασία, χημική ονομασία (κατά προτίμηση κατά IUPAC), συντακτικός τύπος, αριθμός CAS, καθαρότητα,
 - υδατοδιαλυτότητα [μέθοδος δοκιμών A.6 (22)],
 - συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού, K_{ow} [μέθοδοι δοκιμών A.8, A.24 (22)],
 - συντελεστής κατανομής ιζήματος-νερού, εκφρασμένος ως K_d ή K_{oc} [μέθοδος δοκιμών Γ.19 (22)],
 - υδρόλυση [μέθοδος δοκιμών Γ.7 (22)],
 - φωτομετατροπή στο νερό (23),
 - τάση ατμών [μέθοδος δοκιμών A.4] (22),
 - άμεση βιοαποικοδομησιμότητα [μέθοδοι δοκιμών Γ.4 και Γ.29 (22)],
 - επιφανειακή τάση [μέθοδος δοκιμών A.5 (22)],
 - κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (24).
- Επιπλέον σχετικές θεωρούνται οι ακόλουθες πληροφορίες -όταν διατίθενται:
- βιοαποικοδόμηση στο υδατικό περιβάλλον [μέθοδοι δοκιμών Γ.24 και Γ.25 (22)],
 - σταθερά του Νόμου του Henry.
10. Οι ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να διευκολύνουν την ανάλυση του νερού, του ιζήματος και των βιολογικών δειγμάτων και μπορούν να χρησιμοποιούνται για να προσδιορίζεται εάν θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων αποικοδόμησης. Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν επικυρώθηκε από μια διεθνή κυκλική δοκιμή (12) για ουσίες επισημασμένες με ^{14}C . Εάν μετρώνται τα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα, ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF) βασίζεται στη μητρική ουσία, συμπεριλαμβανομένων τυχόν προϊόντων αποικοδόμησης που διατηρούνται. Είναι επίσης δυνατός ο συνδυασμός μιας μελέτης μεταβολισμού με μια μελέτη βιοσυσσώρευσης με ανάλυση και ποσοτικό προσδιορισμό του ποσοστού της μητρικής ουσίας και των προϊόντων αποικοδόμησης της σε δείγματα που λαμβάνονται στο τέλος της φάσης πρόσληψης ή στο επίπεδο αιχμής της βιοσυσσώρευσης. Σε κάθε περίπτωση, συνιστάται ο υπολογισμός του BAF να βασίζεται στη συγκέντρωση της μητρικής ουσίας στους οργανισμούς και όχι μόνο στα ολικά ραδιενεργά κατάλοιπα.
11. Εκτός από τις ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας, άλλες πληροφορίες που απαιτούνται είναι η τοξικότητα στα είδη ολιγόχαιτων που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή, όπως η διάμεση θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50}) για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα της φάσης πρόσληψης, προκειμένου να διασφαλίζεται ότι οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις έκθεσης είναι πολύ χαμηλότερες από τα τοξικά επίπεδα. Θα πρέπει να προτιμώνται, εάν υπάρχουν, οι τιμές τοξικότητας που προέρχονται από μακροχρόνιες μελέτες με υποθανατηφόρα τελικά σημεία (EC_{50}). Εάν δεν είναι διαθέσιμα τέτοια στοιχεία, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από μια δοκιμή οξείας τοξικότητας υπό συνθήκες πανομοιότυπες με τις συνθήκες της δοκιμής βιοσυσσώρευσης ή από δεδομένα τοξικότητας για άλλα βοηθητικά είδη.
12. Πρέπει να υπάρχει διαθέσιμη κατάλληλη αναλυτική μέθοδος, γνωστής ακρίβειας (accuracy), πιστότητας (precision) και ευαισθησίας, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στα διαλύματα δοκιμής, στο ίζημα και στο βιολογικό υλικό, καθώς και λεπτομερείς πληροφορίες για την παρασκευή και την αποθήκευση του δείγματος, αλλά και φύλλα δεδομένων ασφάλειας υλικών. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστά τα αναλυτικά όρια ανίχνευσης της υπό δοκιμή ουσίας στο νερό, στο ίζημα και στους ιστούς των σκωλήκων. Εάν χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη υπό δοκιμή ουσία, πρέπει επίσης να είναι γνωστά η ειδική ραδιενέργεια (δηλαδή $Bq\ mol^{-1}$), η θέση του ραδιοσημασμένου ατόμου και το ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με ξένες προσμείξεις. Η ειδική ραδιενέργεια της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη προκειμένου να ανιχνεύονται συγκεντρώσεις δοκιμής όσο το δυνατό χαμηλότερες (11).
13. Θα πρέπει να είναι διαθέσιμες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του ιζήματος που θα χρησιμοποιηθεί (π.χ. προέλευση του ιζήματος ή των συστατικών του, pH και συγκέντρωση αμμωνίας του ενδοπορικού νερού (ιζήματα υπαίθρου), περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και ποσοστό επί του ξηρού βάρους) (6).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η δοκιμή αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση πρόσληψης (έκθεση) και τη φάση αποβολής (μετά την έκθεση). Κατά τη φάση πρόσληψης, πραγματοποιείται έκθεση των σκώληκων σε ίζημα εμβολιασμένο με την υπό δοκιμή ουσία, συμπλήρωση με ανασυσταθέν νερό και εξισορρόπηση, κατά περίπτωση (11). Ομάδες σκώληκων διατηρούνται ως μάρτυρες υπό πανομοιότυπες συνθήκες, χωρίς την υπό δοκιμή ουσία.
15. Για τη φάση αποβολής, οι σκώληκες μεταφέρονται σε σύστημα ιζήματος-νερού που δεν περιέχει την υπό δοκιμή ουσία. Η φάση αποβολής είναι απαραίτητη για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με την ταχύτητα με την οποία η υπό δοκιμή ουσία απεκκρίνεται από τους οργανισμούς δοκιμής (19)(25). Η φάση αποβολής είναι πάντα υποχρεωτική, εκτός εάν η πρόσληψη της υπό δοκιμή ουσίας κατά τη διάρκεια της φάσης έκθεσης είναι ασημαντή (π.χ. εάν δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες δοκιμής και στους σκώληκες-μάρτυρες). Εάν κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης δεν επιτευχθεί σταθερή κατάσταση, ο προσδιορισμός της κινητικής $-BAF_k$, σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής- μπορεί να γίνει με τα αποτελέσματα της φάσης αποβολής. Η αλλαγή της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή στην επιφάνεια των σκώληκων παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο φάσεων της δοκιμής.
16. Κατά τη φάση πρόσληψης, εκτελούνται μετρήσεις μέχρι ο BAF να φθάσει σε φάση οριζόντιωσης ή σταθερή κατάσταση. Ως προεπιλογή, η διάρκεια της φάσης πρόσληψης αναμένεται να είναι 28 ημέρες. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι μια φάση πρόσληψης 12 έως 14 ημερών επαρκεί για να φτάσουν σε σταθερή κατάσταση αρκετές σταθερές, ουδέτερες οργανικές ενώσεις (6)(8)(9).
17. Ωστόσο, εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, η φάση αποβολής εκκινείται με τη μεταφορά εκτεθειμένων ολιγοχαιτών σε δοχεία που περιέχουν το ίδιο μέσο χωρίς την υπό δοκιμή ουσία. Η φάση αποβολής τερματίζεται όταν επιτυγχάνεται επίπεδο ίσο με το 10 % της συγκέντρωσης που μετριάται στους σκώληκες την ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης ή μετά από μέγιστη διάρκεια 10 ημερών. Το επίπεδο υπολειμμάτων στους σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως πρόσθετο τελικό σημείο, π.χ. ως μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER). Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BAF_{ss}) υπολογίζεται, κατά προτίμηση, τόσο ως η αναλογία της συγκέντρωσης στους σκώληκες (C_s) και στο ίζημα (C_i) σε εμφανώς σταθερή κατάσταση, όσο και ως συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης, BAF_k , εκφραζόμενος ως η αναλογία της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης από το ίζημα (k_i) προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_e) με την παραδοχή ότι η κινητική είναι πρώτης τάξης. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, ο BAF_k υπολογίζεται από τις σταθερές της ταχύτητας πρόσληψης και της ταχύτητας αποβολής. Για τον υπολογισμό, βλ. προσάρτημα 2. Εάν δεν εφαρμόζεται κινητική πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (προσάρτημα 2 και παραπομπή (25)).
18. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση εντός 28 ημερών, η φάση πρόσληψης μπορεί προαιρετικά να παραταθεί και ομάδες εκτεθειμένων σκώληκων να υποβληθούν -εφόσον διατίθενται- σε περαιτέρω μετρήσεις μέχρι την επίτευξη σταθερής κατάστασης. Παράλληλα, ωστόσο, η φάση αποβολής θα πρέπει να ξεκινάει την ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης.
19. Η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης, η σταθερά ταχύτητας αποβολής (ή οι σταθερές, όταν υπεισέρχονται πιο πολύπλοκα μοντέλα), ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_k) και, όπου είναι δυνατόν, τα όρια εμπιστοσύνης καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές υπολογίζονται με μοντέλα εξίσωσης μέσω υπολογιστή (για τα μοντέλα, βλ. προσάρτημα 2). Η ποιότητα της προσαρμογής κάθε μοντέλου μπορεί να διαπιστώνεται από τον συντελεστή συσχέτισης ή τον συντελεστή προσδιορισμού (συντελεστές που προσεγγίζουν τη μονάδα δηλώνουν καλή προσαρμογή).
20. Για να μειωθεί η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών στην περίπτωση οργανικών ουσιών με υψηλή λιποφιλία, θα πρέπει να εκφράζονται επιπλέον οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης σε σχέση με το λιπιδικό περιεχόμενο των οργανισμών δοκιμής και την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC) στο ίζημα (συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε βιοκόσμο-ίζημα ή BSAF σε kg TOC ιζήματος kg^{-1} λιπιδικού περιεχομένου του σκώληκα). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται σε εμπειρίες και θεωρητικές συσχετίσεις για το υδατικό διαμέρισμα, όπου -για μερικές χημικές τάξεις- υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ του δυναμικού μιας ουσίας να βιοσυσσωρεύεται και της λιποφιλίας της, το οποίο είναι μια καθιερωμένη μέθοδος με τα ψάρια ως πρότυπους οργανισμούς (14)(25)(27). Υπάρχει επίσης μια σχέση μεταξύ του λιπιδικού περιεχομένου των ψαριών δοκιμής και της παρατηρηθείσας βιοσυσσώρευσης των εν λόγω ουσιών. Για τους βενθικούς οργανισμούς, έχουν διαπιστωθεί παρόμοιες συσχετίσεις (15)(16)(17)(18). Εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκώληκων, το λιπιδικό περιεχόμενο των ζών δοκιμής μπορεί να προσδιορίζεται στο ίδιο βιολογικό υλικό με αυτό που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας. Ωστόσο, είναι πρακτικό να χρησιμοποιούνται εγκλιματισμένα ζώα-μάρτυρες, τουλάχιστον στην αρχή ή -κατά προτίμηση- στο τέλος της φάσης πρόσληψης για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση των τιμών BAF.

ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

21. Προϋποθέσεις εγκυρότητας της δοκιμής είναι οι ακόλουθες:
- Η συνολική θνησιμότητα των σκωλήκων (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) έως το τέλος της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % του αρχικού αριθμού.
 - Επιπλέον, θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι οι σκωλήκες φωλιάζουν στο ίζημα για να είναι δυνατή η μέγιστη έκθεση. Για λεπτομέρειες, βλ. παράγραφο 28.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είδη δοκιμής

22. Για τη δοκιμή μπορούν να χρησιμοποιούνται διάφορα είδη υδρόβιων ολιγοχαιτών. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη παρατίθενται στο προσάρτημα 6.
23. Θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμές τοξικότητας (96 ώρες, μόνο σε νερό) ανά τακτά διαστήματα (π.χ. κάθε μήνα) με τοξική ουσία αναφοράς, όπως το χλωριούχο κάλιο (KCl) ή ο θειικός χαλκός (CuSO₄) (1), για να καταδεικνύεται η κατάσταση υγείας των ζώων δοκιμής (1)(6). Εάν δεν διεξάγονται δοκιμές τοξικότητας αναφοράς ανά τακτά διαστήματα, η παρτίδα οργανισμών που θα χρησιμοποιηθεί σε μια δοκιμή βιοσυσσώρευσης ιζήματος θα πρέπει να ελέγχεται με τη χρήση μιας τοξικής ουσίας αναφοράς. Χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των ζώων μπορούν να προκύψουν επίσης από τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου.

Καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής

24. Προκειμένου ο αριθμός των σκωλήκων να επαρκεί για τη διεξαγωγή δοκιμών βιοσυσσώρευσης, οι σκωλήκες μπορεί να πρέπει να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια ενός είδους. Μέθοδοι εργαστηριακής καλλιέργειας για τα επιλεγμένα είδη δοκιμής συνοψίζονται στο προσάρτημα 6. Για λεπτομέρειες, βλ. παραπομπές (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Συσκευές

25. Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να μην χρησιμοποιούνται, σε οποιοδήποτε τμήμα του εξοπλισμού, υλικά που μπορούν να διαλύουν ή να προσροφούν τις υπό δοκιμή ουσίες ή να αποπλένουν άλλες ουσίες και να έχουν δυσμενή επίδραση στα ζώα δοκιμής. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθεις ορθογώνιοι ή κυλινδρικοί θάλαμοι, κατασκευασμένοι από χημικώς αδρανές υλικό και με κατάλληλη χωρητικότητα ανάλογα με τον ρυθμό πλήρωσης, δηλαδή τον αριθμό των σκωλήκων δοκιμής. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση μαλακών πλαστικών σωληνώσεων για τη χορήγηση νερού ή αέρα. Για τον εξοπλισμό που έρχεται σε επαφή με τα μέσα της δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιείται πολυετρυφθοροαιθυλένιο, ανοξείδωτος χάλυβας ή/και γυαλί. Για ουσίες με υψηλούς συντελεστές προσρόφησης, όπως τα συνθετικά πυρεθροειδή, μπορεί να απαιτείται η χρήση σιλιανιωμένου γυαλιού. Στις περιπτώσεις αυτές, ο εξοπλισμός πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση (5). Για ραδιοσημασμένες υπό δοκιμή ουσίες και για πηκτικές ουσίες, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η αφαίρεση και η διαφυγή υπό δοκιμή ουσίας που έχει αφαιρεθεί. Για τη συγκράτηση τυχόν υπολειμμάτων που εξατμίζονται από τους θαλάμους δοκιμής, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παγίδες (π.χ. γυάλινες φιάλες πλύσης αερίου) που περιέχουν κατάλληλα απορροφητικά υλικά (11).

Νερό

26. Το υπερκείμενο νερό πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε το είδος δοκιμής να μπορεί να επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής χωρίς να παρουσιάζει οποιαδήποτε μη φυσιολογική εμφάνιση ή συμπεριφορά. Ως υπερκείμενο νερό στις δοκιμές καθώς και στις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων συνιστάται η χρήση ανασυσταθέντος νερού σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.1 (25). Έχει καταδειχθεί ότι διάφορα είδη δοκιμής μπορούν να επιβιώσουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε αυτό το νερό (8), ενώ εξασφαλίζεται μέγιστη τυποποίηση της δοκιμής καθώς και των συνθηκών καλλιέργειας. Το νερό θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον βάσει του pH, της αγωγιμότητας και της σκληρότητας. Η ανάλυση του νερού για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες (προσάρτημα 4).
27. Κατά τη διάρκεια μιας δοκιμής, το νερό θα πρέπει να είναι σταθερής ποιότητας. Το pH του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9. Η συνολική σκληρότητα θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90 και 400 mg CaCO₃ ανά λίτρο κατά την έναρξη της δοκιμής (7). Τα εύρη για το pH και τη σκληρότητα για το αναφερόμενο ανασυσταθέν νερό παρέχονται στη μέθοδο δοκιμών Γ.1 (25). Εάν υπάρχουν υπόνοιες για αλληλεπίδραση μεταξύ ιόντων σκληρότητας και της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται νερό χαμηλότερης σκληρότητας. Πρόσθετα κριτήρια ενός αποδεκτού νερού αραιώσης σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών (TG) 210 του ΟΟΣΑ παρέχονται στο προσάρτημα 4 (34).

Ϊζημα

28. Το ίζημα πρέπει να είναι τέτοιας ποιότητας ώστε οι οργανισμοί δοκιμής να μπορούν να επιβιώσουν και, κατά προτίμηση, να αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του εγκλιματισμού και της δοκιμής, χωρίς να παρουσιάζουν μη φυσιολογική εμφάνιση ή συμπεριφορά. Οι σκώληκες θα πρέπει να φωλιάζουν μέσα στο ίζημα. Η συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα μπορεί να επιδρά στην έκθεση και κατά συνέπεια στον ΒΑΦ. Επομένως, η αποφυγή του ιζήματος ή η συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα των οργανισμών δοκιμής θα πρέπει να καταγράφονται, όταν η θολερότητα του υπερκείμενου νερού επιτρέπει τις εν λόγω παρατηρήσεις. Οι σκώληκες (μάρτυρες και ομάδες αγωγής) θα πρέπει να φωλιάζουν στο ίζημα εντός 24 ωρών μετά την προσθήκη στα δοχεία δοκιμής. Εάν παρατηρηθεί μόνιμη αποτυχία των σκωλήκων να φωλιάσουν ή αποφυγή του ιζήματος (π.χ. ποσοστό άνω του 20 % αφού παρέλθει περισσότερο από το ήμισυ της φάσης πρόσληψης), αυτό δηλώνει ότι οι συνθήκες δοκιμής δεν είναι κατάλληλες, οι οργανισμοί δοκιμής δεν είναι υγιείς ή η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας προκαλεί αυτήν τη συμπεριφορά. Σε μια τέτοια περίπτωση, η δοκιμή θα πρέπει να διακόπτεται και να επαναλαμβάνεται κάτω από βελτιωμένες συνθήκες. Πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την κατανάλωση ιζήματος μπορούν να λαμβάνονται με τη χρήση των μεθόδων που περιγράφονται στα σημεία (35)(36), οι οποίες προσδιορίζουν την κατανάλωση ιζήματος ή την επιλογή σωματιδίων στους οργανισμούς δοκιμής. Εάν μπορεί να γίνει παρατήρηση, θα πρέπει να καταγράφεται τουλάχιστον η παρουσία ή απουσία σφαιριδίων κοπράνων στην επιφάνεια του ιζήματος, η οποία υποδεικνύει την κατανάλωση ιζήματος από τους σκώληκες, και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής όσον αφορά τις οδούς έκθεσης.
29. Στις δοκιμές και στις εργαστηριακές καλλιέργειες των σκωλήκων συνιστάται η χρήση ενός τεχνητού ιζήματος που βασίζεται στο τεχνητό έδαφος το οποίο περιγράφεται στη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (40) (προσάρτημα 5), επειδή φυσικά ιζήματα κατάλληλης ποιότητας ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Επιπλέον, οι αυτόχθονες οργανισμοί, καθώς και η πιθανή παρουσία μικρορύπων στα φυσικά ιζήματα, μπορούν να επηρεάσουν τη δοκιμή. Διάφορα είδη δοκιμής μπορούν να επιβιώνουν, να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται στο τεχνητό ίζημα (8).
30. Το τεχνητό ίζημα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται τουλάχιστον από την προέλευση των συστατικών, την κατανομή μεγέθους κόκκων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την περιεκτικότητα σε νερό και το pH. Η μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού είναι προαιρετική. Ωστόσο, φυσικά ιζήματα που προέρχονται από μη ρυπασμένες τοποθεσίες μπορούν να χρησιμεύουν ως ίζημα δοκιμής ή/και καλλιέργειας (1). Τα φυσικά ιζήματα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τουλάχιστον από την προέλευση (τόπος συλλογής), το pH και τη συγκέντρωση αμμωνίας του ενδοπορικού νερού, την περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), την κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου) και το ποσοστό υγρασίας (6). Εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, πριν από τον εμβολιασμό του φυσικού ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία, συνιστάται ο εγκλιματισμός του φυσικού ιζήματος για επτά ημέρες υπό τις συνθήκες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο τέλος αυτής της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Η ανάλυση του ιζήματος ή των συστατικών του για παρουσία μικρορύπων πριν από τη χρήση μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες.

Παρασκευή

31. Ο χειρισμός των φυσικών ιζημάτων πριν από τη χρήση τους στο εργαστήριο περιγράφεται στα σημεία (1)(6)(44). Στο προσάρτημα 5, περιγράφεται ο τρόπος παρασκευής του τεχνητού ιζήματος.

Αποθήκευση

32. Ο χρόνος αποθήκευσης των φυσικών ιζημάτων στο εργαστήριο θα πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός. Η Υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (U.S. EPA) (6) συνιστά μέγιστη περίοδο αποθήκευσης 8 εβδομάδων στους 4 ± 2 °C στο σκοτάδι. Δεν θα πρέπει να υπάρχει υπερκείμενος χώρος επάνω από το ίζημα στους περιέκτες αποθήκευσης. Συστάσεις για την αποθήκευση του τεχνητού ιζήματος παρέχονται στο προσάρτημα 5.

Εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας

33. Το ίζημα εμβολιάζεται με την υπό δοκιμή ουσία. Η διαδικασία εμβολιασμού περιλαμβάνει την επιστροφή ενός ή περισσότερων από τα συστατικά του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Για παράδειγμα, η χαλαζιακή άμμος ή τμήμα της (π.χ. 10 g χαλαζιακής άμμου ανά δοχείο δοκιμής) μπορεί να εμποτιστεί με διάλυμα της υπό δοκιμή ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος στη συνέχεια εξατμίζεται αργά μέχρι ξηρού. Το επιστρωμένο κλάσμα μπορεί στη συνέχεια να αναμειχθεί με το υγρό ίζημα. Κατά την παρασκευή του ιζήματος, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα της άμμου που παρέχεται από το μείγμα υπό δοκιμή ουσίας και άμμου, δηλαδή το ίζημα θα πρέπει επομένως να παρασκευάζεται με λιγότερη άμμο (6).

34. Όταν χρησιμοποιείται φυσικό ίζημα, η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να προστίθεται με εμβολιασμό ενός ξηρού τμήματος του ιζήματος, όπως περιγράφεται ανωτέρω για το τεχνητό ίζημα, ή με ανάδευση της υπό δοκιμή ουσίας μέσα στο υγρό ίζημα, με επακόλουθη εξάτμιση τυχόν χρησιμοποιούμενου παράγοντα διαλυτοποίησης. Οι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρού ιζήματος είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο μονομεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, ο διμεθυλαιθέρας της αιθυλενογλυκόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο και η τριαιθυλενογλυκόλη (5)(34). Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλου μέσου διαλυτοποίησης θα πρέπει να είναι η τοξικότητα και η πτητικότητα του διαλύτη, καθώς και η διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας στον επιλεγμένο διαλύτη. Πρόσθετη καθοδήγηση σχετικά με τις διαδικασίες εμβολιασμού παρέχεται στο έγγραφο Environment Canada (1995)(41). Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να εξασφαλίζεται ότι η υπό δοκιμή ουσία που προστίθεται στο ίζημα είναι πλήρως και ομοιογενώς κατανεμημένη μέσα στο ίζημα. Οι επαναλήψεις των επιμέρους δειγμάτων του εμβολιασμένου ιζήματος θα πρέπει να αναλύονται για να ελέγχονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα και να προσδιορίζεται ο βαθμός ομοιογένειας της κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας.
35. Μετά την ετοιμασία του εμβολιασμένου ιζήματος με το υπερκείμενο νερό, είναι σκόπιμο να παρέχεται ένα χρονικό περιθώριο για την κατανομή της υπό δοκιμή ουσίας μεταξύ του ιζήματος και της υδατικής φάσης. Αυτό θα πρέπει να γίνεται κατά προτίμηση υπό τις συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού που εφαρμόζονται στη δοκιμή. Ο κατάλληλος χρόνος εξισορρόπησης είναι ειδικός για τα ίζηματα και τις ουσίες και μπορεί να κυμαίνεται από ώρες έως ημέρες και, σε σπάνιες περιπτώσεις, έως αρκετές εβδομάδες (4-5 εβδομάδες) (28)(42). Σε αυτήν τη δοκιμή, δεν αναμένεται η επίτευξη ισορροπίας, αλλά συνιστάται περίοδος εξισορρόπησης από 48 ώρες έως 7 ημέρες. Ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης, για παράδειγμα όταν πρέπει να προσομοιώνονται περιβαλλοντικές συνθήκες, το εμβολιασμένο ίζημα μπορεί να υποστεί εξισορρόπηση ή παλαιώση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (11).

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Προκαταρκτική δοκιμή

36. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της οριστικής δοκιμής, μπορεί να είναι χρήσιμο να γίνει ένα προκαταρκτικό πείραμα, π.χ. επιλογή της ή των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας, καθώς και της διάρκειας των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Η συμπεριφορά των σκωλήκων θα πρέπει να παρατηρείται και να καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας προκαταρκτικής δοκιμής, για παράδειγμα η αποφυγή του ιζήματος, δηλ. οι σκώληκες διαφεύγουν από το ίζημα το οποίο μπορεί να οφείλεται στην υπό δοκιμή ουσία ή/και στο ίδιο το ίζημα. Η αποφυγή του ιζήματος μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται ως υποθανατηφόρος παράμετρος σε μια προκαταρκτική δοκιμή για την εκτίμηση της συγκέντρωσης ή των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας προς χρήση σε μια δοκιμή βιοσυσσώρευσης.

Συνθήκες έκθεσης

Διάρκεια της φάσης πρόσληψης

37. Οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης. Το πρώτο δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται μεταξύ 4 και 24 ωρών από την έναρξη της φάσης πρόσληψης. Η φάση πρόσληψης θα πρέπει να διαρκεί έως 28 ημέρες (1)(6)(11) εκτός κι αν αποδεδειγμένα επιτευχθεί νωρίτερα η ισορροπία. Σταθερή κατάσταση επικρατεί όταν: (i) η γραφική παράσταση των συντελεστών βιοσυσσώρευσης σε κάθε περίοδο δειγματοληψίας συναρτήσει του χρόνου είναι παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου, (ii) τρεις διαδοχικές αναλύσεις του BAF σε δείγματα που λαμβάνονται κατά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους κατά περισσότερο από $\pm 20\%$ και (iii) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας (με βάση στατιστικές συγκρίσεις, π.χ. ανάλυση μεταβλητότητας και ανάλυση παλινδρόμησης). Εάν δεν έχει επιτευχθεί σταθερή κατάσταση σε 28 ημέρες, η φάση πρόσληψης μπορεί να διακοπεί με την έναρξη της φάσης αποβολής και ο BAF_k μπορεί να υπολογιστεί από τις σταθερές ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής (βλ. επίσης παραγράφους 16 έως 18).

Διάρκεια της φάσης αποβολής

38. Το πρώτο δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται μεταξύ 4 και 24 ωρών από την έναρξη της φάσης αποβολής, επειδή κατά τη διάρκεια της αρχικής περιόδου ενδέχεται να προκύψουν ταχείες αλλαγές στα υπολείμματα ιστού. Συνιστάται να τερματίζεται η φάση αποβολής όταν η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας είναι μικρότερη από το 10 % της συγκέντρωσης σταθερής κατάστασης ή μετά από μια μέγιστη χρονική περίοδο 10 ημερών. Το επίπεδο υπολειμμάτων στους σκώληκες στο τέλος της φάσης αποβολής αναφέρεται ως δευτερεύον τελικό σημείο. Η περίοδος μπορεί, εντούτοις, να εξαρτάται από την περίοδο κατά την οποία η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες παραμένει πάνω από το αναλυτικό όριο ανίχνευσης.

Οργανισμοί δοκιμής

Αριθμοί σκωλήκων δοκιμής

39. Ο αριθμός των σκωλήκων ανά δείγμα πρέπει να παρέχει μάζα ιστού σκωλήκων τέτοια ώστε η μάζα της υπό δοκιμή ουσίας ανά δείγμα στην αρχή της φάσης πρόσληψης και στο τέλος της φάσης αποβολής, αντίστοιχα, να είναι σημαντικά υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης για την υπό δοκιμή ουσία στο βιολογικό υλικό. Στα αναφερόμενα στάδια πρόσληψης και αποβολής, η συγκέντρωση στα ζώα δοκιμής συνήθως είναι σχετικά χαμηλή (6)(8)(18). Επειδή το βάρος σώματος ανά άτομο σε πολλά είδη υδρόβιων ολιγοχαπών είναι πολύ χαμηλό (5-10 mg υγρό βάρος ανά άτομο για το *Lumbriculus variegatus* και το *Tubifex tubifex*), οι σκώληκες ενός συγκεκριμένου θαλάμου δοκιμής επανάληψης μπορεί να συνενωθούν για τη μέτρηση του βάρους και την ανάλυση της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Για τα είδη δοκιμής με μεγαλύτερο βάρος σώματος (π.χ. *Branchiura sowerbyi*) μπορούν να χρησιμοποιούνται επαναλήψεις οι οποίες περιέχουν ένα άτομο, αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις ο αριθμός των επαναλήψεων θα πρέπει να αυξάνεται σε πέντε ανά σημείο δειγματοληψίας (11). Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι το *B. sowerbyi* δεν έχει συμπεριληφθεί στην κυκλική δοκιμή (12) και, επομένως, δεν συνιστάται ως προτιμώμενο είδος στη μέθοδο.
40. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σκώληκες παρόμοιοι μεγέθους (για το *L. variegatus*, βλ. προσάρτημα 6). Θα πρέπει να προέρχονται από την ίδια πηγή και να είναι ενήλικα ή μεγάλα ζώα της ίδιας ηλικιακής κατηγορίας (βλ. προσάρτημα 6). Το βάρος και η ηλικία ενός ζώου μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές BAF (π.χ. λόγω διαφορετικού λιπιδικού περιεχομένου ή/και της παρουσίας αυγών) και αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να καταγράφονται με ακρίβεια. Για τη μέτρηση του μέσου υγρού και ξηρού βάρους, ένα επιμέρους δείγμα των σκωλήκων θα πρέπει να ζυγίζεται πριν από την έναρξη της δοκιμής.
41. Με τα είδη *Tubifex tubifex* και *Lumbriculus variegatus*, αναμένεται αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της περιόδου δοκιμής. Η απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιουσοσύρευσης θα πρέπει να καταγράφεται και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Πλήρωση

42. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υψηλές αναλογίες ιζήματος προς σκώληκες και νερού προς σκώληκες, προκειμένου να ελαχιστοποιείται η μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και να αποφεύγονται μειώσεις στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Επίσης, ο επιλεγμένος ρυθμός πλήρωσης θα πρέπει να αντιστοιχεί στις φυσικές πυκνότητες πληθυσμών των επιλεγμένων ειδών (43). Για παράδειγμα, για το *Tubifex tubifex* συνιστάται ρυθμός πλήρωσης της τάξεως του 1-4 mg ιστού σκώληκα (υγρό βάρος) ανά γραμμάριο υγρού ιζήματος (8)(11). Στις παραπομπές (1) και (6) συνιστάται ρυθμός πλήρωσης ≤ 1 g ξηρού βάρους ιστού σκώληκα ανά 50 g οργανικού άνθρακα ιζήματος για το *L. variegatus*.
43. Οι σκώληκες που θα χρησιμοποιηθούν σε μια δοκιμή απομακρύνονται από την καλλιέργεια με κοσκίνισμα του ιζήματος της καλλιέργειας. Τα ζώα (ενήλικες ή μεγάλοι σκώληκες χωρίς σημάδια πρόσφατης κατάτησης) μεταφέρονται σε γυάλινα τρυβλία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν καθαρό νερό. Εάν οι συνθήκες δοκιμής διαφέρουν από τις συνθήκες καλλιέργειας, μια φάση εγκλιματισμού διάρκειας 24 ωρών θα πρέπει να είναι επαρκής. Πριν από τη ζύγιση, θα πρέπει να απομακρύνεται η περίσσεια νερού από τους σκώληκες με απαλή τοποθέτηση των σκωλήκων σε χαρτί που έχει προηγουμένως υγρανθεί. Δεν συνιστάται η χρήση απορροφητικού χαρτιού για να στεγνώσουν οι σκώληκες, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει πίεση ή ζημιά στους σκώληκες. Οι Brunson κ.α. (1998) συνιστούν τη χρήση σκωλήκων που δεν έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί με βιομάζα μεγαλύτερη κατά περίπου 1,33 φορές από τη βιομάζα-στόχο. Αυτό το επιπλέον 33 % αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ των σκωλήκων που έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί και των σκωλήκων που δεν έχουν στεγνωθεί με απορροφητικό χαρτί (28).
44. Κατά την έναρξη της φάσης πρόσληψης (ημέρα 0 της δοκιμής), οι οργανισμοί δοκιμής απομακρύνονται από τον θάλαμο εγκλιματισμού και κατανέμονται τυχαία σε δοχεία (π.χ. τρυβλία Petri) που περιέχουν ανασυσταθέν νερό με την προσθήκη ομάδων δύο σκωλήκων σε κάθε δοχείο, μέχρι κάθε δοχείο να περιέχει δέκα σκώληκες. Στη συνέχεια, κάθε μία από αυτές τις ομάδες σκωλήκων μεταφέρεται τυχαία σε ξεχωριστά δοχεία δοκιμής, π.χ. με χρήση μαλακής χαλύβδινης λαβίδας. Τα δοχεία δοκιμής, κατόπιν, επωάζονται υπό τις συνθήκες της δοκιμής.

Σίτιση

45. Εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά του τεχνητού ιζήματος, το ίζημα θα πρέπει να τροποποιείται με μια πηγή τροφής. Προκειμένου να μην υποεκτιμάται η έκθεση των οργανισμών δοκιμής, π.χ. με την επιλεκτική σίτιση μη μολυσμένων τροφών, η τροφή που απαιτείται για την αναπαραγωγή και ανάπτυξη των οργανισμών δοκιμής θα πρέπει να προστίθεται στο ίζημα μία φορά πριν ή κατά τη διάρκεια της χορήγησης της υπό δοκιμή ουσίας (βλ. προσάρτημα 5).

Αναλογία ιζήματος-νερού

46. Η συνιστώμενη αναλογία ιζήματος-νερού είναι 1:4 (45). Η αναλογία αυτή θεωρείται κατάλληλη για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων οξυγόνου σε κατάλληλα επίπεδα και την αποφυγή συσσώρευσης αμμωνίας στο υπερκείμενο νερό. Η περιεκτικότητα σε οξυγόνο του υπερκείμενου νερού θα πρέπει να διατηρείται σε τιμή ≥ 40 % της τιμής κορεσμού. Το υπερκείμενο νερό των δοχείων δοκιμής θα πρέπει να αερίζεται ήπια (π.χ. 2-4 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος

Φως και θερμοκρασία

47. Η φωτοπερίοδος στην καλλιέργεια και στη δοκιμή είναι 16 ώρες (1)(6). Η ένταση φωτός στην περιοχή δοκιμής θα πρέπει να διατηρείται στα 500-1 000 lx περίπου. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 20 ± 2 °C καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής.

Συγκεντρώσεις δοκιμής

48. Για τον προσδιορισμό της κινητικής πρόσληψης, χρησιμοποιείται μία συγκέντρωση δοκιμής (όσο το δυνατόν χαμηλότερη), ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μια δεύτερη (υψηλότερη) συγκέντρωση (π.χ. (46)). Σε αυτήν την περίπτωση, λαμβάνονται δείγματα τα οποία αναλύονται σε σταθερή κατάσταση ή μετά από 28 ημέρες για να επιβεβαιωθεί ο ΒΑF που μετρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση (11). Η υψηλότερη συγκέντρωση θα πρέπει να επιλέγεται προκειμένου να αποκλείονται οι δυσμενείς επιδράσεις (π.χ. με επιλογή του 1 % περίπου της χαμηλότερης γνωστής χρόνιας συγκέντρωσης επίδρασης EC_x όπως προκύπτει από τις σχετικές μελέτες χρόνιας τοξικότητας). Η χαμηλότερη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι σημαντικά υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης στο ίζημα και στα βιολογικά δείγματα με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Εάν η συγκέντρωση επίδρασης της υπό δοκιμή ουσίας προσεγγίζει το αναλυτικό όριο ανίχνευσης, συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένης υπό δοκιμή ουσίας με υψηλή ειδική ραδιενέργεια.

Επαναλήψεις της αγωγής και του μάρτυρα

49. Ο ελάχιστος αριθμός των επαναλήψεων της αγωγής για τις μετρήσεις κινητικής θα πρέπει να είναι τρεις ανά σημείο δειγματοληψίας (11) καθ' όλη τη φάση πρόσληψης και αποβολής. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσθετες επαναλήψεις, π.χ. για προαιρετικές πρόσθετες ημερομηνίες δειγματοληψίας. Για τη φάση αποβολής, προετοιμάζεται αντίστοιχος αριθμός επαναλήψεων με μη εμβολιασμένο ίζημα και υπερκείμενο νερό, για να είναι δυνατή η μεταφορά των σκωλήκων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή από τα καθορισμένα δοχεία αγωγής στα δοχεία χωρίς αγωγή στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Ο συνολικός αριθμός των επαναλήψεων της αγωγής θα πρέπει να είναι επαρκής για τη φάση πρόσληψης και τη φάση αποβολής.
50. Εναλλακτικά, οι σκωλήκες που προορίζονται για δειγματοληψία κατά τη φάση αποβολής μπορούν να υποβάλλονται σε έκθεση μέσα σε έναν μεγάλο περιέκτη που περιέχει εμβολιασμένο ίζημα της ίδιας παρτίδας με αυτήν που χρησιμοποιείται για την κινητική πρόσληψης. Θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι οι συνθήκες δοκιμής (π.χ. βάθος ιζήματος, αναλογία ιζήματος-νερού, πλήρωση, θερμοκρασία, ποιότητα νερού) είναι συγκρίσιμες με τις επαναλήψεις που προορίζονται για τη φάση πρόσληψης. Στο τέλος της φάσης πρόσληψης, θα πρέπει να λαμβάνονται από αυτόν τον περιέκτη δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων για ανάλυση, και ένας επαρκής αριθμός μεγάλων σκωλήκων που δεν εμφανίζουν σημάδια πρόσφατης κατάτμησης θα πρέπει να απομακρύνεται προσεκτικά και να μεταφέρεται στα δοχεία επανάληψης που έχουν προετοιμαστεί για τη φάση αποβολής (π.χ. δέκα οργανισμοί ανά δοχείο επανάληψης).
51. Εάν δεν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης πλην του νερού, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 9 δοχεία επανάληψης αρνητικού μάρτυρα (δειγματοληψία από τουλάχιστον 3 από τα δοχεία αυτά κατά την έναρξη της δοκιμής, από 3 στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από 3 στο τέλος της φάσης αποβολής) για βιολογική ανάλυση και ανάλυση υποβάθρου. Εάν χρησιμοποιείται μέσο διαλυτοποίησης για την εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας, θα πρέπει να εκτελούνται μετρήσεις σε μάρτυρα με διαλύτη (θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από τουλάχιστον 3 δοχεία επανάληψης κατά την έναρξη της δοκιμής, από 3 στο τέλος της φάσης πρόσληψης και από 3 κατά το τέλος της φάσης αποβολής). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να προβλέπονται τουλάχιστον 4 δοχεία επανάληψης ενός αρνητικού μάρτυρα (χωρίς διαλύτη) για δειγματοληψία στο τέλος της φάσης πρόσληψης. Οι εν λόγω επαναλήψεις μπορούν να συγκρίνονται από βιολογικής πλευράς με τον μάρτυρα με διαλύτη ώστε να συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με την ενδεχόμενη επίδραση του διαλύτη στους οργανισμούς δοκιμής. Λεπτομέρειες δίδονται στο προσάρτημα 3.

Συχνότητα λήψης μετρήσεων της ποιότητας του νερού

52. Θα πρέπει να μετρώνται τουλάχιστον οι ακόλουθες παράμετροι ποιότητας νερού στο υπερκείμενο νερό κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης και αποβολής:

| | |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Θερμοκρασία | σε ένα δοχείο κάθε επιπέδου αγωγής ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και σε ένα δοχείο μάρτυρα μία φορά την εβδομάδα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής. Μπορεί επίσης να καταγράφεται η θερμοκρασία στο περιβάλλον μέσο (αέρας περιβάλλοντος ή υδατόλουτρο) ή σε ένα αντιπροσωπευτικό δοχείο δοκιμής π.χ. σε συνεχή βάση ή σε ωριαία διαστήματα, |
| Περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο | σε ένα δοχείο κάθε επιπέδου αγωγής και σε ένα δοχείο μάρτυρα ανά ημερομηνία δειγματοληψίας, εκφραζόμενη ως mg/L και % ASV (τιμή κορεσμού με αέρα), |
| Παροχή αέρα | ελέγχεται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα (εργάσιμες ημέρες) και ρυθμίζεται, εάν απαιτείται, |
| pH | σε ένα δοχείο αγωγής κάθε επιπέδου αγωγής ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και σε ένα δοχείο μάρτυρα μία φορά την εβδομάδα και στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής, |
| Συνολική σκληρότητα νερού | τουλάχιστον σε ένα δοχείο αγωγής και σε ένα δοχείο δοκιμής μάρτυρα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής, εκφραζόμενη ως mg/l CaCO ₃ , |
| Συνολική περιεκτικότητα σε αμμωνία | τουλάχιστον σε ένα δοχείο αγωγής και σε ένα δοχείο δοκιμής μάρτυρα στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πρόσληψης και αποβολής, εκφραζόμενη ως mg/l NH ₄ ⁺ ή NH ₃ ή συνολικό αμμωνιακό N. |

Δειγματοληψία και ανάλυση σκωλήκων, ιζήματος και νερού*Πρόγραμμα δειγματοληψίας*

53. Παραδείγματα προγραμμάτων δειγματοληψίας για μια 28ήμερη φάση πρόσληψης και μια 10ήμερη φάση αποβολής παρατίθενται στο προσάρτημα 3.
54. Από τους θαλάμους δοκιμής λαμβάνονται δείγματα νερού και ιζήματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, πριν από την εισαγωγή των σκωλήκων, καθώς και κατά τη διάρκεια των φάσεων πρόσληψης και αποβολής. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, στο ίζημα και στο νερό για την παρακολούθηση της κατανομής της υπό δοκιμή ουσίας στα διαμερίσματα του συστήματος δοκιμής.
55. Από τους σκώληκες, το ίζημα και το νερό λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον έξι φορές κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, καθώς και της φάσης αποβολής.
56. Η δειγματοληψία συνεχίζεται μέχρι την επίτευξη φάσης οριζοντίωσης (σταθερή κατάσταση) (βλ. προσάρτημα 1) ή για 28 ημέρες. Εάν δεν έχει επιτευχθεί οριζοντίωση εντός 28 ημερών, ξεκινάει η φάση αποβολής. Κατά την έναρξη της φάσης αποβολής, οι καθορισμένοι σκώληκες μεταφέρονται σε θαλάμους επανάληψης που περιέχουν ίζημα χωρίς αγωγή καθώς και νερό (βλ. επίσης παραγράφους 17 και 18).

Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος

57. Λαμβάνονται δείγματα νερού με μετάγγιση, σιφωνισμό ή με λήψη μέσω σιφωνίου ενός όγκου που επαρκεί για τη μέτρηση της ποιότητας της υπό δοκιμή ουσίας στο δείγμα.
58. Το εναπομένον υπερκείμενο νερό μεταφέρεται προσεκτικά με μετάγγιση ή σιφωνισμό από τους θαλάμους δοκιμής. Τα δείγματα ιζήματος θα πρέπει να λαμβάνονται προσεκτικά, ώστε να προκαλείται ελάχιστη διαταραχή των σκωλήκων.
59. Όλοι οι σκώληκες απομακρύνονται από το δοχείο επανάληψης της δοκιμής στο χρόνο δειγματοληψίας, π.χ. σχηματίζοντας εναιώρημα του ιζήματος με υπερκείμενο νερό, απλώνοντας τα περιεχόμενα κάθε δοχείου επανάληψης σε έναν ρηχό δίσκο και συλλέγοντας τους σκώληκες με τη βοήθεια μαλακής χαλύβδινης λαβίδας. Εκπλένονται γρήγορα με νερό σε ρηχό γυάλινο ή χαλύβδινο δίσκο. Απομακρύνεται η περίσσεια νερού. Οι σκώληκες μεταφέρονται με προσοχή σε προζυγισμένο δοχείο και ζυγίζονται. Οι σκώληκες θανατώνονται με κατάψυξη (π.χ. ≤ -18 °C). Θα πρέπει να καταγράφεται η παρουσία και ο αριθμός κουκουλιών ή/και νεαρών ατόμων.

60. Σε γενικές γραμμές, οι σκώληκες θα πρέπει να ζυγίζονται και να θανατώνονται αμέσως μετά τη δειγματοληψία χωρίς φάση κένωσης του εντέρου για τη λήψη ενός συντηρητικού BAF που περιλαμβάνει το μολυσμένο περιεχόμενο του εντέρου και για την αποφυγή κάθε απώλειας σωματικών υπολειμμάτων κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου κένωσης του εντέρου μόνο σε νερό (8). Ουσίες με $\log K_{ow}$ μεγαλύτερο από 5 δεν αναμένεται να αποβάλλονται σημαντικά κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου κένωσης του εντέρου μόνο σε νερό, ενώ οι ουσίες με $\log K_{ow}$ μικρότερο από 4 μπορεί να χάνονται σε σημαντικές ποσότητες (47).
61. Κατά τη φάση αποβολής, οι σκώληκες κενώνουν το έντερό τους σε καθαρό ίζημα. Αυτό συνεπάγεται ότι οι μετρήσεις αμέσως πριν από τη φάση αποβολής περιλαμβάνουν το μολυσμένο ίζημα από το έντερο, ενώ μετά τις πρώτες 4 έως 24 ώρες της φάσης αποβολής, θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος του μολυσμένου περιεχομένου του εντέρου έχει αντικατασταθεί από καθαρό ίζημα (11)(47). Η συγκέντρωση των σκωλήκων σε αυτό το δείγμα μπορεί τότε να θεωρείται ως η συγκέντρωση στον ιστό μετά την κένωση του εντέρου. Για να λαμβάνεται υπόψη η αραίωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας από μη μολυσμένο ίζημα κατά τη φάση αποβολής, το βάρος του περιεχομένου του εντέρου μπορεί να υπολογίζεται από τον λόγο υγρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα ή από τον λόγο ξηρού βάρους/βάρος της τέφρας του σκώληκα.
62. Εάν ο σκοπός μιας συγκεκριμένης μελέτης είναι η μέτρηση της βιοδιαθεσιμότητας και των πραγματικών υπολειμμάτων ιστού στους οργανισμούς δοκιμής, τουλάχιστον ένα επιμέρους δείγμα των ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή (π.χ. από τρία επιπλέον δοχεία επανάληψης), το οποίο λαμβάνεται κατά προτίμηση σε σταθερή κατάσταση, θα πρέπει να ζυγίζεται, να κενώνεται σε καθαρό νερό για περίοδο 6 ωρών (47) και να ζυγίζεται ξανά πριν από την ανάλυση. Στη συνέχεια, τα δεδομένα που αφορούν το βάρος και τη συγκέντρωση στο σώμα των σκωλήκων από αυτό το επιμέρους δείγμα μπορούν να συγκρίνονται με τις τιμές που λαμβάνονται από σκώληκες που δεν έχουν υποβληθεί σε κένωση. Δεν θα πρέπει να γίνεται κένωση στους σκώληκες που προορίζονται για τη μέτρηση της αποβολής προτού μεταφερθούν σε καθαρό ίζημα για την ελαχιστοποίηση πρόσθετης πίεσης για τα ζώα.
63. Τα δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων πρέπει να αναλύονται κατά προτίμηση αμέσως (δηλ. εντός 1-2 ημερών) μετά την αφαίρεση, προκειμένου να αποφευχθούν η αποικοδόμηση ή άλλες απώλειες και για τον υπολογισμό των κατά προσέγγιση ταχυτήτων πρόσληψης και αποβολής κατά την πορεία της δοκιμής. Με την άμεση ανάλυση αποφεύγονται επίσης καθυστερήσεις στον προσδιορισμό του χρόνου επίτευξης οριζοντίωσης.
64. Εάν δεν είναι δυνατή η άμεση ανάλυση, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες. Πρέπει να λαμβάνονται πληροφορίες για τη σταθερότητα και τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία πριν από την έναρξη της δοκιμής (π.χ. διάρκεια και θερμοκρασία αποθήκευσης, διαδικασίες εκχύλισης κ.λπ.). Εάν οι εν λόγω πληροφορίες δεν είναι διαθέσιμες και κρίνεται ότι είναι απαραίτητες, μπορούν να αναλύονται ταυτόχρονα εμβολιασμένοι ιστοί-μάρτυρες για να προσδιορίζεται η σταθερότητα της αποθήκευσης.

Ποιότητα της αναλυτικής μεθόδου

65. Επειδή η όλη διαδικασία εξαρτάται βασικά από την ακρίβεια (accuracy), την πιστότητα (precision) και την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται για την υπό δοκιμή ουσία, πρέπει να ελέγχεται πειραματικά αν η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της χημικής ανάλυσης, καθώς επίσης και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας από τα δείγματα νερού, ιζήματος και σκωλήκων είναι ικανοποιητικές για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ομοίως, πρέπει να εξακριβώνεται ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη στους θαλάμους-μάρτυρες σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τη συγκέντρωση υποβάθρου. Εάν απαιτείται, διορθώνονται οι τιμές C_w , C_s και C_a για τις ανακτήσεις και τις τιμές υποβάθρου των μαρτύρων. Ο χειρισμός όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής γίνεται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μόλυνσης και απωλειών (π.χ. λόγω προσρόφησης της υπό δοκιμή ουσίας στη συσκευή δειγματοληψίας).
66. Θα πρέπει να καταγράφονται και να αναφέρονται η συνολική ανάκτηση και η ανάκτηση της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, το ίζημα και το νερό και, εφόσον έχουν χρησιμοποιηθεί, στις παγίδες που περιέχουν απορροφητικά υλικά για τη συγκράτηση υπό δοκιμή ουσιών οι οποίες εξατμίζονται.
67. Επειδή συνιστάται η χρήση ραδιοσημασμένων ουσιών, είναι δυνατή η ανάλυση για τη συνολική ραδιενέργεια (δηλ. μητρική ουσία και προϊόντα αποικοδόμησης). Ωστόσο, εάν είναι εφικτό από αναλυτικής απόψεως, ο ποσοτικός προσδιορισμός της μητρικής ουσίας και των προϊόντων αποικοδόμησης σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες. Εάν πρόκειται να πραγματοποιηθούν οι εν λόγω μετρήσεις, τα δείγματα θα πρέπει στη συνέχεια να υποβάλλονται σε κατάλληλες διαδικασίες εκχύλισης για τον ξεχωριστό ποσοτικό προσδιορισμό της μητρικής ουσίας. Όταν ένα προϊόν αποικοδόμησης που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ποσοστό (π.χ. >10 %) της μετρηθείσας ραδιενέργειας στους οργανισμούς δοκιμής σε σταθερή κατάσταση ή στο τέλος της φάσης πρόσληψης, συνιστάται η αναγνώριση των εν λόγω προϊόντων αποικοδόμησης (5).

68. Λόγω της χαμηλής ατομικής βιομάζας, συχνά δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας σε κάθε ξεχωριστό σκώληκα, εκτός εάν το είδος δοκιμής που χρησιμοποιείται είναι το *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg υγρό βάρος ανά σκώληκα) (11). Επομένως, η συνένωση των ατόμων που λαμβάνονται ως δείγματα από ένα συγκεκριμένο δοχείο δοκιμής είναι αποδεκτή, αλλά περιορίζει τις στατιστικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στα δεδομένα. Εάν μια συγκεκριμένη στατιστική διαδικασία και ισχύς αποτελούν σημαντικούς παράγοντες, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στη δοκιμή ο κατάλληλος αριθμός ζώων δοκιμής ή/και θαλάμων δοκιμής επανάληψης που συνάδει με την επιθυμητή συνένωση, διαδικασία και ισχύ.
69. Συνιστάται να εκφράζεται ο BAF ως συνάρτηση του συνολικού υγρού βάρους, του συνολικού ξηρού βάρους και, όταν απαιτείται (π.χ. για εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες), ως συνάρτηση του λιπιδικού περιεχομένου και της TOC του ιζήματος. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του λιπιδικού περιεχομένου (48) (49). Η τεχνική της εκχύλισης με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (50) μπορεί να χρησιμοποιείται ως πρότυπη μέθοδος (48). Ωστόσο, για να αποφευχθεί η χρήση χλωριωμένων διαλυτών, μπορεί να χρησιμοποιείται μια υποβληθείσα σε κυκλική δοκιμή τροποποίηση της μεθόδου Bligh και Dyer (50) όπως περιγράφεται στο σημείο (51). Δεδομένου ότι οι διάφορες μέθοδοι δεν αποδίδουν ταυτόσημα αποτελέσματα (48), έχει σημασία να αναφέρονται λεπτομερή στοιχεία για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Όταν είναι δυνατόν, δηλαδή εάν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός σκωλήκων, το λιπιδικό περιεχόμενο μετράται στο ίδιο δείγμα ή εκχύλισμα με εκείνο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της υπό δοκιμή ουσίας, δεδομένου ότι τα λιπίδια πρέπει συχνά να απομακρύνονται από το εκχύλισμα ώστε να είναι δυνατή η χρωματογραφική ανάλυσή του (5). Ωστόσο, είναι πρακτικό να χρησιμοποιούνται εγκλιματισμένα ζώα-μάρτυρες, τουλάχιστον στην αρχή ή -κατά προτίμηση- στο τέλος της φάσης πρόσληψης για τη μέτρηση του λιπιδικού περιεχομένου, π.χ. σε τρία δείγματα.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

70. Η καμπύλη πρόσληψης της υπό δοκιμή ουσίας λαμβάνεται με γραφική παράσταση, σε αριθμητική κλίμακα, της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης συναρτήσει του χρόνου. Εάν η καμπύλη εμφανίζει οριζοντίωση, υπολογίζεται η σταθερή κατάσταση BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{ σε σταθερή κατάσταση ή την ημέρα 28 (μέση τιμή)}}{C_s \text{ σε σταθερή κατάσταση ή την ημέρα 28 (μέση τιμή)}}$$

71. Προσδιορίζεται ο συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAFK) ως λόγος ks/ke. Η σταθερά αποβολής (ke) προσδιορίζεται συνήθως από την καμπύλη αποβολής (δηλαδή τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες κατά τη φάση αποβολής). Στη συνέχεια, υπολογίζεται η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ks από την κινητική της καμπύλης πρόσληψης. Η μέθοδος που προτιμάται για τη λήψη του BAFK και των σταθερών ταχύτητας ks και ke είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή (βλ. προσάρτημα 2). Εάν είναι προφανές ότι η αποβολή δεν είναι πρώτης τάξης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιο περίπλοκα μοντέλα (27)(52).
72. Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF) προσδιορίζεται με την κανονικοποίηση του BAFK για το λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων και την περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα του ιζήματος.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

73. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις των συγκεντρώσεων δοκιμής βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου.
74. Εάν οι καμπύλες πρόσληψης και αποβολής είναι σαφώς οριοθετημένες, αυτό αποτελεί ένδειξη δεδομένων βιοσυσσώρευσης καλής ποιότητας. Σε γενικές γραμμές, τα όρια εμπιστοσύνης για τις τιμές BAF από καλά σχεδιασμένες μελέτες δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το 25 % (5).

Έκθεση δοκιμής

75. Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

Υπό δοκιμή ουσία

- φυσική κατάσταση και φυσικοχημικές ιδιότητες, π.χ. log K_{ow}, υδατοδιαλυτότητα,
- στοιχεία ταυτότητας της χημικής ουσίας, πηγή της υπό δοκιμή ουσίας, ταυτότητα και συγκέντρωση του διαλύτη που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε,
- εάν είναι ραδιοεπισημασμένη, ακριβής θέση των σημασμένων ατόμων, ειδική ραδιενέργεια και ποσοστό της ραδιενέργειας που συνδέεται με ξένες προσμείξεις.

Είδη δοκιμής

- επιστημονική ονομασία, στέλεχος, πηγή, τυχόν προηγηθείσα αγωγή, εγκλιματισμός, ηλικία, εύρος μεγεθών κ.λπ.

Συνθήκες δοκιμής

- εφαρμοζόμενη διαδικασία δοκιμής (π.χ. στατική, ημιστατική ή συνεχούς ροής νερού),
- τύπος και χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος φωτισμού και φωτοπερίοδος(-οι),
- σχεδιασμός δοκιμής (π.χ. αριθμός, υλικό και μέγεθος θαλάμων δοκιμής, όγκος νερού, μάζα και όγκος ιζήματος, ρυθμός αντικατάστασης του όγκου νερού (για διαδικασίες συνεχούς ροής νερού ή ημιστατικές διαδικασίες), κάθε αερισμός που χρησιμοποιείται πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός των επαναλήψεων, αριθμός των σκωλήκων ανά επανάληψη, αριθμός των συγκεντρώσεων δοκιμής, διάρκεια φάσεων πρόσληψης και αποβολής, συχνότητα δειγματοληψίας),
- μέθοδος παρασκευής και εφαρμογής της υπό δοκιμή ουσίας, καθώς και αιτιολόγηση της επιλογής μιας συγκεκριμένης μεθόδου,
- ονομαστικές συγκεντρώσεις δοκιμής,
- πηγή των συστατικών του τεχνητού νερού και ιζήματος ή -εάν χρησιμοποιούνται φυσικά μέσα- προέλευση του νερού και του ιζήματος, περιγραφή τυχόν προηγηθείσας αγωγής, αποτελέσματα οποιασδήποτε αποδεικτικής διαδικασίας της ικανότητας των ζώων δοκιμής να ζουν ή/και να αναπαράγονται στο χρησιμοποιούμενο μέσο, χαρακτηριστικά ιζήματος (pH και αμμωνία του ενδοπορικού νερού (φυσικά ιζήματα), περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (TOC), κατανομή μεγέθους σωματιδίων (ποσοστό άμμου, ιλύος και αργίλου), ποσοστό υγρασίας και οποιοσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις) και χαρακτηριστικά νερού (pH, σκληρότητα, αγωγιμότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, επίπεδα υπολειμμάτων χλωρίου (εφόσον μετρώνται) και οποιοσδήποτε άλλες πραγματοποιηθείσες μετρήσεις),
- ονομαστικό και μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) του τεχνητού ιζήματος, μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) για ιζήματα υπαίθρου,
- ποιότητα νερού εντός των θαλάμων δοκιμής όπως χαρακτηρίζεται από τη θερμοκρασία, το pH, το αμμώνιο, τη συνολική σκληρότητα και τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου,
- λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κατεργασία των δειγμάτων νερού, ιζήματος και σκωλήκων, μεταξύ των οποίων λεπτομέρειες για την παρασκευή, την αποθήκευση, τις διαδικασίες εμβολιασμού, την εκχύλιση και τις αναλυτικές διαδικασίες (και ακρίβεια) για την υπό δοκιμή ουσία, καθώς και λιπιδικό περιεχόμενο και ανακτήσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Αποτελέσματα

- θνησιμότητα των σκωλήκων-μαρτύρων και των σκωλήκων σε κάθε θάλαμο δοκιμής και τυχόν παρατηρηθείσα υποθανατηφόρος επίδραση περιλαμβανομένης της μη φυσιολογικής συμπεριφοράς (π.χ. αποφυγή του ιζήματος, παρουσία ή απουσία σφαιριδίων κοπράνων, απουσία αναπαραγωγής),
- μετρηθέν ξηρό βάρος σε % του υγρού βάρους (ή αναλογία ξηρού προς υγρό βάρος) του ιζήματος και των οργανισμών δοκιμής (χρήσιμο για κανονικοποίηση),
- λιπιδικό περιεχόμενο των σκωλήκων,
- καμπύλες στις οποίες εμφανίζεται η κινητική πρόσληψης και αποβολής της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες, καθώς και χρόνος μέχρι τη σταθερή κατάσταση,
- τιμές C_a , C_s και C_w (με τυπική απόκλιση και εύρος, κατά περίπτωση) για όλους τους χρόνους δειγματοληψίας (η C_a εκφράζεται σε $g\ kg^{-1}$ υγρού και ξηρού βάρους ολόκληρου του σώματος, ενώ η C_s εκφράζεται σε $g\ kg^{-1}$ υγρού και ξηρού βάρους ιζήματος και η C_w σε $mg\ l^{-1}$). Εάν απαιτείται ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF, για τον ορισμό, βλ. προσάρτημα 1) (π.χ. για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων δύο ή περισσότερων δοκιμών που έχουν διεξαχθεί σε ζώα με διαφορετικό λιπιδικό περιεχόμενο), η C_a θα πρέπει επιπλέον να εκφράζεται σε $g\ kg^{-1}$ λιπιδικού περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε $g\ kg^{-1}$ οργανικού άνθρακα (OC) του ιζήματος,

- BAF (εκφραζόμενος σε kg υγρού ιζήματος kg^{-1} υγρού σκόληκα), σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος k_s (εκφραζόμενη σε g υγρού ιζήματος kg^{-1} υγρού σκόληκα ημέρα^{-1}) και σταθερά ταχύτητας αποβολής k_e (εκφραζόμενη σε ημέρα^{-1}). Επιπροσθέτως, μπορεί να αναφέρεται ο BSAF (εκφραζόμενος σε kg ιζήματος OC kg^{-1} λιπιδική περιεκτικότητα σκόληκα),
- μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER) στο τέλος της φάσης αποβολής,
- εφόσον μετρώνται: εκατοστιαίες αναλογίες της μητρικής ουσίας, των προϊόντων αποικοδόμησης και των δεσμευμένων υπολειμμάτων (δηλ. το ποσοστό της υπό δοκιμή ουσίας που δεν είναι δυνατόν να εκχυλιστεί με τις κοινές μεθόδους εκχύλισης) που ανιχνεύονται στα ζώα δοκιμής,
- μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τις στατιστικές αναλύσεις των δεδομένων.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

- συμμόρφωση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια εγκυρότητας που αναφέρονται στην παράγραφο 21,
- μη αναμενόμενα ή ασυνήθη αποτελέσματα, π.χ. ατελής αποβολή της υπό δοκιμή ουσίας από τα ζώα δοκιμής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να προκύψουν από τα αποτελέσματα οποιασδήποτε προκαταρκτικής μελέτης.

Προσάρτημα 1

Ορισμοί και μονάδες

Η **αποβολή** μιας υπό δοκιμή ουσίας είναι η απώλεια της ουσίας αυτής από τον ιστό του οργανισμού δοκιμής μέσω ενεργών ή παθητικών διαδικασιών που συντελούνται ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιομεγέθυνση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται κυρίως στην πρόσληψη από μολυσμένη τροφή ή λεία, σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή τη λεία. Η βιομεγέθυνση μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά ή συσσώρευση της υπό δοκιμή ουσίας στις τροφικές αλυσίδες.

Βιοσυγκέντρωση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού, η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην πρόσληψη μέσω της επιφάνειας του σώματος, σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο.

Βιοσυσσώρευση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια ενός οργανισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο. Η βιοσυσσώρευση οφείλεται σε διεργασίες βιοσυγκέντρωσης και βιομεγέθυνσης (βλ. παρακάτω).

Εμβολιασμένο ιζήμα είναι το ιζήμα στο οποίο έχει προστεθεί η υπό δοκιμή ουσία.

Ενδοπορικό νερό ή διάμεσο νερό είναι το νερό που καταλαμβάνει τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων του ιζήματος ή του εδάφους.

Η **οριζόντιωση** ή **σταθερή κατάσταση** ορίζεται ως η ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών πρόσληψης και αποβολής που συντελούνται ταυτόχρονα κατά τη φάση έκθεσης. Η σταθερή κατάσταση στη γραφική παράσταση του BAF σε κάθε περίοδο δειγματοληψίας συναρτίζεται του χρόνου επιτυγχάνεται όταν η καμπύλη καθίσταται παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου και τρεις διαδοχικές αναλύσεις του BAF σε δείγματα που έχουν ληφθεί ανά διαστήματα τουλάχιστον δύο ημερών δεν διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20 %, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιόδων δειγματοληψίας. Στην περίπτωση υπό δοκιμή ουσιών που προσλαμβάνονται με αργό ρυθμό, ενδείκνυται περισσότερο διαστήματα επτά ημερών (5).

Η **περίοδος εγκλιματισμού** χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του μικροβιακού συστατικού του ιζήματος και για την αφαίρεση π.χ. της αμμωνίας που προέρχεται από τα συστατικά του ιζήματος. Συντελείται πριν από τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Συνήθως, το υπερκείμενο νερό απορρίπτεται μετά τον εγκλιματισμό.

Η **περίοδος εξισορρόπησης** χρησιμοποιείται ώστε να παρέχεται το χρονικό περιθώριο για να κατανεμηθεί η υπό δοκιμή ουσία μεταξύ της σταθερής φάσης, του ενδοπορικού νερού και του υπερκείμενου νερού. Λαμβάνει χώρα μετά τον εμβολιασμό του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία και πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής.

Σταθερά ταχύτητας αποβολής (k_d) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από το μέσο που περιέχει την υπό δοκιμή ουσία σε μέσο που δεν περιέχει την υπό δοκιμή χημική ουσία. Η k_d εκφράζεται σε ημέρα⁻¹.

Σταθερά ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_s) είναι η αριθμητική τιμή που ορίζει την ταχύτητα αύξησης της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής, η οποία οφείλεται στην πρόσληψη από τη φάση ιζήματος. Η k_s εκφράζεται σε g ιζήματος kg⁻¹ σκωλίκων ημέρα⁻¹.

Ο **συντελεστής βιοσυσσώρευσης** (BAF) οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης αυτής της δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής (C_a σε g kg⁻¹ υγρού ή ξηρού βάρους) διαιρεμένη με τη συγκέντρωση της ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s ως g kg⁻¹ υγρού ή ξηρού βάρους του ιζήματος). Για να γίνει αναφορά στις μονάδες C_a και C_s , οι μονάδες του BAF είναι kg ιζήματος kg⁻¹ σκωλίκων (15).

Οι **συντελεστές βιοσυσσώρευσης** που υπολογίζονται απευθείας από την αναλογία της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος προς τη σταθερά ταχύτητας αποβολής και τη σταθερά ρυθμού κινητικής (k_s και k_d , αντίστοιχα -βλ. παρακάτω) χαρακτηρίζονται ως **συντελεστής κινητικής βιοσυσσώρευσης** (BAF_k).

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης σε σταθερή κατάσταση (BAF_{ss}) είναι ο BAF σε σταθερή κατάσταση και δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης χρονικής περιόδου, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στο περιβάλλον μέσο (C_s σε g kg⁻¹ υγρού ή ξηρού βάρους του ιζήματος) είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της εν λόγω χρονικής περιόδου.

Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}) είναι ο λόγος της διαλυτότητας μιας ουσίας σε n-οκτανόλη και νερό σε κατάσταση ισορροπίας, συμβολιζόμενος επίσης και ως P_{ow} . Ο λογάριθμος του K_{ow} (log K_{ow}) χρησιμοποιείται ως ένδειξη του δυναμικού βιοσυσσώρευσης μιας ουσίας από τους υδρόβιους οργανισμούς.

Συντελεστής κατανομής οργανικού άνθρακα-νερού (K_{od}) είναι ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του κλάσματος οργανικού άνθρακα ενός ιζήματος προς τη συγκέντρωση της ουσίας στο νερό σε κατάσταση ισορροπίας.

Ο **συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα** (BSAF) είναι το πηλίκο της κανονικοποιημένης ως προς τα λιπίδια συγκέντρωσης σε σταθερή κατάσταση της υπό δοκιμή ουσίας στη μάζα ή την επιφάνεια του οργανισμού δοκιμής δια της κανονικοποιημένης ως προς τον οργανικό άνθρακα συγκέντρωσης της ουσίας στο ίζημα, σε σταθερή κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, η C_a εκφράζεται σε $g\ kg^{-1}$ λιπιδίου περιεχομένου του οργανισμού και η C_s σε $g\ kg^{-1}$ περιεκτικότητας του ιζήματος σε οργανικό άνθρακα.

Τεχνητό ίζημα ή μορφοποιημένο, ανασυσταθέν ή συνθετικό ίζημα είναι ένα μείγμα υλικών που χρησιμοποιείται για να απομιμείται τα φυσικά συστατικά ενός φυσικού ιζήματος.

Υπερκείμενο νερό είναι το νερό που βρίσκεται πάνω από το ίζημα στο δοχείο δοκιμής.

Φάση αποβολής είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο μελετάται η αποβολή (ή η καθαρή απώλεια) της ουσίας από τους οργανισμούς δοκιμής, μετά τη μεταφορά των οργανισμών δοκιμής από μολυσμένο μέσο σε μέσο που δεν περιέχει την υπό δοκιμή ουσία.

Φάση πρόσληψης ή έκθεσης είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι οργανισμοί δοκιμής εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία.

Προσάρτημα 2

Υπολογισμός των παραμέτρων πρόσληψης και αποβολής

Το κύριο τελικό σημείο μιας δοκιμής βιοσυσσώρευσης είναι ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης, BAF. Ο μετρούμενος BAF μπορεί να υπολογίζεται με διαίρεση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στον οργανισμό δοκιμής, C_a , δια της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα, C_s , σε σταθερή κατάσταση. Εάν δεν επιτυγχάνεται σταθερή κατάσταση κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης, υπολογίζεται ο BAF με τον ίδιο τρόπο για την ημέρα 28. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημαίνεται αν ο BAF βασίζεται σε συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης ή όχι.

Ο προτιμώμενος τρόπος λήψης του συντελεστή κινητικής βιοσυσσώρευσης (BAF_k), της σταθεράς ταχύτητας πρόσληψης ιζήματος (k_s) και της σταθεράς ταχύτητας αποβολής (k_e) είναι η χρήση μεθόδων εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή. Δεδομένης της χρονολογικής σειράς των μέσων συντελεστών συσσώρευσης (C_a , μέσες τιμές κάθε ημερομηνίας δειγματοληψίας/ C_s , μέσες τιμές κάθε ημερομηνίας δειγματοληψίας = AF) της φάσης πρόσληψης με βάση το υγρό βάρος σκωλήκων και ιζήματος, και της εξίσωσης μοντέλου

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{εξίσωση 1}]$$

όπου $AF(t)$ είναι η αναλογία της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στους σκώληκες προς τη συγκέντρωσή της στο ίζημα οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή (t) της φάσης πρόσληψης, τα εν λόγω προγράμματα ηλεκτρονικών υπολογιστών υπολογίζουν τις τιμές για τα BAF_k , k_s και k_e .

Όταν η σταθερή κατάσταση επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της φάσης πρόσληψης (δηλ. $t = \infty$), η εξίσωση 1 μπορεί να απλοποιηθεί σε:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{εξίσωση 2}]$$

όπου

k_s = σταθερά ταχύτητας πρόσληψης στους ιστούς [g ιζήματος kg^{-1} του σκώληκα ημέρα $^{-1}$]

k_e = σταθερά ταχύτητας αποβολής [ημέρα $^{-1}$]

Στη συνέχεια, η σχέση $k_s/k_e \times C_s$ είναι μια προσέγγιση για τη συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας στον ιστό του σκώληκα σε σταθερή κατάσταση ($C_{a,ss}$).

Ο συντελεστής συσσώρευσης σε βιόκοσμο-ίζημα (BSAF) θα πρέπει να υπολογίζεται ως εξής:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

όπου f_{oc} είναι το κλάσμα του οργανικού άνθρακα του ιζήματος με βάση το ξηρό βάρος και f_{lip} το κλάσμα των λιπιδίων του σκώληκα, με βάση και για τα δύο είτε το ξηρό είτε το υγρό βάρος.

Δεδομένης μιας χρονικής σειράς των τιμών συγκέντρωσης, η κινητική αποβολής μπορεί να μοντελοποιείται με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων μοντέλου και μιας μεθόδου εκτίμησης μη γραμμικών παραμέτρων σε υπολογιστή.

Τα μέσα μετρηθέντα σωματικά υπολείμματα στο τέλος της φάσης πρόσληψης συνιστώνται ως προεπιλεγμένο σημείο έναρξης. Η χρήση της τιμής που μοντελοποιείται/εκτιμάται από τη φάση πρόσληψης θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο π.χ. εάν η μετρηθείσα τιμή παρεκκλίνει σημαντικά από το μοντελοποιημένο σωματικό υπόλειμμα. Βλ. επίσης παράγραφο 50 για εναλλακτική προέκθεση σκωλήκων που προορίζονται για αποβολή. Με αυτήν την προσέγγιση, τα δείγματα των σκωλήκων που έχουν υποβληθεί σε προέκθεση την ημέρα 0 της φάσης αποβολής θεωρείται ότι παρέχουν ρεαλιστικό σωματικό υπόλειμμα για την εκκίνηση της κινητικής αποβολής.

Εάν η γραφική παράσταση των σημείων δεδομένων συναρτήσει του χρόνου δηλώνει σταθερή εκθετική μείωση της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας στα ζώα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μονοδιαμερισματικό μοντέλο (εξίσωση 4) για την περιγραφή της χρονικής εξέλιξης της αποβολής.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{εξίσωση 3}]$$

Μερικές φορές, οι διεργασίες αποβολής φαίνεται να είναι διφασικές, εμφανίζοντας ταχεία μείωση της C_a κατά τα πρώτα στάδια, και να μεταλλάσσονται σε βραδύτερη απώλεια των υπό δοκιμή ουσιών κατά τα επόμενα στάδια της αποβολής (8) (19)(25). Οι δύο φάσεις μπορούν να ερμηνευθούν με την παραδοχή ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά διαμερίσματα στον οργανισμό, από τα οποία η υπό δοκιμή ουσία απομακρύνεται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να μελετάται η ειδική βιβλιογραφία (15)(16)(17)(25).

Η αποβολή δύο διαμερισμάτων περιγράφεται π.χ. από την ακόλουθη εξίσωση (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{εξίσωση 4}]$$

Τα A και B αντιπροσωπεύουν το μέγεθος των διαμερισμάτων (σε ποσοστό συνολικού υπολείμματος ιστού), όπου A είναι το διαμέρισμα με ταχεία απομάκρυνση της ουσίας και B το διαμέρισμα με αργή απομάκρυνση της υπό δοκιμή ουσίας. Το άθροισμα των A και B ισούται με το 100 % του όγκου διαμερίσματος ολόκληρου του ζώου σε σταθερή κατάσταση. Τα k_a και k_b αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες σταθερές αποβολής [ημέρα⁻¹]. Εάν το μοντέλο δύο διαμερισμάτων προσαρμόζεται στα δεδομένα αποβολής, η σταθερά ταχύτητας πρόσληψης k_s μπορεί να προσδιορίζεται ως εξής (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times \text{BAF}}{A + B} \quad [\text{εξίσωση 5}]$$

Παρόλα αυτά, οι ανωτέρω εξισώσεις μοντέλου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με επιφύλαξη, ιδίως όταν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δοκιμής η βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας (42).

Εναλλακτικά των εξισώσεων μοντέλου που περιγράφονται ανωτέρω, η κινητική (k_s και k_e) μπορεί επίσης να υπολογίζεται με μία μόνο διαδικασία μέτρησης, μέσω της εφαρμογής του μοντέλου κινητικής πρώτης τάξης σε όλα τα δεδομένα που προκύπτουν τόσο από τη φάση πρόσληψης, όσο και από τη φάση αποβολής. Για την περιγραφή μιας μεθόδου που επιτρέπει ενδεχομένως έναν τέτοιο συνδυασμένο υπολογισμό των σταθερών ταχύτητας πρόσληψης και αποβολής, βλ. παραπομπές (55), (56) και (57).

Τα μη αποβληθέντα υπολείμματα (NER) θα πρέπει να υπολογίζονται ως δευτερεύον τελικό σημείο, με πολλαπλασιασμό της αναλογίας της μέσης συγκέντρωσης των σκωλήκων (C_s) την ημέρα 10 της φάσης αποβολής και της μέσης συγκέντρωσης των σκωλήκων (C_a) σε σταθερή κατάσταση (ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης) με το 100:

$$\text{NER}_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination (average)} \times 100}{C_a \text{ at steady state (average)}}$$

Προσάρτημα 3

Παράδειγμα προγράμματος δειγματοληψίας για δοκιμή βιοσυσσώρευσης 28 ημερών

α) Φάση πρόσληψης (συμπεριλαμβανομένης φάσης εξισορρόπησης 4 ημερών)

| Ημέρα | Δραστηριότητες |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - 6 | Παρασκευή εναιωρήματος τύρφης για το ίζημα, εγκλιματισμός του εναιωρήματος για 48 ώρες, |
| - 4 | Εμβολιασμός του ιζήματος ή του κλάσματος ιζήματος, ανάμειξη όλων των συστατικών του ιζήματος, λήψη δειγμάτων ιζήματος από το ίζημα αγωγής και το ίζημα-μάρτυρα με διαλύτη για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, προσθήκη υπερκείμενου νερού, επώαση σε συνθήκες δοκιμής (φάση εξισορρόπησης), |
| - 3/-2 | Διαχωρισμός των οργανισμών δοκιμής από την καλλιέργεια για εγκλιματισμό, |
| 0 | Μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για τη λήψη δειγμάτων νερού και ιζήματος για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, τυχαία κατανομή των σκωλήκων στους θαλάμους δοκιμής, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, έλεγχος της παροχής αέρα εάν χρησιμοποιείται κλειστό σύστημα δοκιμών, |
| 1 | Απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για δειγματοληψία, έλεγχος παροχής αέρα, συμπεριφοράς σκωλήκων, ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 56), λήψη δειγματος νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, |
| 2 | Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, |
| 3 | Ομοίως με την 1η ημέρα, |
| 4-6 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 7 | Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται, |
| 8-13 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 14 | Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται, |
| 15-20 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 21 | Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται, |
| 22-27 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 28 | Ομοίως με την 1η ημέρα, μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), τέλος της φάσης πρόσληψης, κράτηση επαρκών επιμέρους δειγμάτων σκωλήκων για προσδιορισμό των αναλυτικών τιμών υποβάθρου, του υγρού και ξηρού βάρους και του λιπιδικού περιεχομένου, μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα δοχεία επανάληψης σε δοχεία που περιέχουν καθαρό ίζημα για τη φάση αποβολής (χωρίς κένωση εντέρου), δειγματοληψία νερού, ιζήματος και σκωλήκων από τους μάρτυρες με διαλύτη, δειγματοληψία διαλυμάτων παγίδευσης εάν υπάρχουν. |
| | Οι δραστηριότητες πριν από την έκθεση (φάση εξισορρόπησης) θα πρέπει να προγραμματίζονται με γνώμονα τις ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Εάν απαιτείται, το παρασκευασμένο ίζημα υποβάλλεται σε εγκλιματισμό κάτω από υπερκείμενο νερό στους 20 ± 2 °C για 7 ημέρες. Σε αυτήν την περίπτωση, το ίζημα παρασκευάζεται νωρίτερα! |
| | Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για τη 2η ημέρα θα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες). |

β) Φάση αποβολής

| Ημέρα | Δραστηριότητες |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - 6 | Παρασκευή εναιωρήματος τύρφης για το ίζημα, εγκλιματισμός του εναιωρήματος για 48 ώρες, |
| - 4 | Ανάμειξη όλων των συστατικών του ιζήματος, λήψη δειγμάτων ιζήματος από το ίζημα αγωγής και το ίζημα-μάρτυρα με διαλύτη για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, προσθήκη υπερκείμενου νερού, επώαση σε συνθήκες δοκιμής, |
| 0 (ημέρα 28 της φάσης πρόσληψης) | Μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), μεταφορά των σκωλήκων από τα υπόλοιπα εκτεθέντα δοχεία επανάληψης σε δοχεία που περιέχουν καθαρό ίζημα, μετά από 4-6 ώρες απομάκρυνση των δοχείων επανάληψης για τη λήψη δειγμάτων νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, τυχαία κατανομή των σκωλήκων στους θαλάμους δοκιμής, |
| 1 | Απομάκρυνση δοχείων επανάληψης για δειγματοληψία, έλεγχος παροχής αέρα, συμπεριφοράς σκωλήκων, ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), λήψη δείγματος νερού, ιζήματος και σκωλήκων για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας, |
| 2 | Έλεγχος της παροχής αέρα, της συμπεριφοράς των σκωλήκων και της θερμοκρασίας, |
| 3 | Ομοίως με την 1η ημέρα, |
| 4 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 5 | Ομοίως με την 1η ημέρα, |
| 6 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 7 | Ομοίως με την 1η ημέρα, αναπλήρωση του εξατμισθέντος νερού, εάν απαιτείται, |
| 8-9 | Ομοίως με τη 2η ημέρα, |
| 10 | Ομοίως με την 1η ημέρα, τέλος της φάσης αποβολής, μέτρηση της ποιότητας νερού (βλ. παράγραφο 52), δειγματοληψία νερού, ιζήματος και σκωλήκων από τους μάρτυρες με διαλύτη, δειγματοληψία διαλυμάτων παγίδευσης εάν υπάρχουν. |
| | Η προετοιμασία του ιζήματος πριν από την έναρξη της φάσης αποβολής θα πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως πριν από τη φάση πρόσληψης. |
| | Οι δραστηριότητες που περιγράφονται για τη 2η ημέρα θα πρέπει να διεξάγονται καθημερινά (τουλάχιστον κατά τις εργάσιμες ημέρες). |

Προσάρτημα 4

Ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενόσω αποδεκτού νερού αραίωσης

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ |
|---------------------------------------------------------------------|---------------|
| Σωματίδια | < 20 mg/l |
| Ολικός οργανικός άνθρακας | < 2μg/l |
| Μη ιονισμένη αμμωνία | < 1 μg/l |
| Υπολείμματα χλωρίου | < 10 μg/l |
| Σύνολο οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων | < 50 ng/l |
| Ολικά οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα μαζί με πολυχλωριωμένα διφαινύλια | < 50 ng/l |
| Ολικό οργανικό χλώριο | < 25 ng/l |

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΟΥ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝΤΟΣ ΝΕΡΟΥ

(α) Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου

Διαλύονται 11,76 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(β) Διάλυμα θειικού μαγνησίου

Διαλύονται 4,93 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(γ) Διάλυμα διττανθρακικού νατρίου

Διαλύονται 2,59 g NaHCO_3 σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

(δ) Διάλυμα χλωριούχου καλίου

Διαλύονται 0,23 g KCl σε απιονισμένο νερό, συμπληρώνονται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό

Όλες οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας.

Η αγωγιμότητα του απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Αναμιγνύονται 25 ml κάθε διαλύματος (α) έως (δ) και ο συνολικός όγκος συμπληρώνεται έως 1 λίτρο με απιονισμένο νερό. Το άθροισμα των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου σε αυτά τα διαλύματα είναι 2,5 mmol/l.

Η αναλογία των ιόντων Ca:Mg είναι 4:1 και των ιόντων Na:K είναι 10:1. Η ικανότητα οξέος $\text{K}_{\text{S}_{4,3}}$ αυτού του διαλύματος είναι 0,8 mmol/l.

Το νερό αραίωσης αερίζεται μέχρι την επίτευξη κορεσμού οξυγόνου και, στη συνέχεια, αποθηκεύεται για περίπου δύο ημέρες χωρίς περαιτέρω αερισμό πριν από τη χρήση.

Το pH ενός αποδεκτού νερού αραίωσης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9.

Προσάρτημα 5

Τεχνητό ιζήμα — συστάσεις Παρασκευής και αποθήκευσης

Σε αντίθεση με τις απαιτήσεις της μεθόδου δοκιμών Γ.8 (40), συνιστάται περιεκτικότητα σε τύρφη του τεχνητού ιζήματος ίση με 2 % αντί για 10 % του ξηρού βάρους, προκειμένου να ανταποκρίνεται στη χαμηλή έως μέτρια περιεκτικότητα σε οργανική ύλη των φυσικών ιζημάτων (58).

Ποσοστό ξηρών συστατικών του τεχνητού ιζήματος:

| Συστατικό | Χαρακτηριστικά | % ξηρού ιζήματος |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Τύρφη | Τύρφη σφάγγων, βαθμός αποικοδόμησης: “μέτρια”, αερόξηρη, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών, λεπτοαλεσμένη (μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm) | 2 \pm 0,5 |
| Χαλαζιακή άμμος | Μέγεθος κόκκων: ≤ 2 mm, αλλά > 50 % των σωματιδίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-200 μ m | 76 |
| Καολινιτική άργιλος | Περιεκτικότητα σε καολινίτη ≥ 30 % | 22 \pm 1 |
| Πηγή τροφής | <i>Folia urticae</i> , φύλλα <i>Urtica</i> sp. (τσουκνίδα) σε σκόνη, λεπτοαλεσμένα (μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm) ή μείγμα φύλλων <i>Urtica</i> sp. σε σκόνη με άλφα-κυτταρίνη (1: 1), σύμφωνα με φαρμακευτικά πρότυπα, για ανθρώπινη κατανάλωση, επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 0,4-0,5 % |
| Ανθρακικό ασβέστιο | CaCO ₃ , κονιοποιημένο, χημικά καθαρό, επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 0,05-1 |
| Απιονισμένο νερό | Αγωγιμότητα ≤ 10 μ S/cm, επιπλέον του ξηρού ιζήματος | 30-50 |

Εάν αναμένεται αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας, π.χ. εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι γνωστό ότι αναστέλλει τη νιτροποίηση, μπορεί να είναι χρήσιμο να αντικατασταθεί το 50 % της πλούσιας σε άζωτο σκόνης *Urtica* με κυτταρίνη (π.χ. σκόνη ακυτταρίνης, χημικά καθαρή, μέγεθος σωματιδίων $\leq 0,5$ mm).

Παρασκευή

Η τύρφη ξηραίνεται σε αέρα και αλέθεται σε λεπτή σκόνη (μέγεθος κόκκων $\leq 0,5$ mm, χωρίς ορατά υπολείμματα φυτών). Παρασκευάζεται εναιώρημα της απαιτούμενης ποσότητας σκόνης τύρφης με χρήση μιας ποσότητας του απιονισμένου νερού που θα προστεθεί στο ξηρό ιζήμα (όγκος νερού 11,5 x ξηρό βάρος τύρφης έχει αποδειχθεί χρήσιμος για την παρασκευή ενός αναδεύσιμου πολτού τύρφης (8)) με τη βοήθεια ομοιογενοποιητή υψηλής απόδοσης.

Το pH του εν λόγω εναιωρήματος ρυθμίζεται στο 5,5 \pm 0,5 με CaCO₃. Το εναιώρημα εγκλιματίζεται για τουλάχιστον δύο ημέρες με ήπια ανάδευση στους 20 \pm 2 °C, για τη σταθεροποίηση του pH και τη δημιουργία σταθερού μικροβιακού συστατικού. Το pH μετράται πάλι και ρυθμίζεται σε 6,0 \pm 0,5 με CaCO₃, εάν είναι απαραίτητο. Στη συνέχεια, ολόκληρο το εναιώρημα αναμειγνύεται με τα άλλα ξηρά συστατικά, λαμβανομένης υπόψη τυχόν ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό. Προστίθεται το υπόλοιπο απιονισμένο νερό για την επίτευξη ομοιογενούς ιζήματος. Το pH μετράται πάλι και ρυθμίζεται σε 6,5 έως 7,5 με CaCO₃, εάν είναι απαραίτητο. Ωστόσο, εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, μπορεί να είναι χρήσιμο να διατηρηθεί το pH του ιζήματος κάτω από 7,0 (π.χ. μεταξύ 6,0 και 6,5). Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα. Εάν αναμένεται παραγωγή αμμωνίας, το τεχνητό ιζήμα μπορεί να εγκλιματιστεί για επτά ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή (π.χ. αναλογία ιζήματος-νερού 1: 4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής) πριν από τον εμβολιασμό με την υπό δοκιμή ουσία, δηλ. θα πρέπει να συμπληρωθεί με νερό, το οποίο θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε αερισμό. Στο τέλος αυτής της περιόδου εγκλιματισμού, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε ολικό οργανικό άνθρακα (π.χ. 3 δείγματα).

Στη συνέχεια, η εμβολιασμένη χαλαζιακή άμμος αναμειγνύεται με το ιζήμα για κάθε επίπεδο αγωγής, το ιζήμα κατανέμεται στα δοχεία δοκιμής επανάληψης και συμπληρώνεται με νερό δοκιμής (π.χ. αναλογία ιζήματος-νερού 1: 4, ύψος στρώματος ιζήματος όπως και στα δοχεία δοκιμής). Στη συνέχεια, τα δοχεία επωάζονται υπό τις ίδιες συνθήκες με εκείνες που θα επικρατούν στην επακόλουθη δοκιμή. Στο σημείο αυτό ξεκινάει η περίοδος εξισορρόπησης. Το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αερίζεται.

Η επιλεγμένη πηγή τροφής θα πρέπει να προστίθεται πριν ή κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του ιζήματος με την υπό δοκιμή ουσία. Μπορεί να αναμειχθεί αρχικά με το εναιώρημα τύρφης (βλ. ανωτέρω). Ωστόσο, είναι δυνατό να αποφεύγεται η υπερβολική αποικοδόμηση της πηγής τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής -π.χ. στην περίπτωση μεγάλης χρονικής περιόδου εξισορρόπησης- με διατήρηση της χρονικής περιόδου μεταξύ της προσθήκης τροφής και της έναρξης της έκθεσης όσο το δυνατό πιο σύντομης. Για να διασφαλίζεται επαρκής επαφή της τροφής με την υπό δοκιμή ουσία, η πηγή τροφής θα πρέπει να αναμειγνύεται με το ίζημα το αργότερο μέχρι την ημέρα εμβολιασμού της υπό δοκιμή ουσίας στο ίζημα. Εξαιρέσεις επιτρέπονται όταν η διάρκεια της περιόδου εξισορρόπησης οδηγεί σε υπερβολική μικροβιακή αποικοδόμηση της τροφής πριν από την προσθήκη των οργανισμών δοκιμής. Λαμβάνονται δείγματα του ιζήματος για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της περιεκτικότητας σε ολικό οργανικό άνθρακα (π.χ. 3 δείγματα εμβολιασμένου ιζήματος ή ιζήματος-μάρτυρα).

Το ξηρό βάρος των συστατικών (τύρφη, άμμος, καολίνη) θα πρέπει να αναφέρεται σε g και σε % επί του συνολικού ξηρού βάρους.

Θα πρέπει επίσης να αναφέρεται ο όγκος του νερού που θα προστεθεί στα ξηρά συστατικά κατά την προετοιμασία του ιζήματος σε % επί του συνολικού ξηρού βάρους (π.χ. 100 % ξηρού βάρους + 46 % νερό σημαίνει ότι στα 1 000 g ξηρού βάρους προστίθενται συνολικά 460 ml νερό, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα 1 460 g υγρού ιζήματος).

Αποθήκευση

Τα ξηρά συστατικά του τεχνητού ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται σε ξηρό και δροσερό χώρο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το παρασκευασμένο, υγρό ίζημα μπορεί να φυλάσσεται (για μετέπειτα χρήση στην καλλιέργεια μόνο) στους 4 ± 2 °C στο σκοτάδι για χρονική περίοδο 2 έως 4 εβδομάδων από την ημέρα της παρασκευής (8).

Το ίζημα που έχει εμβολιαστεί με την υπό δοκιμή ουσία θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, εκτός εάν υπάρχουν πληροφορίες σύμφωνα με τις οποίες το συγκεκριμένο ίζημα μπορεί να αποθηκεύεται χωρίς να επηρεάζονται η τοξικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα δείγματα του εμβολιασμένου ιζήματος μπορούν να φυλάσσονται στις συνθήκες που συνιστώνται για τη συγκεκριμένη υπό δοκιμή ουσία, μέχρι την ανάλυση.

Προσάρτημα 6

Είδη ολιγοδιαίων που συνιστώνται για τη δοκιμή βιοσυσσώρευσης

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Το είδος *Tubifex tubifex* των ολιγοχαϊτών (Tubificidae, Oligochaeta) (Müller) ζει σε ιζήματα γλυκών νερών σε σωλήνες που φέρουν επένδυση από βλέννα. Σε αυτούς τους σωλήνες, οι σκώλικες διαβιούν με το κεφάλι προς τα κάτω, καταναλώνοντας σωματίδια ιζήματος μέσω των σχετιζόμενων μικροοργανισμών και οργανικών υπολειμμάτων. Το οπίσθιο τμήμα συνηθώς κυματίζει στο υπερκείμενο νερό για σκοπούς αναπνοής. Παρότι το *Tubifex tubifex* απαντάται σε ένα ευρύ φάσμα τύπων ιζήματος σε ολόκληρο το βόρειο ημισφαίριο, το είδος αυτό προτιμά κόκκους σχετικά λεπτού μεγέθους (59). Η καταλληλότητα αυτού του είδους για οικοτοξικολογικές δοκιμές περιγράφεται, για παράδειγμα, στα σημεία (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Προκειμένου ο αριθμός των σκωλικών *Tubifex tubifex* να επαρκεί για τη διεξαγωγή δοκιμών βιοσυσσώρευσης, οι σκώλικες πρέπει να διατηρούνται σε μόνιμη εργαστηριακή καλλιέργεια. Για την καλλιέργεια του *T. tubifex* συνιστάται ένα σύστημα αποτελούμενο από τεχνητό ιζήμα που βασίζεται σε τεχνητό έδαφος σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.8 (40) και ανασυσταθέν νερό σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμών Γ.1 (8).

Ως δοχεία καλλιέργειας μπορούν να χρησιμοποιούνται γυάλινοι περιέκτες ή περιέκτες από ανοξείδωτο χάλυβα ύψους 12 έως 20 cm. Κάθε περιέκτης καλλιέργειας πληρώνεται με ένα στρώμα υγρού τεχνητού ιζήματος που παρασκευάζεται όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 5. Το βάθος του στρώματος ιζήματος θα πρέπει να επιτρέπει τη φυσική συμπεριφορά όσον αφορά το φώλιασμα των σκωλικών (ελάχιστο βάθος 2 cm για το *T. tubifex*). Προστίθεται ανασυσταθέν νερό στο σύστημα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την ελαχιστοποίηση της διαταραχής του ιζήματος. Η υδάτινη μάζα υποβάλλεται σε ήπιο αερισμό (π.χ. 2 φυσαλίδες το δευτερόλεπτο με αέρα μέσω φίλτρου 0,45 μm) μέσω σιφωνίου Pasteur, το οποίο τοποθετείται 2 cm πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος. Η συνιστώμενη θερμοκρασία της καλλιέργειας είναι 20 ± 2 °C.

Οι σκώλικες προστίθενται στο σύστημα καλλιέργειας με μέγιστο ρυθμό πλήρωσης 20 000 ατόμων/m² επιφάνειας ιζήματος. Υψηλότερος ρυθμός πλήρωσης ενδέχεται να προκαλέσει μείωση των ρυθμών ανάπτυξης και αναπαραγωγής (43).

Σε καλλιέργειες τεχνητού ιζήματος, πρέπει να παρέχεται τροφή στους σκώλικες. Μια διατροφή αποτελούμενη από λεπτοαλεσμένη τροφή για ψάρια, π.χ. TetraMin®, μπορεί να χρησιμεύσει ως επιπλέον θρεπτική πηγή (8), Klerks 1994, προσωπική επικοινωνία. Οι ρυθμοί σίτισης θα πρέπει να επιτρέπουν την επαρκή ανάπτυξη και αναπαραγωγή, καθώς και να διατηρούν τη συσσώρευση αμμωνίας και την ανάπτυξη μυκήτων στην καλλιέργεια σε ελάχιστα επίπεδα. Η τροφή μπορεί να χορηγείται δύο φορές την εβδομάδα (π.χ. 0,6-0,8 mg ανά cm² της επιφάνειας ιζήματος). Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι η χορήγηση τροφής εναιωρημένης και ομογενοποιημένης σε απιονισμένο νερό ενδέχεται να διευκολύνει την ομοιόμορφη κατανομή της τροφής στην επιφάνεια του ιζήματος στους περιέκτες καλλιέργειας.

Για την αποφυγή συσσώρευσης αμμωνίας, το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να αλλάζεται με χρήση συστήματος συνεχούς ροής νερού, ή χειροκίνητα τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Το ιζήμα θα πρέπει να αλλάζεται κάθε τρεις μήνες στις καλλιέργειες παρακαταθήκης.

Η δειγματοληψία των σκωλικών από την καλλιέργεια μπορεί να γίνεται με κοσκίνισμα του ιζήματος της καλλιέργειας μέσω κόσκινου 1 mm εάν απαιτούνται μόνο ενήλικα άτομα. Για τη διατήρηση των κουκουλιών είναι κατάλληλο ένα πλέγμα των 0,5 mm και για τη διατήρηση των νεαρών σκωλικών ένα κόσκινο των 0,25 mm. Τα κόσκινα μπορούν να τοποθετούνται σε ανασυσταθέν νερό μετά τη διέλευση του ιζήματος. Οι σκώλικες απομακρύνονται από το πλέγμα και στη συνέχεια συλλέγονται από το νερό με τη χρήση μαλακής χαλύβδινης λαβίδας ή ενός σιφωνίου του οποίου τα άκρα έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα.

Μόνο άδικτα και σαφώς ταυτοποιημένα δείγματα *Tubifex tubifex* (π.χ. (64)) χρησιμοποιούνται για την έναρξη μιας δοκιμής ή νέων καλλιεργιών. Οι άρρωστοι ή τραυματισμένοι σκώλικες, καθώς και τα κουκούλια που έχουν προσβληθεί από υφές νηματοειδών μυκήτων πρέπει να απορρίπτονται.

Μια συγχρονισμένη καλλιέργεια μπορεί να παράσχει σκώλικες μιας συγκεκριμένης ηλικίας σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, όταν απαιτείται. Νέα δοχεία καλλιέργειας ετοιμάζονται στα επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε δύο εβδομάδες), ξεκινώντας με ζώα καθορισμένης ηλικίας (π.χ. κουκούλια). Στις συνθήκες καλλιέργειας που περιγράφονται στο παρόν, οι σκώλικες είναι ενήλικες μετά από 8-10 εβδομάδες. Οι καλλιέργειες μπορούν να συλλέγονται όταν οι σκώλικες έχουν γεννήσει νέα κουκούλια, π.χ. μετά από δέκα εβδομάδες. Τα δείγματα των ενήλικων ατόμων μπορούν να χρησιμοποιούνται για δοκιμές και τα κουκούλια μπορούν να χρησιμοποιούνται για την έναρξη νέων καλλιεργιών.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Το είδος *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) επίσης ζει σε ιζήματα γλυκών νερών σε ολόκληρο τον κόσμο και χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοτοξικολογικές δοκιμές. Πληροφορίες για τη βιολογία, τις συνθήκες καλλιέργειας και την ευαισθησία του είδους μπορούν να λαμβάνονται από τα σημεία (1)(6)(9)(36). Το είδος *Lumbriculus variegatus* μπορεί επίσης να καλλιεργηθεί στο τεχνητό ίζημα που συνιστάται για το *T. tubifex*, σύμφωνα με το σημείο (8) με κάποιους περιορισμούς. Επειδή στη φύση το *L. variegatus* προτιμά πιο χονδρόκοκκα ιζήματα σε σχέση με το *T. tubifex* (59), οι εργαστηριακές καλλιέργειες με το τεχνητό ίζημα που χρησιμοποιείται για το *T. tubifex* μπορεί να διακοπουν μετά από 4 έως 6 μήνες. Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι το *L. variegatus* μπορεί να διατηρείται σε αμμώδες υπόστρωμα (π.χ. χαλαζιακή άμμος, λεπτό χαλίκι) σε σύστημα συνεχούς ροής νερού με χρήση τροφής για ψάρια ως θρεπτικής πηγής για αρκετά χρόνια χωρίς ανανέωση του υποστρώματος. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του *L. variegatus* σε σχέση με άλλα είδη υδρόβιων ολιγοχαιτών είναι η ταχεία αναπαραγωγή, που έχει ως αποτέλεσμα ταχέως αυξανόμενη βιομάζα σε πληθυσμούς εργαστηριακής καλλιέργειας (1)(6)(9)(10).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι συνθήκες καλλιέργειας για το *Lumbriculus variegatus* περιγράφονται λεπτομερώς στα έγγραφα Phipps κ.α. (1993) (10), Brunson κ.α. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Μια σύντομη σύνοψη αυτών των συνθηκών παρέχεται παρακάτω.

Οι σκώληκες μπορούν να καλλιεργούνται σε μεγάλα ενυδρεία (57-80 l) στους 23 °C με φωτοπερίοδο 16Φ:8Σ (100-1 000 lux) με τη χρήση φυσικού νερού που ανανεώνεται ημερησίως (45-50 l ανά ενυδρείο). Το υπόστρωμα παρασκευάζεται με κοπή αλεύκαστων καφέ χαρτιών σε λωρίδες, οι οποίες στη συνέχεια αναμειγνύονται με νερό καλλιέργειας για λίγα δευτερόλεπτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποστρώματος αποτελούμενου από μικρά κομμάτια χαρτιού. Το υπόστρωμα αυτό μπορεί κατόπιν να χρησιμοποιηθεί άμεσα στα ενυδρεία της καλλιέργειας *Lumbriculus*, καλύπτοντας το κάτω μέρος της δεξαμενής ή μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο σε απιονισμένο νερό για μετέπειτα χρήση. Το νέο υπόστρωμα στη δεξαμενή γενικά διαρκεί για περίπου δύο μήνες.

Κάθε καλλιέργεια σκωλήκων ξεκινάει με 500-1 000 σκώληκες, ενώ ως τροφή παρέχονται 10 ml εναιωρήματος που περιέχουν 6 g αρχικής τροφής για πέστροφες, 3 φορές την εβδομάδα κάτω από συνθήκες ανανέωσης νερού ή συνεχούς ροής νερού. Ο ρυθμός σίτισης στις στατικές ή ημιστατικές καλλιέργειες θα πρέπει να είναι χαμηλότερος για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων. Η τροφή και το χάρτινο υπόστρωμα θα πρέπει να αναλύονται για την ανίχνευση ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν στις δοκιμές βιοσυσσώρευσης.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αριθμός των ατόμων στην καλλιέργεια γενικά διπλασιάζεται σε περίπου 10 έως 14 ημέρες.

Το *Lumbriculus variegatus* μπορεί να απομακρύνεται από τις καλλιέργειες, π.χ. με μεταφορά σε ένα ξεχωριστό ποτήρι ζέσεως υποστρώματος μέσω ενός διχτυού λεπτού πλέγματος ή οργανισμών μέσω γυάλινου σιφωνίου με ευρύ στόμιο (διάμετρος περίπου 5 mm) που έχει υποστεί γυάλισμα με φλόγα. Εάν οι σκώληκες μεταφερθούν στο ποτήρι ζέσεως μαζί με υπόστρωμα, το ποτήρι ζέσεως που περιέχει σκώληκες και υπόστρωμα παραμένει όλη τη νύχτα κάτω από συνθήκες συνεχούς ροής νερού, διαδικασία με την οποία απομακρύνεται το υπόστρωμα από το ποτήρι ζέσεως ενώ οι σκώληκες παραμένουν στο κάτω μέρος του δοχείου. Στη συνέχεια, μπορούν να τοποθετηθούν σε πρόσφατως παρασκευασμένες δεξαμενές καλλιέργειας ή να υποστούν περαιτέρω κατεργασία για τη δοκιμή, όπως περιγράφεται στα σημεία (1) και (6). Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφωνίων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή βελονών από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό των σκωλήκων.

Ένα ζήτημα που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά τη χρήση του *L. variegatus* σε δοκιμές βιοσυσσώρευσης ιζήματος είναι ο τρόπος αναπαραγωγής του (αρχιτομία ακολουθούμενη από μορφάλλαξη). Αυτός ο ασεξουαλικός τρόπος αναπαραγωγής έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο τμημάτων, τα οποία δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο μέχρι την αναγέννηση του μέρους του κεφαλιού ή της ουράς (π.χ. (36)(37)). Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση του *L. variegatus* η πρόσληψη ιζήματος και προσμείξεων μέσω κατάποσης ενδέχεται να μην πραγματοποιείται σε συνεχή βάση όπως συμβαίνει με τα είδη της οικογένειας Tubificidae, τα οποία δεν αναπαράγονται με κατάτμηση.

Επομένως, θα πρέπει να πραγματοποιείται συγχρονισμός για την ελαχιστοποίηση της μη ελεγχόμενης αναπαραγωγής και αναγέννησης και, κατ' επέκταση, της υψηλής μεταβλητότητας στα αποτελέσματα δοκιμής. Η εν λόγω μεταβλητότητα μπορεί να προκύψει, όταν ορισμένα άτομα, τα οποία έχουν υποστεί κατάτμηση και επομένως δεν τρέφονται για ορισμένη χρονική περίοδο, είναι λιγότερο εκτεθειμένα στην υπό δοκιμή ουσία σε σχέση με άλλα άτομα, τα οποία δεν υφίστανται κατάτμηση κατά τη διάρκεια της δοκιμής, π.χ. (38). Οι σκώληκες θα πρέπει να υφίστανται τεχνητή κατάτμηση 10 έως 14 ημέρες πριν από την έναρξη της έκθεσης (συγχρονισμός) (65). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μεγάλοι σκώληκες, οι οποίοι κατά προτίμηση δεν εμφανίζουν σημάδια πρόσφατης κατάτμησης. Αυτοί οι σκώληκες μπορούν να τοποθετούνται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες σε μια σταγόνα νερού καλλιέργειας και να διατέμνονται στην περιοχή του μέσου σώματος με ένα νυστέρι. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε τα οπίσθια άκρα να είναι παρόμοιου μεγέθους. Στη συνέχεια, τα οπίσθια άκρα θα πρέπει να παραμένουν για να αναγεννηθούν νέα κεφάλια μέσα σε ένα δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το ίδιο υπόστρωμα με αυτό που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια και ανασυσταθέν νερό μέχρι την έναρξη της έκθεσης. Η

αναγέννηση νέων κεφαλιών υποδεικνύεται από το φώλιασμα των συγχρονισμένων σκωλήκων μέσα στο υπόστρωμα (η παρουσία αναγεννημένων κεφαλιών μπορεί να επιβεβαιώνεται με επιθεώρηση ενός αντιπροσωπευτικού επιμέρους δείγματος με διοφθάλμιο μικροσκόπιο). Μετά τη διαδικασία αυτή, οι οργανισμοί δοκιμής αναμένεται ότι βρίσκονται σε παρόμοια φυσιολογική κατάσταση. Αυτό σημαίνει ότι όταν προκύψει αναγέννηση μέσω μορφάλλαξης σε συγχρονισμένους σκώληκες κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αναμένεται ότι σχεδόν όλα τα ζώα θα είναι εκτεθειμένα εξίσου στο εμβολιασμένο ίζημα. Η σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων θα πρέπει να πραγματοποιείται μία φορά μόλις οι σκώληκες αρχίσουν να φωλιάζουν στο υπόστρωμα ή 7 ημέρες μετά τη διατομή τους. Το καθηστώδες σίτισης θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό των κανονικών καλλιέργειών, ωστόσο ίσως θα ήταν σκόπιμο να γίνεται σίτιση των συγχρονισμένων σκωλήκων με την ίδια πηγή τροφής με αυτήν που θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμή. Οι σκώληκες θα πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία δοκιμής, στους 20 ± 2 °C. Μετά την αναγέννηση, για τη δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άδικοι ολόκληροι σκώληκες παρόμοιου μεγέθους, που κολυμπούν ή σέρνονται ενεργά μετά από ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι τραυματισμοί ή η αυτοτομία των σκωλήκων, π.χ. με τη χρήση σιφώνιων με άκρα που έχουν υποστεί γυάλισμα με φλόγα ή βελονών από ανοξείδωτο χάλυβα για τον χειρισμό των σκωλήκων.

Όταν χρησιμοποιείται το είδος *Lumbriculus variegatus* στη δοκιμή, λόγω του ειδικού τρόπου αναπαραγωγής του, αναμένεται αύξηση στον αριθμό των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εάν οι συνθήκες είναι κατάλληλες (6). Η απουσία αναπαραγωγής σε δοκιμή βιοσυσσώρευσης με το *L. variegatus* θα πρέπει να καταγράφεται και να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (δεν έχει επιβεβαιωθεί σε κυκλική δοκιμή)**

Το είδος *Branchiura sowerbyi* απαντάται σε διάφορους τύπους ιζημάτων σε ταμιευτήρια, λίμνες και ποτάμια, αρχικά σε τροπικές περιοχές. Συναντάται επίσης σε θερμές υδάτινες μάζες του βορείου ημισφαιρίου. Ωστόσο, υπάρχει σε μεγαλύτερη αφθονία σε λασπώδη-αργιλώδη ιζήματα υψηλής περιεκτικότητας σε οργανική ύλη. Επιπλέον, οι σκώληκες διαβιούν στο στρώμα του ιζήματος. Ακόμη και το οπίσθιο άκρο των σκωλήκων είναι συνήθως φωλιασμένο. Το είδος αυτό αναγνωρίζεται εύκολα από τα βραγχιακά νημάτια στο οπίσθιο τμήμα του. Τα ενήλικα άτομα μπορούν να φτάσουν σε μήκος 9-11 cm και υγρό βάρος 40-50 mg. Οι σκώληκες έχουν υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής και εμφανίζουν χρόνους διπλασιασμού του πληθυσμού μικρότερους από 2 εβδομάδες κάτω από τις συνθήκες θερμοκρασίας και σίτισης που περιγράφονται παρακάτω (Aston κ.α., 1982, (65)). Το είδος *B. sowerbyi* έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες τοξικότητας και βιοσυσσώρευσης (Marchese και Brinkhurst 1996, (31) Roghair κ.α. 1996, (67) αντίστοιχα).

Μέθοδοι καλλιέργειας

Μια σύνοψη των συνθηκών καλλιέργειας για το *Branchiura sowerbyi* παρέχεται παρακάτω (παρέχεται από τους Mercedes R. Marchese, INALI, Αργεντινή και Carla J. Roghair, RIVM, Κάτω Χώρες).

Δεν απαιτείται μία μοναδική τεχνική για την καλλιέργεια των οργανισμών δοκιμής. Οι οργανισμοί μπορούν να καλλιεργούνται με τη χρήση μη μολυσμένου, φυσικού ιζήματος (31). Η πρακτική εμπειρία δείχνει ότι ένα μέσο που αποτελείται από φυσικό ίζημα και άμμο βελτιώνει την κατάσταση των σκωλήκων σε σύγκριση με καθαρό φυσικό ίζημα (32)(67). Για την καλλιέργεια μπορούν να χρησιμοποιούνται ποτήρια ζέσεως 3 L που περιέχουν 1 500 ml μέσο ιζήματος/νερού, το οποίο αποτελείται από 375 ml φυσικού μη μολυσμένου ιζήματος (περίπου 10 % ολικού οργανικού άνθρακα, περίπου 17 % σωματιδίων ≤ 63 μm), 375 ml καθαρής άμμου (M32) και 750 ml ανασυσταθέντος ή αποχλωριωμένου νερού βρύσης (31) (32)(67). Μπορούν να χρησιμοποιούνται και χαρτιά ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια, αλλά η ανάπτυξη του πληθυσμού είναι χαμηλότερη σε σχέση με το φυσικό ίζημα. Σε ημιστατικά συστήματα, το στρώμα νερού στο ποτήρι ζέσεως αερίζεται αργά και το υπερκείμενο νερό θα πρέπει να ανανεώνεται εβδομαδιαίως.

Κάθε ποτήρι ζέσεως περιέχει 25 νεαρούς σκώληκες για αρχή. Μετά από δύο μήνες, επιλέγονται οι μεγάλοι σκώληκες από το ίζημα με λαβίδα και τοποθετούνται σε ένα νέο ποτήρι ζέσεως με προσφάτως παρασκευασμένο μέσο ιζήματος/νερού. Το παλιό ποτήρι ζέσεως περιέχει επίσης κουκούλια και νεαρούς σκώληκες. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να συλλεγονται έως 400 νεαροί σκώληκες ανά ποτήρι ζέσεως. Οι ενήλικες σκώληκες μπορούν να χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή για τουλάχιστον έναν χρόνο.

Οι καλλιέργειες θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία από 21 έως 25 °C. Οι διακυμάνσεις στη θερμοκρασία θα πρέπει να διατηρούνται κάτω από τους ± 2 °C. Ο χρόνος που απαιτείται για την εμβρυϊκή ανάπτυξη από τη γέννηση ενός αυγού μέχρι τα νεαρά άτομα να βγουν από το κουκούλι είναι περίπου τρεις εβδομάδες στους 25 °C. Η παραγωγή αυγών που λαμβάνονται από κάθε επιζώντα σκώληκα στο είδος *B. sowerbyi* βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 6,36 (31) έως 11,2 (30) σε λάσπη στους 25 °C. Ο αριθμός των αυγών ανά κουκούλι κυμαίνεται από 1,8 έως 2,8 (66)(69) ή έως 8 (68).

Το διαλυμένο οξυγόνο, η σκληρότητα του νερού, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να μετρώνται εβδομαδιαίως. Μπορεί να προστίθεται τροφή για ψάρια (π.χ. TetraMin®) ως εναιώρημα δύο ή τρεις φορές την εβδομάδα, κατά βούληση. Οι σκόληκες μπορούν επίσης να σιτίζονται με αποψυγμένο μαρούλι, κατά βούληση.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του είδους είναι η υψηλή ατομική βιομάζα (έως 40-50 mg υγρό βάρος ανά άτομο). Επομένως, αυτό το είδος μπορεί να χρησιμοποιείται για τη δοκιμή της βιοσυσσώρευσης μη ραδιοσημασμένων υπό δοκιμή ουσιών. Μπορεί να υποβάλλεται σε έκθεση στα συστήματα που χρησιμοποιούνται για το *T. tubifex* ή το *L. variegatus* με ένα μόνο άτομο ανά επανάληψη (11). Ωστόσο, θα πρέπει στη συνέχεια να αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων, εκτός εάν χρησιμοποιούνται μεγαλύτεροι θάλαμοι δοκιμής (11). Επίσης, το κριτήριο εγκυρότητας που σχετίζεται με τη συμπεριφορά φωλιάσματος πρέπει να προσαρμόζεται για αυτό το είδος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Τόμος 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, Μέρη I — IV. Υπηρεσία Επισήμων Εκδόσεων των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Ευρωπαϊκή Επιτροπή), Λουξεμβούργο.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs Ap. 60. Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ), Παρίσι.
- (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. και 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) Κεφάλαιο Γ.13 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή βιοσυγκέντρωσης με σύστημα συνεχούς ροής νερού σε ψάρια.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Δεύτερη έκδοση. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Μάρτιος 2000.
- (7) Κεφάλαιο Γ.27 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή τοξικότητας σε χειρονομίδες σε σύστημα ιζήματος-νερού με τη χρήση εμβολιασμένου ιζήματος
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. και 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. και 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. και 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. και Studinger, G. (1999). Συνάντηση εργασίας με θέμα "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Γερμανία. Αναφορά για το έργο R+D Ap. 298 67 419, Umweltbundesamt, Βερολίνο.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. και Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Αναφορά στην Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt Dessau), R&D Ap.: 202 67 437.

- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. και 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 Kow/log BCF correlations. Στο: R. Nagel και R. Loskill (εκδ.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Βερολίνο 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., και 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. και Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. και Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. και 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., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. και 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 Ap. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Δημόσιο προσχέδιο. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παραρτήματος:
- Κεφάλαιο Α.4, Τάση ατμών
 - Κεφάλαιο Α.5, Επιφανειακή τάση
 - Κεφάλαιο Α.6, Υδατοδιαλυτότητα
 - Κεφάλαιο Α.8, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος ανακινούμενης φιάλης
 - Κεφάλαιο Α.24, Συντελεστής κατανομής, μέθοδος HPLC
 - Κεφάλαιο Γ.7, Αποικοδόμηση — Αβιοτική αποικοδόμηση: υδρόλυση συναρτήσεως του pH
 - Κεφάλαιο Γ.4 Α-ΣΤ Προσδιορισμός άμεσης βιοαποικοδομησιμότητας
 - Κεφάλαιο Γ.19, Υπολογισμός του συντελεστή προσρόφησης (Koc) του εδάφους και της λάσπης των υπονόμων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).
 - Κεφάλαιο Γ.29, Άμεση βιοαποικοδομησιμότητα CO₂ σε σφραγισμένα δοχεία
- (23) OECD (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals Ap. 3. ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. και 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 και G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. Στο Hutzinger, O. (εκδότης), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Τόμος 2 Μέρος Κ (Εκδότης τόμος: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. και Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. και 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. και 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. και Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. και 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. και 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. και Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. Έκθεση RIVM 719102027.
- (33) Κεφάλαιο Γ.1 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε ψάρια.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals Ap. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. ΟΟΣΑ, Παρίσι.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. και Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. και 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. και 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. και 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. και 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) Κεφάλαιο Γ.8 του παρόντος παραρτήματος, Δοκιμή οξείας τοξικότητας σε γαιοσκώληκες.
- (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). Στο: R.O. Brinkhurst και D.G. Cook (εκδ.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, Νέα Υόρκη.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. Αμερικανική εταιρεία δοκιμών και υλικών, E 1391-94.
- (45) Hoofman, R.N., van de Guchte, K. και Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Κοινή έκθεση αρ. 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. και 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. και 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. και Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. και 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. και Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Κύκλος 1 SBT-2. Άσκηση 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, Δαβία.
- (53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. και 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, Γερμανία.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries και 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. και 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. και 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. και 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. και Brinkhurst, R.O. (1982α). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. και Brinkhurst, R.O. (1982β). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. και Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Στο: A. Mudroch, J.M. Azcue και P. Mudroch (εκδ.): *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.* Αριθ. 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. και Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Σε συνεργασία με τους R. Nagel και B. Karaoglan. Έκθεση προς την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος (Umweltbundesamt Berlin), R&D Αριθ.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. και 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. και 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*. Έκθεση RIVM 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. και Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274»
-

ISSN 1977-0669 (ηλεκτρονική έκδοση)
ISSN 1725-2547 (έντυπη έκδοση)



Υπηρεσία Εκδόσεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης
2985 Λουξεμβούργο
ΛΟΥΞΕΜΒΟΥΡΓΟ

EL