

Käesolev tekst on üksnes dokumenteerimisvahend ning sel ei ole mingit õiguslikku mõju. Liidu institutsioonid ei vastuta selle teksti sisu eest. Asjakohaste õigusaktide autentsete versioonid, sealhulgas nende preambulid, on avaldatud Euroopa Liidu Teatajas ning on kättesaadavad EUR-Lexi veebisaidil. Need ametlikud tekstid on vahetult kättesaadavad käesolevasse dokumenti lisatud linkide kaudu

► **B** KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,

30. mai 2008,

millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

(ELT L 142, 31.5.2008, lk 1)

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
► <b><u>M1</u></b>	Komisjoni määrus (EÜ) nr 761/2009, 23. juuli 2009	L 220	1	24.8.2009
► <b><u>M2</u></b>	Komisjoni määrus (EL) nr 1152/2010, 8. detsember 2010	L 324	13	9.12.2010
► <b><u>M3</u></b>	Komisjoni määrus (EL) nr 640/2012, 6. juuli 2012	L 193	1	20.7.2012
► <b><u>M4</u></b>	Komisjoni määrus (EL) nr 260/2014, 24. jaanuar 2014	L 81	1	19.3.2014
► <b><u>M5</u></b>	Komisjoni määrus (EL) nr 900/2014, 15. juuli 2014	L 247	1	21.8.2014
► <b><u>M6</u></b>	Komisjoni määrus (EL) 2016/266, 7. detsember 2015	L 54	1	1.3.2016
► <b><u>M7</u></b>	Komisjoni määrus (EL) 2017/735, 14. veebruar 2017	L 112	1	28.4.2017
► <b><u>M8</u></b>	Komisjoni määrus (EL) 2019/1390, 31. juuli 2019	L 247	1	26.9.2019
► <b><u>M9</u></b>	Komisjoni määrus (EL) 2023/464, 3. märts 2023	L 68	37	6.3.2023



**KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,**

**30. mai 2008,**

**millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)**

**(EMPs kohaldatav tekst)**

*Artikkel 1*

Määruse (EÜ) nr 1907/2006 rakendamisel kasutatavad katsemeetodid on esitatud käesoleva määruse lisas.

*Artikkel 2*

Komisjon vaatab käesolevas määruses esitatud katsemeetodeid vajaduse korral läbi, et asendada, vähendada ja täiustada selgroogsetega tehtavaid katseid.

*Artikkel 3*

Viiteid direktiivi 67/548/EMÜ V lisale tõlgendatakse viidetena käesolevale määrusele.

*Artikkel 4*

Käesolev määrus jõustub järgmisel päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolevat määrust kohaldatakse alates 1. juunist 2008.



▼ **B**

## LISA

▼ **M6**

## Märkus

Kui ükskõik millise allpool kirjeldatud katsemeetodi puhul ei ole määratletud selle sobivust segude, mitut koostisosa sisaldavate ainete (*multi-constituent substance*, MCS) või tundmatu või muutuva koostisega ainete, komplekssete reaktsioonisaaduste või bioloogilist päritolu materjalide (UVCB) analüüsimiseks, tuleb enne meetodi kasutamist segu, mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB analüüsimiseks kaaluda, kas asjaomane meetod on taotletavat regulatiivset eesmärki silmas pidades sobiv.

Kui asjaomast katsemeetodit kasutatakse segu, mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB analüüsimiseks, tuleks teha kättesaadavaks piisav ja võimalikult ammendav teave sellise segu või aine koostise kohta, nt selle koostisosade keemilise määraluse, kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste omaduste kohta.

▼ **M9**

## 0. OSA

**RAHVUSVAHELISED KATSEMEETODID MÄÄRUSE (EÜ) nr 1907/2006  
KOHASEKS AINETE OLEMUSLIKE OMADUSTE KOHTA TEABE  
KOGUMISEKS**

TABEL 1. KATSEMEETODID AINE FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa A osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodit, mille täielik kirjeldus on A osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa A osas)
Sulamispunkt/ külmutuspunkt	OECD Test Guideline 102: Melting Point/Melting Range (1995)	A.1
Keemispunkt	OECD Test Guideline 103: Boiling Point (1995)	A.2
Tihedus	OECD Test Guideline 109: Density of Liquids and Solids (2012)	(A.3)
Aururõhk	OECD Test Guideline 104: Vapour Pressure (2006)	(A.4)
Pindpinevus	OECD Test Guideline 115: Surface Tension of Aqueous Solutions (1995)	A.5
Lahustuvus vees	OECD Test Guideline 105: Water Solubility (1995)	A.6
Jaotustegur süsteemis <i>n</i> - oktanol/vesi	OECD Test Guideline 107: Partition Coefficient ( <i>n</i> -octanol/water): Shake Flask Method (1995)	(A.8)
	OECD Test Guideline 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method (2022)	A.23
	OECD Test Guideline 117: Partition Coefficient ( <i>n</i> -octanol/water), HPLC Method (2022)	A.24

▼ **M9**

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa A osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodit, mille täielik kirjeldus on A osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa A osas)
Dissotsiatsioonikonstant	OECD Test Guideline 112: Dissociation Constants in Water (1981)	A.25
Viskoossus	OECD Test Guideline 114: Viscosity of Liquids (2012)	
Leekpunkt	Test methods according to table 2.6.3 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Alumine ja ülemine plahvatuspiir	EN 1839:2017 – Determination of the explosion limits and the limiting oxygen concentration (LOC) for flammable gases and vapours	
Süttivus	Test methods according to section 2.2.4.1 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test L.2: sustained combustibility test, Part III, section 32 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.1: test method for readily combustible solids, Part III, sub-section 33.2.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.5: test method for substances which in contact with water emit flammable gases, Part III, sub-section 33.5.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Isesüttimistemperatuur (tahkised)	Test N.4: test method for self-heating substances, Part III, sub-section 33.4.6 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	EN 15188:2020 – Determination of the spontaneous ignition behaviour of dust accumulations	
Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid)	ISO/IEC 80079-20-1:2017 – Explosive atmospheres – Part 20-1: Material characteristics for gas and vapour classification – Test methods and data	
Lagunemistemperatuur	Test Series H, part II, section 28, of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Plahvatusohtlikkus	Test methods according to Test series 1-3, Part I, sections 11-13 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	EU test method A.14: Explosive Properties	A.14

▼ **M9**

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa A osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodit, mille täielik kirjeldus on A osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa A osas)
Oksüdeerimisvõime	Test method according to section 2.4.4 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test O.2: test for oxidizing liquids, Part III, sub-section 34.4.2 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test O.1: test for oxidizing solids, Part III, sub-section 34.4.1 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test O.3: gravimetric test for oxidizing solids, Part III, sub-section 34.4.3 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Pürofoorsus	Test N.3: test method for pyrophoric liquids, Part III, sub-section 33.3.1.5 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
	Test N.2: test method for pyrophoric solids, Part III, sub-section 33.3.1.4 of the UN RTDG Manual of Tests and Criteria	
Granulomeetriline koostis/ osakeste omadused	EU test method A.22: Length Weighted Geometric Mean Diameter of Fibres	A.22
	ISO 13318 – Determination of Particle Size Distribution by Centrifugal Liquid Sedimentation Methods	
	ISO 21501 – Determination of Particle Size Distribution – Single Particle Light Interaction Methods	
	OECD Test Guideline 124: Determination of the Volume Specific Surface Area of Manufactured Nanomaterials (2022)	
	OECD Test Guideline 125: Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials (2022)	
pH	OECD Test Guideline 122: Determination of pH, Acidity and Alkalinity (2013)	
Polümeeride omadused	OECD Test Guideline 118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers using Gel Permeation Chromatography (1996)	A.18
	OECD Test Guideline 119: Determination of the Low Molecular Weight Content of a Polymer Using Gel Permeation Chromatography (1996)	A.19
	OECD Test Guideline 120: Solution/Extraction Behaviour of Polymers in Water (2000)	(A.20)

## ▼M9

TABEL 2. KATSEMEETODID TOKSIKOLOOGILISTE OMADUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
Nahasöövitus/nahaärritus	<i>In vitro:</i>	
	OECD Test Guideline 430: <i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) (2015)	B.40
	OECD Test Guideline 431: <i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method (2019)	(B.40b)
	OECD Test Guideline 435: <i>In Vitro</i> Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (2015)	B.65
	OECD Test Guideline 439: <i>In Vitro</i> Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (2021)	(B.46)
	<i>In vivo:</i>	
	OECD Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion (2015)	B.4
Raske silmakahjustus/silmade ärritus	<i>In vitro:</i>	
	OECD Test Guideline 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2020)	(B.47)
	OECD Test Guideline 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2018)	(B.48)
	OECD Test Guideline 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2017)	(B.61)
	OECD Test Guideline 491: Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2020)	(B.68)
	OECD Test Guideline 492: Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2019)	(B.69)
	OECD Test Guideline 492B: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification (2022)	

## ▼ M9

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
	OECD Test Guideline 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2021)	
	OECD Test Guideline 496: <i>In vitro</i> Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2019)	
	OECD Test Guideline 467: Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation (2022)	
	<i>In vivo:</i>	
	OECD Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion (2021)	(B.5)
Naha sensibiliseerimine	<i>In vitro:</i>	
	OECD Test Guideline 442C: <i>In Chemico</i> Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (2022)	(B.59)
	OECD Test Guideline 442D: <i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Assays Addressing the AOP Key Event on Keratinocyte Activation (2022)	(B.60)
	OECD Test Guideline 442E: <i>In Vitro</i> Skin Sensitisation: <i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation (2022)	(B.71)
	OECD Test Guideline 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation (2021)	
	<i>In vivo:</i>	
	OECD Test Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay (2010)	B.42
	OECD Test Guideline 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA (2010)	B.50
	OECD Test Guideline 442B: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM (2018)	(B.51)
	OECD Test Guideline 406: Skin Sensitisation Guinea Pig Maximisation Test and Buehler Test (2022)	(B.6)

▼ M9

Löppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
Mutageensus	<i>In vitro:</i>	
	OECD Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test (2020)	(B.13/14)
	OECD Test Guideline 476: <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test Using the Hprt and xprt Genes (2016)	(B.17)
	OECD Test Guideline 490: <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene (2016)	B.67
	OECD Test Guideline 473: <i>In Vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test (2016)	B.10
	OECD Test Guideline 487: <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test (2016)	B.49
	<i>In vivo:</i>	
	OECD Test Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test (2016)	B.11
	OECD Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (2016)	B.12
	OECD Test Guideline 483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test (2016)	B.23
	OECD Test Guideline 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays (2022)	(B.58)
	OECD Test Guideline 489: <i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay (2016)	B.62
	OECD Test Guideline 470: Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay (2022)	
	Äge mürgisus	Suukaudne:
OECD Test Guideline 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dose Procedure (2002)		B.1a
OECD Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method (2002)		B.1b
OECD Test Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure (2022)		
Nahakaudne:		
OECD Test Guideline 402: Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure (2017)		(B.3)
Sissehingamisel:		
OECD Test Guideline 403: Acute Inhalation Toxicity (2009)		B.2
OECD Test Guideline 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method (2009)		B.52
OECD Test Guideline 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure (2018)		

▼ M9

Löppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
Mürgisus annustamisel	korduval OECD Test Guideline 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2008)	B.7
	OECD Test Guideline 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study (2018)	(B.8)
	OECD Test Guideline 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-Day Study (1981)	B.9
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64
	OECD Test Guideline 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2018)	(B.26)
	OECD Test Guideline 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (1998)	B.27
	OECD Test Guideline 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study (2018)	(B.29)
	OECD Test Guideline 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-Day Study (1981)	B.28
	OECD Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies (2018)	(B.30)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33)
Reproduktiivtoksilisus/ arengutoksilisus	OECD Test Guideline 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (2018)	(B.56)
	OECD Test Guideline 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.63
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64
	OECD Test Guideline 414: Prenatal Developmental Toxicity Study (2018)	(B.31)
Toksikokineetika	OECD Test Guideline 417: Toxicokinetics (2010)	B.36
	OECD Test Guideline 428: Skin Absorption: <i>In Vitro</i> Method (2004)	B.45
	OECD Test Guideline 427: Skin Absorption: <i>In Vivo</i> Method (2004)	B.44

## ▼ M9

Löppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
Kantserogeensus	OECD Test Guideline 451: Carcinogenicity Studies (2018)	(B.32)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33)
	EU test method B.21: <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Transformation Test	B.21
(Arenguga seotud) neurotoksilisus	OECD Test Guideline 424: Neurotoxicity Study in Rodents (1997)	B.43
	OECD Test Guideline 426: Developmental Neurotoxicity Study (2007)	B.53
	OECD Test Guideline 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure (1995)	B.37
	OECD Test Guideline 419: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study (1995)	B.38
Endokriinseid häireid põhjustavad omadused	<i>In vitro:</i>	
	OECD Test Guideline 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists (2021)	(B.66)
	OECD Test Guideline 456: H295R Steroidogenesis Assay (2022)	B.57
	OECD Test Guideline 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (2020)	
	OECD Test Guideline 493: Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>In Vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity (2015)	B.70
	<i>In vivo:</i>	
	OECD Test Guideline 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties (2007)	B.54
OECD Test Guideline 441: Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties (2009)	B.55	



## ▼M9

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa B osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa B osas)
Fototoksilisus	OECD Test Guideline 432: <i>In Vitro</i> 3T3 NRU Phototoxicity Test (2019)	(B.41)
	OECD Test Guideline 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity (2019)	
	OECD Test Guideline 498: <i>In vitro</i> Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method (2021)	

TABEL 3. KATSEMEETODID ÖKOTOKSIKOLOOGILISTE OMADUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa C osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa C osas)
Mürgisus veekeskonnale	OECD Test Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2011)	C.3
	OECD Test Guideline 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation) (2010)	C.11
	OECD Test Guideline 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria (2007)	C.34
	OECD Test Guideline 244: Protozoan Activated Sludge Inhibition Test (2017)	
	OECD Test Guideline 221: <i>Lemna</i> sp. Growth Inhibition Test (2006)	C.26
	OECD Test Guideline 202: <i>Daphnia</i> sp. Acute Immobilisation Test (2004)	C.2
	OECD Test Guideline 211: <i>Daphnia magna</i> Reproduction Test (2012)	C.20
	OECD Test Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Testing (2019)	(C.1)
	OECD Test Guideline 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test (2013)	C.47
	OECD Test Guideline 215: Fish, Juvenile Growth Test (2000)	C.14

▼ M9

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa C osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa C osas)
	OECD Test Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013)	C.49
	OECD Test Guideline 249: Fish Cell Line Acute Toxicity: the RTgill-W1 Cell Line Assay (2021)	
	OECD Test Guideline 242: <i>Potamopyrgus antipodarum</i> Reproduction Test (2016)	
	OECD Test Guideline 243: <i>Lymnaea stagnalis</i> Reproduction Test (2016)	
Lagunemine	OECD Test Guideline 111: Hydrolysis as a Function of pH (2004)	C.7
	OECD Test Guideline 301: Ready Biodegradability (1992)	C.4
	OECD Test Guideline 302A: Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test (1981)	C.12
	OECD Test Guideline 302B: Inherent Biodegradability: Zahn-Wellens/EMPA Test (1992)	(C.9)
	OECD Test Guideline 302C: Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II) (2009)	
	OECD Test Guideline 303: Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment – A: Activated Sludge Units; B: Biofilms (2001)	C.10
	OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (1981)	
	OECD Test Guideline 306: Biodegradability in Seawater (1992)	C.42
	OECD Test Guideline 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil (2002)	C.23
	OECD Test Guideline 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems (2002)	C.24
	OECD Test Guideline 309: Aerobic Mineralisation in Surface Water – Simulation Biodegradation Test (2004)	C.25
	OECD Test Guideline 310: Ready Biodegradability – CO <sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test) (2014)	C.29
	OECD Test Guideline 311: Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge: by Measurement of Gas Production (2006)	C.43

## ▼ M9

Lõppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa C osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa C osas)
	OECD Test Guideline 314: Simulation Tests to Assess the Biodegradability of Chemicals Discharged in Wastewater (2008)	
	OECD Test Guideline 316: Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis (2008)	
	EU test method C.5: Degradation – Biochemical Oxygen Demand	C.5
	EU test method C.6: Degradation – Chemical Oxygen Demand	C.6
Säilimine ja omadused keskkonnas	OECD Test Guideline 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure (2012)	C.13
	OECD Test Guideline 315: Bioaccumulation in Sediment-Dwelling Benthic Oligochaetes (2008)	C.46
	OECD Test Guideline 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes (2010)	C.30
	OECD Test Guideline 318: Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media (2017)	
	OECD Test Guideline 121: Estimation of the Adsorption Coefficient ( $K_{oc}$ ) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (2001)	C.19
	OECD Test Guideline 106: Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method (2000)	C.18
	OECD Test Guideline 312: Leaching in Soil Columns (2004)	C.44
	OECD Test Guideline 313: Estimation of Emissions from Preservative-Treated Wood to the Environment (2007)	C.45
	OECD Test Guideline 319A: Determination of <i>in vitro</i> intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes (RT-HEP) (2018)	
	OECD Test Guideline 319B: Determination of <i>in vitro</i> intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9) (2018)	
OECD Test Guideline 320: Anaerobic Transformation of Chemicals in Liquid Manure (2022)		

## ▼ M9

Löppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa C osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa C osas)
Mõju maismaaorganismidele	OECD Test Guideline 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test (2000)	C.21
	OECD Test Guideline 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test (2000)	C.22
	OECD Test Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests (1984)	C.8
	OECD Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test ( <i>Eisenia fetida</i> / <i>Eisenia andrei</i> ) (2016)	(C.33)
	OECD Test Guideline 220: Enchytraeid Reproduction Test (2016)	(C.32)
	OECD Test Guideline 226: Predatory mite ( <i>Hypoaspis</i> ( <i>Geolaelaps</i> ) <i>aculeifer</i> ) reproduction test in soil (2016)	(C.36)
	OECD Test Guideline 232: Collembolan Reproduction Test in Soil (2016)	(C.39)
	OECD Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (2006)	C.31
	OECD Test Guideline 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (2006)	
Mõju põhjasette organismidele	OECD Test Guideline 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment (2004)	C.27
	OECD Test Guideline 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water (2004)	C.28
	OECD Test Guideline 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment (2010)	C.40
	OECD Test Guideline 235: <i>Chironomus</i> sp., Acute Immobilisation Test (2011)	
	OECD Test Guideline 225: Sediment-Water <i>Lumbriculus</i> Toxicity Test Using Spiked Sediment (2007)	C.35
	OECD Test Guideline 238: Sediment-Free <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxicity Test (2014)	C.50
	OECD Test Guideline 239: Water-Sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxicity Test (2014)	C.51

## ▼M9

Löppnäitaja	Katsemeetod	Käesoleva lisa C osa vastav peatükk, mis sisaldab katsemeetodi täielikku kirjeldust (sulgudes olev tähis tähistab katsemeetodi täielikku kirjeldust sisaldavat peatükki, mis on B osast välja jäetud, tühi lahter aga vastava katsemeetodi puudumist käesoleva lisa C osas)
Mõju lindudele	OECD Test Guideline 205: Avian Dietary Toxicity Test (1984)	
	OECD Test Guideline 206: Avian Reproduction Test (1984)	
	OECD Test Guideline 223: Avian Acute Oral Toxicity Test (2016)	
Mõju putukatele	OECD Test Guideline 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (1998)	C.16
	OECD Test Guideline 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (1998)	C.17
	OECD Test Guideline 237: Honey Bee ( <i>Apis mellifera</i> ) Larval Toxicity Test, Single Exposure (2013)	
	OECD Test Guideline 245: Honey Bee ( <i>Apis mellifera</i> L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding) (2017)	
	OECD Test Guideline 246: Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 228: Determination of Developmental Toxicity to Dipteran Dung Flies ( <i>Scathophaga stercoraria</i> L. (Scathophagidae), <i>Musca autumnalis</i> De Geer (Muscidae)) (2016)	
Endokriinseid häireid põhjustavad omadused	OECD Test Guideline 230: 21-day Fish Assay (2009)	C.37
	OECD Test Guideline 229: Fish Short Term Reproduction Assay (2012)	C.48
	OECD Test Guideline 231: Amphibian Metamorphosis Assay (2009)	C.38
	OECD Test Guideline 234: Fish Sexual Development Test (2011)	C.41
	OECD Test Guideline 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) (2015)	C.52
	OECD Test Guideline 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) (2015)	C.53
	OECD Test Guideline 248: Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid Assay (XETA) (2019)	
	OECD Test Guideline 250: EASZY assay: Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embryos (2021)	
	OECD Test Guideline 251: Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) Assay (2022)	

**▼B****A OSA: FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE MÄÄRAMISE MEETODID**

## SISUKORD

- A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERatuur
- A.2. KEEMISTEMPERatuur
- A.3. SUHTELINE TIHEDUS
- A.4. AURURÕHK
- A.5. PINDPINEVUS
- A.6. LAHUSTUVUS VEES
- A.8. JAOTUSTEGUR
- A.9. LEEKPUNKT
- A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)
- A.11. SÜTTIVUS (GAASID)
- A.12. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)
- A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS
- A.14. PLAHVATUSOHTLIKKUS
- A.15. ISESÜTTIMISTEMPERatuur (VEDELIKUD JA GAASID)
- A.16. TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERatuur
- A.17. OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)
- A.18. POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS
- A.19. MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS POLÜMEERIS
- A.20. POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES
- A.21. OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)
- A.22. KIUDUDE PIKKUSE JÄRGI KAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMINE DIAMEETER
- A.23. JAOTUSKOEFIITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOOOL-VEESI): AEGLAASE SEGAMISE MEETOD
- A.24. JAOTUSKOEFIITSIENT (N-OKTANOOOL/VEESI): KÕRGEFEEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) MEETOD
- A.25. DISSOTSIATSIOONIKONSTANDID VEES (TIITRIMISMEETOD, SPEKTROFOTOMEETRILINE MEETOD, KONDUKTOMEETRILINE MEETOD)

**▼B****A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERATUUR****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunisil (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatud meetodid ja seadmed on ette nähtud ainete sulamistemperatuuri määramiseks olenemata nende puhtusastmest.

Meetodi valik sõltub analüüsitava aine iseloomust. Määravaks teguriks on see, kas aine on kergesti või raskesti või üldse mitte peenestatav.

Mõnede ainete puhul on kohasem määrata külmumis- või tahkumistemperatuur ning meetod sisaldab ka nende määramise standardeid.

Kui aine teatavate omaduste tõttu ei ole otstarbekohane määrata ühtki eespool toodud parameetrit, võib otstarbekas olla määrata hangumistemperatuur.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Sulamistemperatuuri defineeritakse temperatuurina, mille juures aine läheb tahkest olekust vedelasse, ja ideaalis vastab see temperatuur külmumistemperatuurile.

Kuna paljude ainete puhul toimub faasisiire mingis temperatuurivahemikus, nimetatakse seda sageli sulamisvahemikuks.

Ühikute teisendamine (K °C-ks)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on loetletud viites 4.

**▼ B**

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Määratakse temperatuur (temperatuurivahemik), mille juures toimub faasiire tahkest olekust vedelasse või vedelast olekust tahkesse. Praktikas määratakse testaine proovi atmosfäärirõhul kuumutamisel/-jahutamisel sulamise/külmumise alg- ja lõppfaasi temperatuurid. Kirjeldatud viit tüüpi meetodeid, nimelt kapillaarumeetodit, kuumlaua meetodeid, külmumistemperatuuri määramisi, termoanalüüsimetodeid ja (naftaõlide jaoks välja töötatud) hangumistemperatuuri määramist.

Teatud juhtudel võib olla otstarbekas määrata külmumistemperatuuri asemel sulamistemperatuur.

1.4.1. **Kapillaarumeetod**1.4.1.1. *Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Väike kogus peenestatud ainet viiakse kapillaartorusse ja surutakse tihedalt kokku. Kapillaartoru kuumutatakse koos termomeetriga, reguleerides temperatuuri tõusu nii, et tegeliku sulamisprotsessi ajal tõuseb temperatuur kiirusega umbes alla 1 K/min. Määratakse sulamise alg- ja lõpptemperatuur.

1.4.1.2. *Metallploki seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Põhimõttelt analoogsed punktis 1.4.1.1 kirjeldatuga, kuid kapillaartoru ja termomeeter asuvad kuumutatavas metallplokis ning on vaadeldavad plokis olevate vaatlusavade kaudu.

1.4.1.3. *Määramine fotoraku abil*

Kapillaartorus asuvat proovi kuumutatakse automaatrežiimil metallsilindris. Silindris oleva ava kaudu juhatakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir. Enamiku ainete optilised omadused muutuvad sulades läbipaistmatust läbipaistvaks. Fotorakuni jõudva valguse intensiivsus suureneb ja saadab kuumkambris asuva plaatina-takistustermomeetri temperatuuri digitaalnäidikule stoppsignaali. Mõnede tugeva värvusega ainete jaoks see meetod ei sobi.

1.4.2. **Kuumlauad**1.4.2.1 *Kofleri sulavuslaud*

Kofleri sulavuslaud koosneb kahest erineva soojusjuhtivusega elektriliselt kuumutatavast metallosast, kusjuures laud on valmistatud selliselt, et temperatuurigradient on kogu selle pikkuses peaaegu lineaarne. Sulavuslaua temperatuur võib varieeruda piirides 283–573 K ning sellel on spetsiaalne temperatuurinäidik antud lauale kohandatud skaala, osuti ja jooksikuga. Sulamistemperatuuri määramiseks kantakse aine õhukese kihina otse sulavuslaua pinnale. Mõne sekundi jooksul kujuneb välja terav eraldusjoon vedela ja tahke faasi vahel. Temperatuuri eraldusjoonel loetakse osuti viimisega eraldusjoonele.



**▼ B**1.4.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Väga väikeste materjalikoguste sulamistemperatuuri määramisel kasutatakse mitmesuguste kuumlaudadega mikroskoobe. Enamiku kuumlaudade puhul mõõdetakse temperatuuri tundliku termopaari abil, vahel kasutatakse aga elavhõbetermomeetrit. Tüüpilises sulavusmikroskoobi kuumlaual on kuumkamber, milles olevale metallalusele asetatakse objektiklaasil olev proov. Metallaluse keskel on ava, mille kaudu siseneb mikroskoobi valguspeeglist lähtuv valgus. Kasutamise ajal suletakse kamber klaasplaadiga, mis takistab õhu juurdepääsu proovile.

Proovi kuumutamist reguleeritakse reostaadiga. Väga täpseteks mõõtmisteks optiliselt anisotroopsete ainetega võib kasutada polariseeritud valgust.

1.4.2.3. *Meniskimeetod*

Seda meetodit kasutatakse eelkõige polüamiidide puhul.

Temperatuur, mille juures kuumlauda ja polüamiid-katseobjektile toetuva katteklaasi vahele paigutatud silikoonõli menisk nihkub, määratakse visuaalselt.

1.4.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetod**

Proov asetatakse spetsiaalsesse katseklaasi ja paigutatakse külmumistemperatuuri määramiseks seadmesse. Jahutamise ajal segatakse proovi pidevalt kergelt ja mõõdetakse sobivate vaheaegade tagant temperatuuri. Niipea, kui temperatuur paari mõõtmise kestel püsima jääb, registreeritakse see temperatuur külmumistemperatuurina (arvestades ka termomeetri viga).

Vältida tuleb allajahutamist, säilitades tahke ja vedela faasi vahel tasakaalu.

1.4.4. **Termoanalüüs**1.4.4.1 *Diferentsiaaltermoanalüüs (DTA)*

Registreeritakse ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldega temperatuurikõvera nulljoonest.

**▼ B**1.4.4.2 *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria (SDK)*

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitalvale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aines ja võrdlusmaterjal. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.4.5. **Hangumistemperatuur**

Meetod on välja töötatud naftaõlide jaoks ja sobib kasutamiseks madala sulamistemperatuuriga õlitaoliste ainete puhul.

Pärast algset kuumutamist jahutatakse proovi kindla kiirusega ja jälgitakse iga 3 K tagant selle voolavust. Madalaim temperatuur, mille juures aine liikumist täheldatakse, registreeritakse hangumistemperatuurina.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate sulamistemperatuuri/sulamisvahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse järgmises tabelis.

TABEL: MEETODITE KOHALDATAVUS

A. **Kapillaartorumeetodid**

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus (1)	Olemasolev standard
Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Määramine foto-raku abil	jah	Lisaseadmete abil paljude puhul	253–573 K	± 0,5 K	

(1) Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.



### B. Kuumlaud ja külmutamismeetodid

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus <sup>(1)</sup>	Olemasolev standard
Kofleri sulavuslaud	jah	ei	283 kuni > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulavusmikroskoop	jah	Ainult mõnede puhul	273 kuni > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskimeetod	ei	Eelkõige polüamiidide puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Külmumistemperatuuri meetodid	jah	jah	223–573 K	± 0,5 K	nt BS 4695

<sup>(1)</sup> Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

### C. Termoanalüüs

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus <sup>(1)</sup>	Olemasolev standard
Diferentsiaaltermoanalüüs	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600 K ± 0,5 K kuni 1 273 K K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600 K ± 0,5 K kuni 1 273 K K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

<sup>(1)</sup> Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

### D. Hangumistemperatuur

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus <sup>(1)</sup>	Olemasolev standard
Hangumistemperatuur	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

<sup>(1)</sup> Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

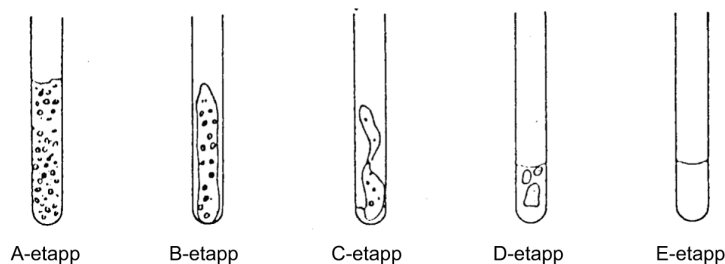
Paaegu kõigi katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet 1).

### 1.6.1. Kapillaartorumeetodid

Temperatuuri aeglasel tõstmisel ilmnevad peenestatud ainete puhul tavaliselt joonisel 1 näidatud sulamisetapid.

▼ B

Joonis 1



A-etapp      B-etapp      C-etapp      D-etapp      E-etapp

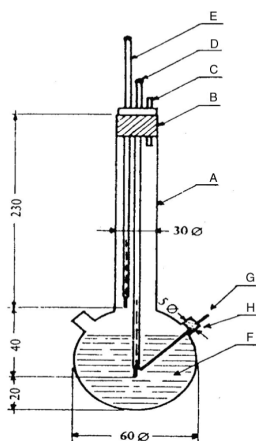
- A-etapp      Sulamise algus: peened tilgakesed kinnituvad ühtlaselt kapillaartoru siseseinale.
- B-etapp      Kokkutõmbumine: proov eemaldub sulava massi kokkutõmbumise tõttu siseseinast.
- C-etapp      Kokkutõmbunud proov vajub kokku ja vedeldub.
- D-etapp      Vedeliku pinnal kujuneb välja täielik menisk, kuid arvestatav osa proovist jääb veel tahkeks.
- E-etapp      Sulamise lõppfaas: tahkeid osakesi enam pole.

Sulamistemperatuuri määramisel registreeritakse temperatuur nii sulamise alg- kui ka lõppfaasis.

1.6.1.1. *Vedelikuwanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Joonisel 2 on näidatud standarditud klaasist sulamistemperatuuri määramise seadet (JIS K 0064); kõik mõõdud on millimeetrites.

Joonis 2



- A: Mõõtmisnõu  
 B: Kork  
 C: Õhuava  
 D: Termomeeter  
 E: Lisatermomeeter  
 F: Vannivedelik  
 G: Klaasist kapillaartoru pikkusega 80 – 100 mm, sisediameetriga  $1,0 \pm 0,2$  mm ja seinapaksusega 0,2 – 0,3 mm  
 H: Külgtoru

**▼ B***Vedelikvannis kuumutamisel kasutatav vedelik*

Valida tuleks sobiv vedelik. Vedeliku valik sõltub määratavast sulamistemperatuurist, nt sobib parafinõli sulamistemperatuuridele kuni 473 K, silikoonõli sulamistemperatuuridele kuni 573 K.

523 K ületavate sulamistemperatuuride puhul võib kasutada segu kolmest osast väävelhapest ja kahest osast (massisuhtes) kaaliumsulfaadist. Seesuguste segude kasutamisel tuleb rakendada kohaseid ettevaatusabinõusid.

*Termomeeter*

Kasutada tuleks ainult järgmiste või nendega võrdväärsete standardite nõuetele vastavaid termomeetreid:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Katse käik*

Kuiv aine peenestatakse uhmrisk ja viiakse ühest otsast kinnisesse kapillaartorusse nii, et pärast kokkusurumist täidab aine kapillaartoru 3 mm ulatuses. Ühtlaselt tihendatud proovi saamiseks tuleks kapillaartorul lasta klaastorus umbes 700 mm kõrguselt vertikaalselt vastu kellaklaasi kukkuda.

Täidetud kapillaartoru paigutatakse vanni nii, et termomeetri elavhõbedareservuaari keskosa puutub kapillaatoruga kokku kohas, kus asub proov. Tavaliselt asetatakse kapillaartoru seadmesse temperatuuril umbes 10 K alla sulamistemperatuuri.

Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Soovitav on vedelikku segada. Umbes 10 K enne eeldatava sulamistemperatuurini jõudmist vähendatakse temperatuuri tõusu kiiruseni mitte üle 1 K/min.

*Arvutamine*

Sulamistemperatuur arvutatakse järgmiselt:

$$T = T_D + 0,00016(T_D - T_E) n$$

kus:

$T$  = parandatud sulamistemperatuur (K)

$T_D$  = termomeetri D temperatuurinäit (K)

$T_E$  = termomeetri E temperatuurinäit (K)

$n$  = skaalajaotuste arv termomeetri D elavhõbedasamba väljaulatuval osal

1.6.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks**Seade**Koosneb:*

— silindrilisest metallplokist, mille ülaosa on õõnes ja moodustab kambri (vt joonist 3);

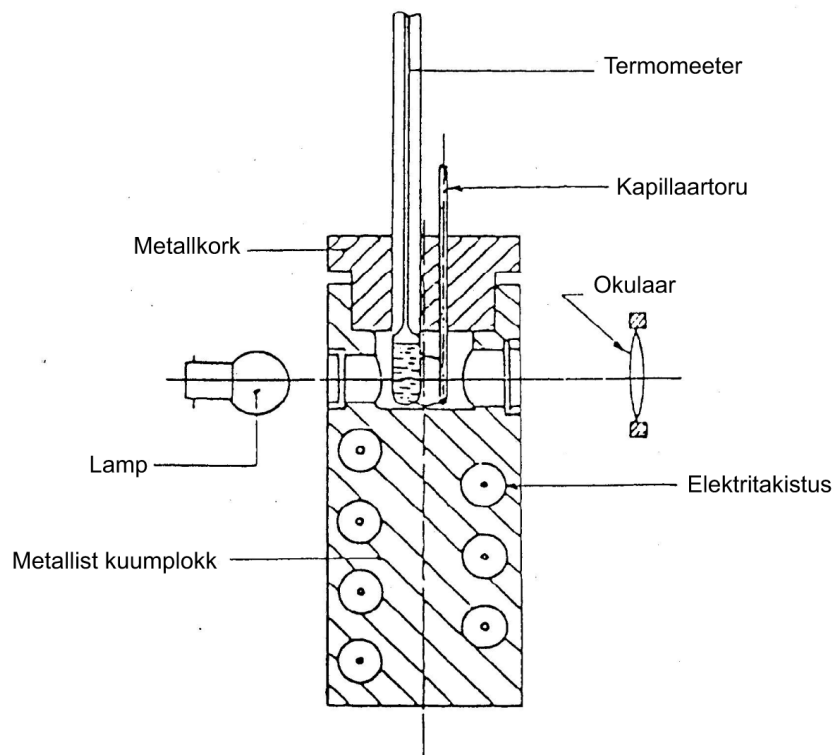
— metallkorgist ühe või kahe avaga, mis võimaldavad metallploki torusid paigaldada;

**▼B**

- metallploki kütteseadmest, mis võib olla lahendatud näiteks elektritakistusena ploki;
  
- reostaadist võimsuse reguleerimiseks juhul, kui kasutatakse elektrilist kütteseadet;
  
- neljast üksteise suhtes täisnurga all paiknevast kuumuskindla klaasiga aknast kambri külgsintel. Ühe sellise akna ette on paigaldatud okulaar kapillaartoru jälgimiseks. Kolme ülejäänud akent kasutatakse sisemuse valgustamiseks lampide abil;
  
- ühest otsast kinnisest kuumuskindlast klaasist kapillaartorust (vt 1.6.1.1).

Vt punktis 1.6.1.1 nimetatud standardeid. Sobivad ka võrreldava täpsusega termoelektrilised mõõteseadmed.

Joonis 3



### 1.6.1.3. Määramine fotoraku abil

#### Seade ja katse käik

Seade koosneb automaatse küttesüsteemiga metallkambrist. Kolm kapillaartoru täidetakse vastavalt punktile 1.6.1.1 ja paigutatakse ahju.

**▼ B**

Seadme kaliibrimiseks on võimalik kasutada mitmesuguseid lineaarseid temperatuuritõuse; sobivat temperatuuritõusu reguleeritakse elektriliselt vastavalt seadistatud konstantsele lineaarsele tõusukiirusele. Meerikud näitavad ahju tegelikku temperatuuri ja kapillaartorus oleva aine temperatuuri.

**1.6.2. Kuumlauad**1.6.2.1. *Kofleri sulavuslaud*

Vt liidet.

1.6.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Vt liidet.

1.6.2.3. *Meniskimeetod (polüamiididele)*

Vt liidet.

Sulamistemperatuuri vahemikus ei tohiks temperatuur tõusta kiiremini kui 1 K/min.

**1.6.3. Külumistemperatuuri määramise meetodid**

Vt liidet.

**1.6.4. Termoanalüüs**1.6.4.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.4.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

**1.6.5. Hangumistemperatuuri määramine**

Vt liidet.

**2. ANDMED**

Mõningatel juhtudel on termomeetri näitusid vaja korrigeerida.

**3. ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetaipi kirjeldust (kui seda on rakendatud);

— hinnangulist täpsust.

Sulamistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabeleid) jääva mõõtetulemuse keskmine.

**▼B**

Kui sulamise alg- ja lõppfaasi temperatuuride vahe jääb meetodi hinnangulise täpsuse piiridesse, registreeritakse sulamistemperatuurina sulamise lõppfaasi temperatuur; vastasel juhul registreeritakse mõlemad väärtused.

Kui aine enne sulamistemperatuurini jõudmist laguneb või sublimeerub, registreeritakse temperatuur, mille juures see aset leiab.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsilist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

**4. VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.
3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.



**▼B***Liide*

*Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.*

1. **Kapillaartoru meetodid**

## 1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

ASTM E 324-69                      Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals

BS 4634                                Method for the determination of melting point and/or melting range

DIN 53181                            Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren

JIS K 00-64                          Testing methods for melting point of chemical products

## 1.2. Metallplokiaga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

DIN 53736                            Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E)                        Plastics – polyamides – determination of „melting point”

2. **Kuulauad**

## 2.1. Kofleri sulavuslaud

ANSI/ASTM D 3451                76 Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

## 2.2. Sulavusmikroskoop

DIN 53736                            Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

## 2.3. Meniskimeetod (polüamiididele)

ISO 1218 (E)                        Plastics – polyamides – determination of „melting point”

**▼B**

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion” Methode du ménisque

3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figéage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termoanalüüs**4.1. **Diferentsiaaltermoanalüüs**

ASTM E 537-76	Standard method for assaying the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

**▼ B**

	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermisches Analyse, Begriffe
4.2.	Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	
	ASTM E 537-76	Standard method for asseying the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermisches Analyse, Begriffe
5.	<b>Hangumistemperatuuri määramine</b>	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point.

**▼B****A.2. KEEMISTEMPERatuur****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunisel (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

**1.1. SISSEJUHATUS**

Siin kirjeldatud meetodeid ja seadmeid saab kasutada vedelate ja madala sulamistemperatuuriga ainete korral eeldusel, et nendega ei toimu allpool keemistemperatuuri mingeid keemilisi reaktsioone (näiteks autooksüdatsiooni, ümberasetust, lagunemist jne). Meetodid sobivad kohaldamiseks nii puhastele kui ka lisanditega vedelikele.

Põhirõhk on pandud fotorakk-detektorit või termoanalüüsi kasutavatele meetoditele, kuna need sobivad nii sulamis- kui ka keemistemperatuuri määramiseks. Lisaks on mõõtmised automatiseeritavad.

„Dünaamilise meetodi” eelis on sobivus ka aururõhu määramiseks ning puudub vajadus parandada keemistemperatuuri normaalrõhule (101,325 kPa), kuna rõhku on mõõtmise käigus võimalik manostaadi abil normaalrõhule reguleerida.

*Märkused*

Lisandite mõju keemistemperatuuri määramisele sõltub olulisel määral lisandi iseloomust. Kui proov sisaldab tulemust mõjutada võivaid lenduvaid lisandeid, võib seda puhastada.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Keemistemperatuur normaalrõhul defineeritakse temperatuurina, mille juures vedeliku aururõhk on 101,325 kPa.

Kui keemistemperatuuri ei määrata normaalrõhul, kirjeldab aururõhu sõltuvust temperatuurist Clausiuse-Clapeyroni võrrand:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3 RT} + const.$$

kus:

$P$  = aine aururõhk paskalites

$\Delta H_v$  = aine aurustumissoojus ( $J mol^{-1}$ )

$R$  = universaalne gaasikonstant =  $8,314 (J mol^{-1} K^{-1})$

$T$  = termodünaamiline temperatuur (K)

Keemistemperatuur registreeritakse mõõtmisaegse õhurõhu suhtes.

**▼ B***Teisendused*

Rõhk (ühikud: kPa)

$$100 \text{ kPa} = 1 \text{ bar} = 0,1 \text{ MPa}$$

(ühik „bar” on lubatud, kuid ei ole soovitatav)

$$133 \text{ Pa} = 1 \text{ mm Hg} = 1 \text{ Torr}$$

(ühikud „mm Hg” ja „Torr” ei ole lubatud)

$$1 \text{ atm} = \text{normaalatmosfäär} = 101\,325 \text{ Pa}$$

(ühik „atm” ei ole lubatud)

Temperatuur (ühikud: K)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on ära toodud liites loetletud meetodites.

### 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Viis meetodit keemistemperatuuri (keemistemperatuuri vahemiku) määramiseks põhinevad keemistemperatuuri mõõtmisel, ülejäänud kaks termoanalüüsil.

#### 1.4.1. Määramine ebulliomeetri abil

Ebulliomeetrid töötati algselt välja molaarmassi määramiseks keemistemperatuuri tõusu järgi, kuid nad sobivad ka keemistemperatuuri täpseks mõõtmiseks. Väga lihtsat seadet kirjeldatakse ASTM D 1120-72 (vt liidet). Selles seadmes kuumutatakse vedelikku atmosfäärirõhul tasakaalutingimustes kuni keemiseni.

#### 1.4.2. Dünaamiline meetod

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse keemise ajal tagasijooksus sobiva termomeetri abil auru kondensatsioonitemperatuur. Meetod võimaldab rõhku varieerida.

#### 1.4.3. Destillatsioonimeetod keemistemperatuuri määramiseks

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse vedeliku destillatsioonil auru kondensatsioonitemperatuur ja destillaadi kogus.

**▼ B****1.4.4. Siwoloboffi meetod**

Proovi kuumutatakse katseklaasis vedelikuvannil. Katseklaasi paigutatakse alt kinni joodetud kapillaartoru, mille alumises osas on õhumull.

**1.4.5. Määramine fotoraku abil**

Mõõtmise tehakse eralduvate mullide põhjal automaatselt ja fotoelektriliselt, järgides Siwoloboffi meetodit.

**1.4.6. Diferentsiaaltermoanalüüs**

Registreeritakse ühele ja samale juhitalvale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekalde temperatuurikõvera nulljoonest.

**1.4.7. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitalvale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekalde soojusbilansi kõvera nulljoonest.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Erinevate keemistemperatuuri/keemistemperatuuri vahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse tabelis 1.

Tabel 1.

**Meetodite võrdlus**

Mõõtmismeetod	Hinnanguline täpsus	Olemasolev standard
Ebulliomeeter	± 1,4 K (kuni 373 K) <sup>(1), (2)</sup> ± 2,5 K (kuni 600 K) <sup>(1), (2)</sup>	ASTM D 1120-72 <sup>(1)</sup>
Dünaamiline meetod	± 0,5 K (kuni 600 K) <sup>(2)</sup>	
Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)	± 0,5 K (kuni 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffi meetod	± 2 K (kuni 600 K) <sup>(2)</sup>	
Määramine fotoraku abil	± 0,3 K (373 K juures) <sup>(2)</sup>	
Diferentsiaaltermoanalüüs	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76

<sup>(1)</sup> See täpsus kehtib ainult lihtsa, näiteks ASTM D 1120-72 kirjeldusele vastava seadme puhul; keerukamate ebulliomeetrite abil on täpsust võimalik suurendada.

<sup>(2)</sup> Kehtib ainult puhaste ainete puhul. Muudel juhtudel kasutamist tuleb põhjendada.

**▼ B**

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Osade katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet).

1.6.1. **Ebulliomeeter**

Vt liidet.

1.6.2. **Dünaamiline meetod**

Vt katsemeetodit A.4 aururõhu määramiseks.

Registreeritakse 101 325 kPA avaldatavale rõhule vastav keemistemperatuur.

1.6.3. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

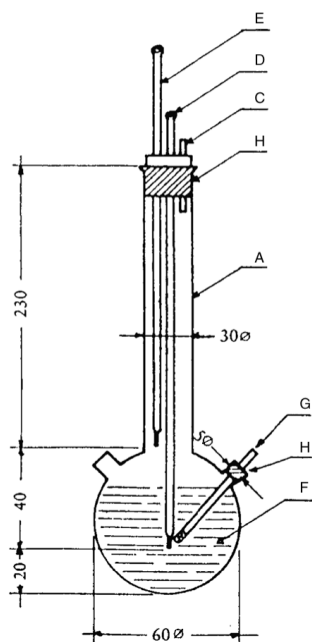
Vt liidet.

1.6.4. **Siwoloboffi meetod**

Ligikaudu 5 mm läbimõõduga katseklaasis olevat proovi kuumutatakse sulamistemperatuuri määramise seadmes (joonis 1).

Joonisel 1 on näidatud standarditud klaasist sulamis- ja keemistemperatuuri määramise seade (JIS K 0064) (kõik mõõdud on millimeetrites).

Joonis 1

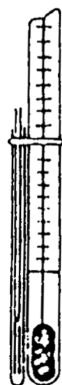


- A: Mõõtmisnõu
- B: Kork
- C: Öhuava
- D: Termomeeter
- E: Lisatermomeeter
- F: Vannivedelik
- G: Kuni 5 mm välisdiameetriga katseklaas, mille sees on ligikaudu 100 mm pikkune, ligikaudu 1 mm sisediameetri ja ligikaudu 0,2-0,3 mm seinapaksusega kapillaartoru
- H: Külgtoru

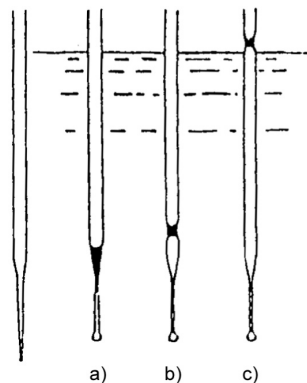
Katseklaasi paigutatakse alumisest otsast ligikaudu 1 cm kauguselt kinni joodetud kapillaartoru (keedukapillaar). Lisatava testaine kogus valitakse selline, et kapillaartoru kinnijoodetud osa jääb alla-poolse vedeliku pinda. Keedukapillaariga katseklaas seotakse kas kummipaelaga termomeetri külge või kinnitatakse külgtõega (vt joonist 2).

▼ B

Joonis 2

**Siwoloboffi meetod**

Joonis 3

**Muudetud meetod**

Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik valitakse keemistemperatuuri järgi. Temperatuuridel kuni 573 K võib kasutada silikoonõli. Parafiinõli võib kasutada maksimaalselt temperatuurini 473 K. Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Vannivedelikku tuleb segada. Umbes 10 K enne eeldatava keemistemperatuurini jõudmist vähendatakse soojendamist nii, et temperatuur tõuseb kiirusega alla 1 K/min. Keemistemperatuuri lähenedes hakkab keedukapillaarist kiiresti mulle eralduma.

Keemistemperatuur on selline temperatuur, mille juures mullide voog kiirel jahutamisel katkeb ning vedelikunivoo kapillaartorus hakkab järsult tõusma. Termomeetri vastav näit ongi aine keemistemperatuur.

Muudetud meetodi (joonis 3) kohaselt määratakse keemistemperatuur sulamistemperatuuri määramisel kasutatavas kapillaartorus. Selle ots tõmmatakse umbes 2 cm pikkuses peeneks (a) ja kapillaartorusse imetakse väike kogus proovi. Kapillaartoru avatud ots joodetakse kinni, nii et tippu jääb väike õhumull. Kuumutamisel sulamistemperatuuri määramise seadmes (b) õhumull paisub. Keemistemperatuur vastab temperatuurile, mille juures ainekork tõuseb vannivedeliku pinna tasemeni (c).

1.6.5. **Määramine fotoraku abil**

Kapillaartorus olevat proovi kuumutatakse soojendatavas metallplokis.

Plokis olevate vastavate avade kaudu juhatakse läbi aine täppiskaliibritud fotorakule suunatud valguskiir.

Proovi temperatuuri tõusmisel hakkab keedukapillaarist üksikuid mulle eralduma. Keemistemperatuurile lähenedes kasvab eralduvate mullide arv märgatavalt. Selle tulemusel fotorakus registreeritava valguse intensiivsus suureneb ja saadab plokis asuva plaatinatakistustermomeetri temperatuuri näidikule stoppsignaali.

Meetod on väga mugav, kuna võimaldab ilma seadet muutmata mõõta keemistemperatuuri ka allpool toatemperatuuri kuni 253,15 K (−20 °C). Selleks tuleb seade lihtsalt jahutusvanni paigutada.



**▼ B**1.6.6. **Termoanalüüs**1.6.6.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.6.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

2. **ANDMED**

Väikestel lahkevustel normaalrõhust (kuni  $\pm 5$  kPa) normaliseeritakse keemistemperatuuri väärtused keemistemperatuurile normaalrõhul ( $T_n$ ) järgmise Sidney Youngi arväärtus-võrrandi abil:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

kus:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ (vt märki)}$$

$$p = \text{mõõdetud rõhk (kPa)}$$

$$f_T = \text{keemistemperatuuri muutuse sõltuvus rõhust (K/kPa)}$$

$$T = \text{mõõdetud keemistemperatuur (K)}$$

$$T_n = \text{normaalrõhule parandatud keemistemperatuur (K)}$$

Paljude ainete temperatuuriparandustegurid ( $f_T$ ) ning valemid nende ligikaudseks arvutamiseks on ära toodud eespool nimetatud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites.

Näiteks toob DIN 53171 ära järgmised ligikaudsed parandustegurid värvides kasutatavatele lahustitele:

Tabel 2.

**Temperatuuriparandustegurid  $f_T$** 

Temperatuur T (K)	Parandustegur $f_T$ (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

**▼B**3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit;
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetaapi kirjeldust (kui seda on rakendatud);
- hinnangulist täpsust.

Keemistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabel 1) jääva mõõtetulemuse keskmine.

Ära tuuakse nii mõõdetud keemistemperatuurid kui ka nende keskmine; rõhud, mille juures mõõtmised tehti, registreeritakse kilopaskalites (kPa). Eelistatavalt peaks rõhk olema lähedane normaalrõhule.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsilist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.
3. R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

**▼ B***Liide*

*Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.*

1. **Ebulliomeeter**
  - 1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks
 

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes
----------------	---
  
2. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation
  
3. **Diferentsiaaltermoanalüüs ja skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

**▼ B**

**A.3. SUHTELINE TIHEDUS**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

▼ M1

A.4. AURURÕHK

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼B****A.5. PINDPINEVUS****1. MEETOD**

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viites 2.

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatud meetodid on ette nähtud vesilahuste pindpinevuse mõõtmiseks.

Katse tegemiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, selle struktuuri, hüdrolüüsuvust ja mitsellitekke lävikonsentratsiooni.

Järgmised meetodid sobivad kohaldamiseks enamikule keemilistele ainetele, olenemata nende puhtusastmest.

Pindpinevust saab mõõta rõnga lahtirebimise meetodi abil ainult vesilahuste puhul, mille dünaamiline viskoossus on alla ca. 200 mPa s.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Pindpinevusena käsitatakse pinna vabaentalpiat pinnaühiku kohta.

Pindpinevust väljendatakse järgmistes ühikutes:

N/m (SI ühik) või

mN/m (SI alamühik)

1N/m = 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm (aegunud CGS-süsteemis)

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Viidetes 1 ja 3 on ära toodud laia pindpinevuste vahemikku hõlmavad võrdlusained.

**1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE**

Meetodite kohaselt mõõdetakse maksimaalne jõud, mida on vaja püstsuunas rakendada mõõtenõus oleva uuritava vedeliku pinnaga kokkupuutes olevale loogale või rõngale selle lahtirebimiseks pinnalt või pinnaga kokkupuutes oleva plaadi servale tekkinud kile ülestõmbamiseks.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 1 mg/l, analüüsitakse vesilahuses ainult ühel kontsentratsioonil.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Nende meetodite täpsus ületab tõenäolised vajadused keskkonnaohtlikkuse hindamisel.

**▼ B**

## 1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Valmistatakse aine lahus destilleeritud vees. Lahuse kontsentratsioon peaks olema 90 % aine küllastuskontsentratsioonist vees; kui kontsentratsioon ületab 1 g/l, kasutatakse katses kontsentratsiooni 1 g/l. Aineid, mille lahustuvus vees on alla 1 mg/l, pole vaja testida.

1.6.1. **Plaadimeetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Loogameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Rõngameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD ühtlustatud rõngameetod**1.6.4.1. *Seade*

Mõõtmiseks sobivad müügil olevad tensiomeetrid. Need koosnevad järgmistest osadest:

— liikuvast proovialusest;

— dünamomeetrist;

— mõõtekehast (rõngast);

— mõõtmisnõust.

1.6.4.1.1. *Liikuv proovialus*

Liikuvale proovialusele asetatakse uuritavat vedelikku sisaldavat termostateeritud mõõtmisnõu. Alus kinnitatakse koos dünamomeetriga statiivile.

1.6.4.1.2. *Dünamomeeter*

Dünamomeeter (vt joonist) paikneb proovialuse kohal. Viga jõu mõõtmisel ei tohi ületada  $\pm 10^{-6}$  N, mis vastab veapiirile  $\pm 0,1$  mg massi mõõtmisel. Enamikul juhtudel on müügil olevate tensiomeetrite mõõteskaala kalibreeritud mN/m skaalas, nii et pindpinevuse saab skaalalt lugeda otse millinjuutonites meetri kohta täpsusega 0,1 mN/m.

**▼B**

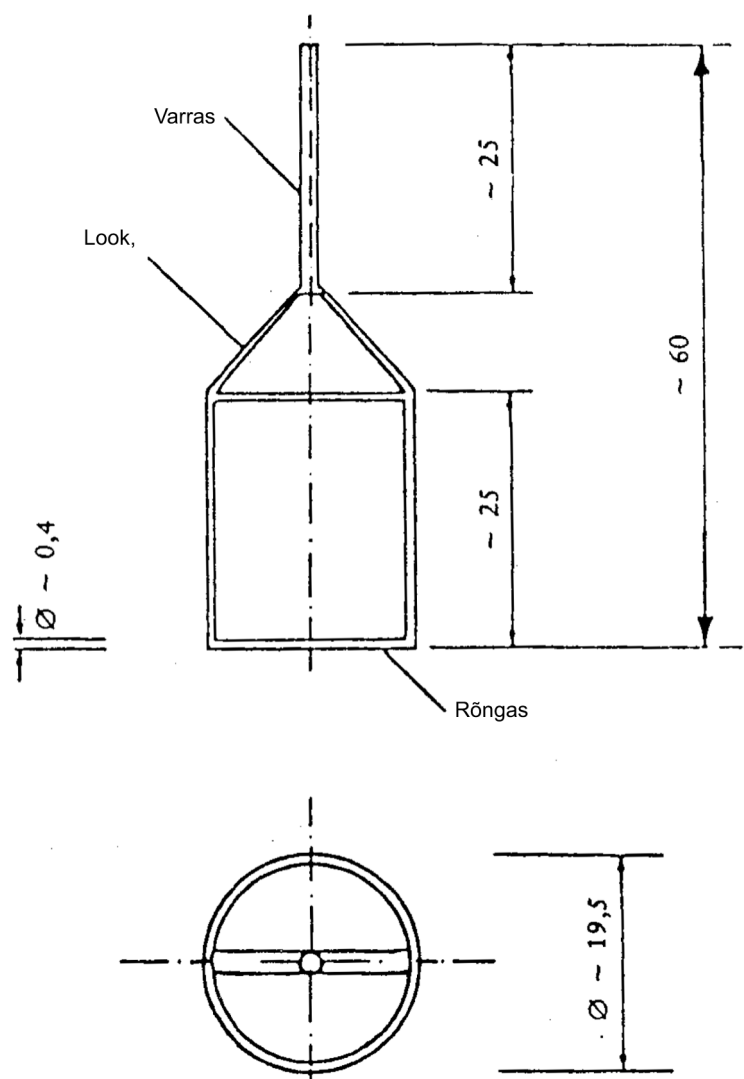
## 1.6.4.1.3. Mõõtekeha (rõngas)

Rõngas on tavaliselt valmistatud 0,4 mm jämedusest plaatina-iriidiumtraadist ja selle keskmine ümbermõõt on 60 mm. Rõngas ripub horisontaalselt metallvarda ja looga otsas, mille kaudu ta on ühendatud dünamomeetriga (vt joonist).

Joonis

**Mõõtekeha**

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



## 1.6.4.1.4. Mõõtmisnõu

Katselahust sisaldava mõõtmisnõuna kasutatakse termostateeritud klaasnõud. Nõu ehitus peab olema selline, et katselahuse ja selle kohal oleva gaasifaasi temperatuurid jäävad katse kestel konstantseks ning proov ei aurustu. Mõõtmisnõuks sobivad silindrilised klaasnõud sisedìameetriga vähemalt 45 mm.



**▼ B**1.6.4.2. *Seadme ettevalmistamine*1.6.4.2.1. *Puhastamine*

Klaasnõud puhastatakse hoolikalt. Vajaduse korral pestakse neid kuuma kroomseguga ja seejärel kontsentreeritud fosforhappega (83–98 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (massi järgi)), loputatakse põhjalikult kraaniveega, pestakse lõpuks bidestillleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja seejärel kuivatatakse või loputatakse osaga mõõdetavast vedelikuproovist.

Rõngast loputatakse kõigepealt põhjalikult veega, et eemaldada vees lahustuvad ained, kastetakse seejärel lühikeseks ajaks kroomsegusse, pestakse siis bidestillleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja kuumutatakse lõpuks lühikest aega metanoolileegi kohal.

*Märkus*

Kroomsegu ja fosforhappes mittelahustuvad saasteained, nt siliioonid, eemaldatakse sobiva orgaanilise lahustiga.

1.6.4.2.2. *Seadme kaliibrimine*

Seadme kontrollimiseks kontrollitakse nullpunkti ja reguleeritakse seda nii, et seade võimaldab täpset mõõtmist mN/m skaalas.

*Kinnitus*

Seade looditakse tensiomeetri aluse reguleerimiskruvide abil (näiteks alusel oleva loodinäidiku järgi).

*Nullpunkti reguleerimine*

Pärast rõnga kinnitamist aparaadile ja enne selle vedelikku kastmist reguleeritakse tensiomeetri näit nulli ja kontrollitakse, kas rõngas on vedeliku pinnaga paralleelne. Selleks võib vedelikupinda kasutada peeglina.

*Kaliibrimised*

Seadme kaliibrimiseks võib kasutada üht kahest järgmisest meetodist.

- a) Raskuste abil: kasutatakse rõngale asetavaid kindla massiga (0,1–1,0 g) raskusi. Kaliibrimistegur  $\Phi_a$ , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 1 abil:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad (1)$$

kus:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = raskuse mass (g)

g = raskuskiirendus (merepinnal 981 cm s<sup>-2</sup>)

b = rõnga keskmine ümbermõõt (cm)

$\sigma_a$  = tensiomeetri näit pärast raskuse asetamist rõngale (mN/m).

**▼ B**

- b) Vee abil: kasutatakse puhast vett, mille pindpinevus on näiteks 23 °C juures 72,3 mN/m.

Selle meetodi kohaselt toimub kaliibrimine kiiremini kui massi abil, kuid alati eksisteerib oht, et vee pindpinevust mõjutavad pindaktiivsed lisandid. Kaliibrimistegur  $\Phi_b$ , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 2 abil:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (2)$$

kus:

$\sigma_o$  = vee pindpinevus (mN/m) kirjanduse andmetel

$\sigma_g$  = mõõtmisel leitud vee pindpinevus (mN/m) mõlemal samal temperatuuril.

#### 1.6.4.3. *Proovide ettevalmistamine*

Uuritavatest ainetest valmistatakse vajaliku kontsentratsiooniga vesilahused, kuhu ei tohi jääda lahustumatut jääki.

Lahust hoitakse püsival temperatuuril ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Kuna mõõtmisnõus oleva lahuse pindpinevus muutub aja jooksul, tehakse erinevatel aegadel mitu mõõtmist ja koostatakse kõver pindpinevuse muutumise kohta ajas. Kui pindpinevus enam ei muutu, on saavutatud tasakaal.

Mõõtmistulemusi mõjutavad tolm ja gaasilised lisandid. Seetõttu tuleb katsed teha suletud kambris.

#### 1.6.5. **Katsetingimused**

Mõõtmised tehakse ligikaudu 20 °C juures ja temperatuuri reguleeritakse  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  täpsusega.

#### 1.6.6. **Katse tegemine**

Mõõdetavad lahused viiakse põhjalikult puhastatud mõõtmisnõusse, vältides hoolikalt vahutamist, ja mõõtmisnõu paigutatakse katseseadmesse proovialusele. Proovialust mõõtmisnõuga tõstetakse, kuni rõngas on allpool mõõdetava lahuse pinda. Seejärel lastakse proovialust järk-järgult ühtlaselt allapoole (kiirusega ligikaudu 0,5 cm/min), eemaldades rõngast pinnast kuni maksimaalse tõmbejõu saavutamiseni. Rõnga külge kinnitunud vedelikukiht ei tohi sellest eralduda. Pärast mõõtmiste lõppu viiakse rõngas jälle allapoole vedeliku pinda ja korratakse mõõtmisi, kuni jõutakse konstantsete pindpinevuse väärtusteni. Iga mõõtmise juures registreeritakse lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud aeg. Näidud võetakse rõnga vedelikupinnast lahtirebimiseks vajaliku maksimaalse jõu juures.

**▼ B**2. **ANDMED**

Pindpinevuse arvutamiseks tuleb seadme näit (mN/m) korrutada kaliibrimisteguriga  $\Phi_a$  või  $\Phi_b$  (sõltuvalt kasutatud kaliibrimismeetodist). Nii saadakse väärtus, mis on ainult ligikaudne ja vajab seega korrigeerimist.

Harkins ja Jordan (4) on empiirilisel kindlaks määranud rõngameetodi abil määratud pindpinevuse väärtuste parandustegurid, mis sõltuvad rõnga mõõtmetest, vedeliku tihedusest ja pindpinevusest.

Kuna Harkinsi ja Jordani tabelitest iga mõõtmise jaoks eraldi parandustegurite leidmine vesilahuste pindpinevuse arvutamiseks on väga töömahukas, võib kasutada lihtsustatud meetodit, kus parandatud pindpinevuse väärtused loetakse otse tabelist. (Tabeliväärtuste vahele jäävate näitude puhul kasutatakse interpolatsiooni).

*Tabel:*

**mõõdetud pindpinevuste parandused**

Ainult vesilahuste jaoks,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R	= 9,55 mm (rõnga keskmine raadius)
r	= 0,185 mm (rõngatraadi raadius)

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

**▼ B**

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabel on koostatud Harkinsi-Jordani paranduste põhjal. Tabel on sarnane DIN standardi (DIN 53914) tabeliga vee ja vesilahuste jaoks (tihedus  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$  ja kehtib müügil olevate rõngaste kohta mõõtmetega  $R = 9,55 \text{ mm}$  (rõnga keskmine raadius) ja  $r = 0,185 \text{ mm}$  (rõngatraadi raadius). Tabelis on esitatud pärast raskuste või veega kaliibrimist mõõdetud pindpinevuse väärtuste ka parandatud väärtused.

Pindpinevuse võib arvutada ka ilma eelneva kaliibrimiseta, kasutades järgmist valemit:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

kus:

$F$  = dünamomeetriga kile katkemisel mõõdetud jõud

$R$  = rõnga raadius

$f$  = parandustegur (1)

### 3. ARUANDLUS

#### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— kasutatud vee või lahuse iseloomu;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— mõõtmistulemusi: pindpinevuse väärtused, sh kõik üksiktulemused ja nende aritmeetiline keskmine ning parandatud keskmine (mis arvestab nii seadmetest tulenevat parandustegurit kui ka parandustabelit);

**▼B**

- lahuse kontsentratsiooni;
- katsetemperatuuri;
- lahuse vanust, st aega lahuse valmistamise ja mõõtmise vahel;
- pindpinevuse sõltuvust lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud ajast;
- registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsilist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

**3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE**

Arvestades, et destilleeritud vee pindpinevus on 20 °C juures 72,75 mN/m, tuleks ained, mille pindpinevus käesoleva meetodi abil mõõtes on alla 60 mN/m, lugeda pindaktiivseteks aineteks.

**4. VIITED**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.
3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.
4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

**▼M4****A.6. LAHUSTUVUS VEES****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 105 (1995). Käesolev katsemeetod on 1981. aastal vastu võetud esialgse meetodi TG 105 läbivaadatud versioon. Käesoleva versiooni ja 1981. aasta versiooni vahel ei ole sisulist erinevust, muudetud on peamiselt vormi. Läbi-vaadatud versioon põhineb ELi katsemeetodil „Lahustuvus vees” <sup>(1)</sup>.

**LÄHTEKAALUTLUSED**

2. Uuritava aine lahustuvus vees võib lisandite mõjul oluliselt muutuda. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse, kuidas määrata sellise aine lahustuvust vees, mis on praktiliselt puhas, vees püsiv ja ei lendu. Enne vees lahustuvuse määramist on kasulik omada uuritava aine kohta mõningast eelteavet, nagu struktuurvalem, aururõhk, dissotsiatsioonikonstant ja hüdroolüüs sõltuvalt pH väärtusest.
3. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud kahte meetodit: kolonn-elueerimismeetod ja kolvimeetod, millega on kaetud lahustuvuse vahemikud vastavalt kuni  $10^{-2}$  g/l ja alates kontsentratsioonist  $10^{-2}$  g/l. Kirjeldatud on ka lihtsat eluuringut. Eluuringuga saab määrata uuritava proovi ligikaudse sobiva koguse, mida tuleb kasutada lõplikus katses, samuti küllastumise saavutamiseks vajaliku aja.

**MÕISTED JA ÜHIKUD**

4. Aine lahustuvus vees on selle küllastav massikontsentratsioon vees antud temperatuuril.
5. Lahustuvust vees väljendatakse lahustunud aine massina lahuse ruumala kohta. Lahustuvuse SI-ühik on  $\text{kg/m}^3$ ; võib kasutada ka ühikut g/l.

**VÕRDLUSKEMIKAALID**

6. Uuritava aine lahustuvuse määramisel ei ole vaja kasutada võrdluskemikaale.

**MEETODITE KIRJELDUS****Katsetingimused**

7. Eelistatav katsetemperatuur on  $20 \pm 0,5$  °C. Valitud temperatuur tuleks seadme kõigis olulistest osades hoida konstantsena.

**Eeluuring**

8. Astmelise meetodi kasutamisel lisatakse toatemperatuuril 10-milliliitrisel klaaskorgiga mõõtesilindris üha suuremaid veekoguseid umbes 0,1 grammile uuritavale ainele (tahke uuritav aine peab olema peenestatunud). Pärast iga veekoguse lisamist loksutatakse segu kümme minutit ja kontrollitakse visuaalselt lahustumata proovijääkide olemasolu. Kui proov või osa sellest

▼ **M4**

jääb pärast 10 ml vee lisamist lahustumata, jätkatakse katset 100 ml mõõtesilindris. Ligikaudne lahustuvus on esitatud tabelis 1 lisatud vee mahulise koguse all, mille juures proov täielikult lahustub. Kui lahustuvus on väike, võib uuritava aine lahustamiseks kuluda palju aega ja katseks tuleb ette näha vähemalt 24 tundi. Kui 24 tunni möödumisel on osa uuritavast ainest ikka veel lahustumata, tuleb lahustamiseks näha ette rohkem aega (kuni 96 tundi) või kasutada suuremat lahjendust, et teha kindlaks, kas tuleb kasutada kolonn-elueerimis- või kolvimeetodit.

Tabel 1

Vee milliliitrid soluudi kohta	0,1 g	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Ligikaudne lahustuvus (g/l)		> 1 000	1 000 – 200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

**Kolonn-elueerimismeetod***Põhimõte*

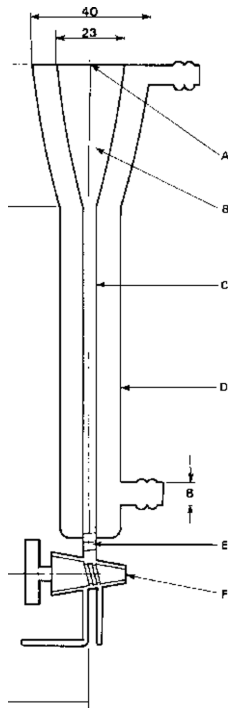
- Meetodi aluseks on uuritava aine veega elueerimine mikrokolonnist, mis on täidetud inertse tugimaterjaliga, mis on eelnevalt kaetud uuritava aine liiaga (<sup>2</sup>). Lahustuvus vees leitakse eluaadi massikontsentratsioonist, kui eluaadi kontsentratsioon jõuab teatava aja järel platoole.

*Seadmed*

- Seadmestik koosneb mikrokolonnist (joonis 1), mida hoitakse konstantse temperatuuri juures. Mikrokolonn on ühendatud kas tsirkulatsioonpumbaga (joonis 2) või ühtlustava anumaga (joonis 3). Mikrokolonn sisaldab inertset kandjat, mida hoiab paigal väike klaasvatikork, mis toimib ühtlasi ka osakeste filtrina. Võimalikud inertse kandjana kasutatavad materjalid on klaashelmed, diatomiit või muud inertsed materjalid.
- Joonisel 1 kujutatud mikrokolonn sobib töötamiseks koos tsirkulatsioonpumbaga. Kolonnil on tühi ülaosa, mille maht on viis statsionaarse faasi mahtu (mis visatakse ära eksperimendi alguses) ja viis proovi ruumala (mis võetakse analüüsimiseks katse käigus). Seda vaba ruumi võib ka vähendada, kui lisandite kõrvaldamiseks kasutatava viie statsionaarse faasi mahu eluaadi asemele saab katse ajal lisada süsteemi vett. Kolonn on inertsest materjalist toru abil ühendatud tsirkulatsioonpumbaga, mille pumpamiskiirus on ligikaudu 25 ml/h. Tsirkulatsioonpump võib olla näiteks peristaltiline või membraanpump. Tuleb jälgida, et toru materjal ei põhjustaks saastumist ega adsorptsiooni.
- Joonisel 3 on skemaatiliselt kujutatud tüüpiline ühtlustava anumaga süsteem. Selles süsteemis on mikrokolonn varustatud ühekäigukraaniga. Ühendamiseks ühtlustava anumaga on kasutatud klaaslihvühendust ja inertsest materjalist valmistatud voolikut. Lahuse ühtlustavast anumast välja voolamise kiirus peaks olema ligikaudu 25 ml/h.

▼ M4

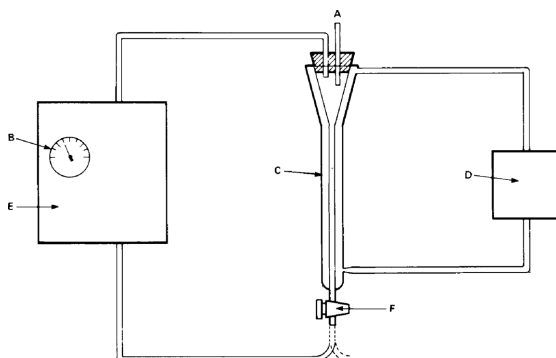
Joonis 1



Mõõtmed millimeetrites

- A. Lihvmuhv lihühenduse jaoks
- B. Vaba ruum kolonni peas
- C. Sisediaameeter 5 mm
- D. Välisdiameeter 19 mm
- E. Klaasvatist kork
- F. Kraan

Joonis 2

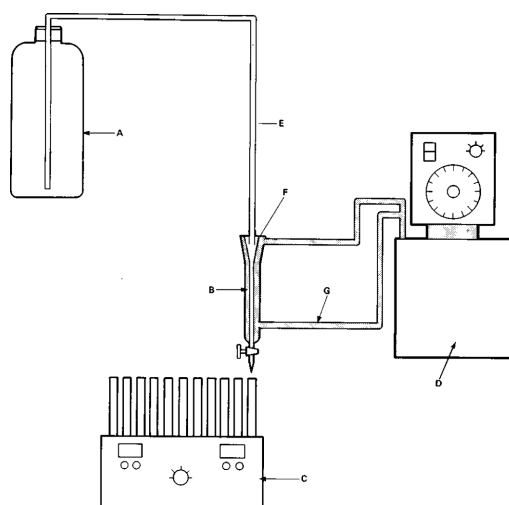


- A. Tasakaalustamine atmosfääri rõhuga
- B. Voolumõõtur
- C. Mikrokolonn
- D. Termostateeritud tsirkulatsioonpump
- E. Tsirkulatsioonpump
- F. Kahekäigukraan proovide võtmiseks



▼ **M4**

Joonis 3



- A. Ühtlustav anum (nt 2,5 l kolb)
- B. Kolonn
- C. Fraktsioonikoguja
- D. Termostaat
- E. Teflonvoolik
- F. Klaasliühendus
- G. Veevoolik termostaadi ja kolonni vahel (sisediameter ligikaudu 8 mm)
13. Ligikaudu 600 mg tugimaterjali kantakse 50 ml ümarkolbi. Sobiv kogus uuritavat ainet lahustatakse kergesti lenduvas analüüsireaktiivi puhtusklassiga lahustis ja sobiv kogus seda lahust lisatakse tugimaterjalile. Selleks et vältida jaotumist tugiaine pinnal ja saavutada elueerimisetapil tugiaine küllastumine veega, eemaldatakse lahusti täielikult, näiteks pöördaurusti kasutamise. Kaetud tugimaterjali lastakse kaks tundi seista ligikaudu 5 ml vees ja seejärel viiakse suspensioon mikrokoloni. Teise võimalusena võib kuiva kaetud tugimaterjali kallata veega täidetud mikrokoloni ja lasta sel kaks tundi tasakaalustuda.
14. Tugimaterjali katmine uuritava ainega võib tekitada probleeme, mille tõttu saadakse valed tulemused, näiteks kui uuritav aine sadestub tugiainele õlina. Selliseid probleeme tuleks uurida ja katseprotokollis tuleks esitada üksikasjad.

*Mõõtmine tsirkulatsioonpumba kasutamisega*

15. Kolonni hakatakse voolutama. Soovitatav on kasutada ligikaudset voolukiirust 25 ml/h, mis kirjeldatud kolonni puhul tähendab kümnet kolonni stationaarse faasi mahtu tunnis. Vähemalt esimesed viis stationaarse faasi mahtu visatakse ära, et eemaldada voolutamise vees lahustuvad lisandid. Seejärel lastakse tsirkulatsioonpumbal töötada tasakaalu saabumiseni, st senikaua, kuni viie järjestikuse proovi kontsentratsioonide erinevused on juhuslikud ega ületa  $\pm 30\%$ . Nende proovide vahelised ajavahemikud peaksid vastama ajale, mis kulub vähemalt kümne stationaarse faasi mahu eluendi voolamiseks läbi kolonni. Analüüsimeetodist olenevalt võib olla parem koostada graafik kontsentratsiooni sõltuvuse kohta ajast, millelt on näha tasakaalu saabumist.

**▼ M4***Määramine ühtlustava anuma kasutamisega*

16. Tuleks koguda järjestikuseid eluaadifraktsioone ja analüüsida neid valitud meetodi abil. Aine lahustuvus vees määratakse eluaadi keskjooksust nende fraktsioonide põhjal, mille kontsentratsioonid jäävad vähemalt viie järjestikuse proovi kestel konstantseks ( $\pm 30\%$ ).
17. Eelistatud voolutuskeskkond on bidestillieritud vesi. Kasutada võib ka deioniseeritud vett, mille takistus on üle 10 megaoomi/cm ja orgaanilise süsiniku sisaldus alla 0,01 %.
18. Kummagi meetodi puhul tehakse teine voolutamine poole väiksema voolukiirusega kui esimene. Kui kahe voolutamise tulemused on kooskõlas, on katse tehtud rahuldavalt. Kui väiksema voolukiiruse juures on mõõdetud lahustuvus suurem, tuleb voolukiiruse poole võrra vähendamist jätkata seni, kui kahe järjestikuse voolutamise saadakse ühesugune lahustuvus.
19. Mõlema meetodi puhul tuleb Tyndalli efekti kasutamisega kontrollida, et fraktsioonid ei sisaldaks kolloidset ainet. Kolloidosakeste olemasolu korral katse tulemusi ei arvestata ja katset korratakse kolonniga, mille filtrivad omadused on paremad.
20. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

**Kolvimeetod***Põhimõtte*

21. Aine (tahke aine peab olema peenestatud) lahustatakse vees katsetemperatuurist mõnevõrra kõrgemal temperatuuril. Küllastumise saavutamisel segu jahutatakse ja hoitakse katsetemperatuuril. Mõõtmist võib alustada ka kohe katsetemperatuuril, kui sobivate proovide võtmisega on näidatud, et küllastusakaal on saavutatud. Seejärel määratakse sobiva analüüsimeetodi (3) abil aine massikontsentratsioon vesilahuses, mis ei tohi sisaldada lahustumata osakesi.

*Seadmed*

22. Vaja on järgmisi materjale:

- tavalised labori klaasnõud ja seadmed;
- seade lahuse segamiseks konstantsel termostaaditemperatuuril;
- emulsiooni korral võib vaja minna tsentrifuugi (eelistatult termostateeritud), ning
- analüüsiseadmed.

*Katse läbiviimise kord*

23. Soovitav ruumala vee küllastamiseks vajalik uuritava aine kogus hinnatakse eeluringu abil. Võetakse kolm klaaskorgiga klaasnõu (nt tsentrifuugiklaasid või kolvid) ja kaalutakse igatühte umbes viiekordne eespool osutatud ainekogus. Igasse nõusse lisatakse teatav kogus vett; veekogus valitakse vastavalt analüüsimeetodile ja lahustuvuse vahemikule. Nõud suletakse tihedalt korgiga ja seejärel segatakse temperatuuril 30 °C. Kasutada tuleks konstantsel temperatuuril töötavat loksutit või segajat, nt magnetsegajat termostateeritud veevanniga. Ühe päeva pärast võetakse üks nõu ja tasakaalustatakse seda 24 h katsetemperatuuril aeg-ajalt loksutades. Nõu sisu tsentrifugeeritakse seejärel katsetemperatuuril ja määratakse siis sobiva analüüsimeetodi

**▼ M4**

abil uuritava aine kontsentratsioon selges veefaasis. Sama korratakse ülejäänud kahe nõuga vastavalt kahe- ja kolmepäevase 30 °C juures eelneva tasakaalustamise järel. Kui vähemalt kahes viimases nõus määratud kontsentratsioonid ei erine rohkem kui 15 %, on katse tehtud rahuldavalt. Kui esimese, teise ja kolmanda nõu mõõtmisel saadud tulemustes ilmneb kasvutendents, tuleb katset korrata pikemate tasakaalustamisaegadega.

24. Katse võib teha ka ilma eelneva inkubeerimiseta 30 °C juures. Küllastumistasakaalu saavutamise kiiruse hindamiseks võetakse proove senikaua, kuni mõõdetav kontsentratsioon enam ei sõltu segamise ajast.
25. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

**Analüütilised määramised**

26. Määramisel eelistatakse spetsiifilisi uuritava aine määramise meetodeid, kuna juba väike lisandikogus võib mõõdetud lahustuvuse väärtuses põhjustada suure vea. Sellised meetodid on näiteks gaas- või vedelikkromatograafia, tiitrimine, fotomeetria, voltameetria.

**ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed***Kolonn-elueerimismeetod*

27. Iga katse puhul tuleks välja arvutada vähemalt viie järjestikuse küllastusplaatool võetud proovi keskmine väärtus ja standardhälve. Eri voolukiiruste juures tehtud kahe katse keskmised väärtused ei tohiks erineda rohkem kui 30 %.

*Kolvimeetod*

28. Kolme kolvi määramisel saadud üksiktulemused, mis ei tohiks erineda üle 15 %, keskmistatakse.

**Katseprotokoll***Kolonn-elueerimismeetod*

29. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:
- eeluringu tulemused;
  - aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamisetapid, kui ainet puhastati);
  - iga proovi kontsentratsioon, voolukiirus ja pH;
  - iga katse kohta vähemalt viie küllastusplaatool võetud proovi keskmine väärtus ja standardhälve;
  - vähemalt kahe järjestikuse katse keskmine väärtus;
  - vee temperatuur küllastamise ajal;
  - analüüsimeetod;
  - kasutatud tugimaterjal;
  - tugimaterjali katmisega seotud andmed;
  - kasutatud lahusti;
  - andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;
  - kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

**▼ M4***Kolvimeetod*

30. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

- eeluuringu tulemused;
- aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamiseta, kui ainet puhastati);
- iga üksiku analüüsi tulemus ja tulemuste keskmine, kui ühe kolvi kohta tehti mitu mõõtmist;
- iga proovi pH väärtus;
- eri kolvidega saadud kooskõlaliste tulemuste keskvaartused;
- katsetemperatuur;
- analüüsimeetod;
- andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;
- kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

*KIRJANDUS*

- 1) Komisjoni direktiiv 92/69/EMÜ, 31. juuli 1992, millega seitsmeteistkümnendat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta (EÜT L 383, 29.12.1992, lk 113).
- 2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.
- 3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

**▼ B**

**A.8. JAOTUSTEGUR**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B**

A.9. **LEEKPUNKT**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B**

**A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B**

A.11. **SÜTTIVUS (GAASID)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.



**▼ B**

A.12. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼B****A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katsemeetod on kohaldatav tahketele ja vedelatele ainetele, mis väikestes kogustes toatemperatuuril (u 20 °C) õhuga kokku puutudes lühikese aja jooksul iseeneslikult süttivad.

Katsemeetod ei hõlma aineid, mis peavad iseeneslikuks süttimiseks toatemperatuuril või kõrgemal temperatuuril õhuga kokku puutuma mitu tundi või päeva.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Ained loetakse isesüttivateks, kui need süttivad või söestuvad punktis 1.6 kirjeldatud tingimustel.

Vedelike isesüttivust võib vaja olla kontrollida ka meetodi A.15 „Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid)” kohaselt.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Nimetamata.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Tahke aine või vedelik kantakse inertssele tugiainele ja viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui vedelik sellistes tingimustes ei sütti, imetakse see filterpaberisse ja viiakse toatemperatuuril (u 20 °C) viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui tahke aine või vedelik süttib või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi, loetakse aine isesüttivaks.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Korratavus: kuna ohutus on oluline, loetakse aine isesüttivaks juba siis, kui üks tulemus on positiivne.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Seade**

Umbes 10 cm läbimõduga portselantass täidetakse toatemperatuuril (u 20 °C) umbes 5 mm kõrguselt diatomiitmullaga.

Märkus

Diatomiitmulla või mis tahes muu saadaval oleva võrreldava inertse ainega simuleeritakse mulda, millesse testaine õnnetusjuhtumi korral võib voolata.

Inertsel kandjal õhuga kokku puutudes mittedüttivate vedelike testimiseks on vaja filterpaberit.

**▼B**1.6.2. **Katse tegemine**a) *Pulbrilised tahked ained*

1–2 cm<sup>3</sup> uuritavat pulbrit valatakse u 1 m kõrguselt mittedüütvale pinnale ja jälgitakse, kas aine süttib kukkumisel või mahalangemisest viie minuti jooksul.

Katset korratakse kuus korda, kui aine enne ei sütti.

b) *Vedelikud*

U 5 cm<sup>3</sup> uuritavat vedelikku valatakse ette valmistatud portselantassi ja jälgitakse, kas aine süttib viie minuti jooksul.

Kui aine kuue katse jooksul ei sütti, tuleb teha järgmised katsed:

0,5 ml testaine proov viiakse süstla abil sälgustatud filterpaberile ja jälgitakse, kas filterpaber süttib või söestub viie minuti jooksul vedeliku lisamisest. Katset korratakse kolm korda, kui paber enne ei sütti ega söestu.

2. **ANDMED**2.1. **TULEMUSTE KÄSITLEMINE**

Katsed võib peatada kohe pärast positiivse tulemuse saamist mis tahes katses.

2.2. **HINDAMINE**

Kui aine süttib viie minuti jooksul pärast inertsele tugiainele kandmist ja õhu kätte viimist või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi viie minuti jooksul pärast lisamist ja õhu kätte viimist, loetakse aine isesüttivaks.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (koostist ja lisandeid);
- katsete tulemusi;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

4. **VHITED**

1. NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.
2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

**▼B****A.14. PLAHVATUSOHTLIKKUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetod näeb ette katseskeemi, mille abil kontrollitakse, kas tahke või pastataoline aine on plahvatusohtlik kokkupuutel leegiga (termiline tundlikkus), löögi või hõõrdumise mõjul (mehaaniline tundlikkus) ja kas vedelik on leegi või löögi mõjul plahvatusohtlik.

Meetod koosneb kolmest osast:

- a) termilise tundlikkuse katse (1);
- b) mehaanilise tundlikkuse katse löögi suhtes (1);
- c) mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes (1).

Meetodi abil saadakse andmeid teatavate tavapäraste mõjuritega seotud plahvatusohtu hindamiseks. Meetod ei ole mõeldud aine plahvatusohtlikkuse kontrollimiseks mis tahes tingimustes.

Meetod sobib ainega seotud plahvatusohtu (termilise ja mehaanilise tundlikkuse) määramiseks konkreetsetel direktiivis täpsustatud tingimustel. Meetodi puhul kasutatakse mitut tüüpi katseseadmeid, mis on laias rahvusvahelises kasutuses (1) ja mis annavad tavaliselt usaldusväärseid tulemusi. On selge, et meetod ei ole ammendav. Kirjeldatud seadmete asemel võib kasutada muid seadmeid eeldusel, et need on rahvusvaheliselt tunnustatud ja tulemused on piisavalt sarnased kirjeldatud seadmetel saadavate tulemustega.

Katseid ei ole vaja teha juhul, kui saadaval olevad termodünaamilised andmed (nt tekkesoojus, lagunemissoojus) ja/või teatavate funktsionaalrühmade (2) puudumine struktuurivalemis tõestavad põhjendatud kahtluseta, et toimeaine ei lagune kiirelt gaaside või soojuse eraldumisega (st materjal ei ole plahvatusohtlik). Mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes ei ole vedelike puhul nõutav.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Lõhkeaine

Ained, mis võivad leegi mõjul plahvatada või on kirjeldatud seadmes löögi- või hõõrdetundlikud (või on muus seadmes suurema mehaanilise tundlikkusega kui 1,3-dinitrobenseen).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

1,3-dinitrobenseen, tehniline kristalne saadus, läbib 0,5 mm sõela, hõõrdumis- ja löögimeetoditele.

Perhüdrol-1,3,5-trinitro-1,3,5-triasiin (RDX, heksogeen, tsükloniit, CAS-i nr 121-82-4), kristallitud tsükloheksanooni vesilahusest, märgsõelutud läbi 250 µm sõela ja kinni peetud 150 µm sõelal, kuivatatud neli tundi 103 ± 2 °C juures, hõõrdumis- ja löögikatsete teise seeria jaoks.

**▼ B****1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Elkatsed on vajalikud kolme tundlikkuskatse tarvis ohutute tingimuste määramiseks.

**1.4.1. Käsitlemisohutuse katsed (3)**

Ohutuse huvides rakendatakse väga väikestele proovidele (u 10 mg) enne põhikatsete tegemist kuumutamist gaasileegis vabas õhus, lööke mis tahes tavapärastes seadmetes ja hõõrdumist vasara ja alasi vahel või mis tahes muus hõõrdumisseadmes. Selle eesmärk on kontrollida, kas aine on nii tundlik ja plahvatusohtlik, et ettenähtud tundlikkuskatsetel, eriti termilise tundlikkuse katsetel, tuleb katse tegija vigastamise vältimiseks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid.

**1.4.2. Termiline tundlikkus**

Meetodi puhul kuumutatakse ainet erinevas läbimõõdus düüsidega plaatidega suletud terashülsis, et kontrollida, kas aine võib tugeva kuumuse ja piiratud ruumala tingimustes plahvatada.

**1.4.3. Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**

Meetodi puhul antakse ainele kindlalt kõrguselt kukutatud kindla massiga löök.

**1.4.4. Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**

Meetodi puhul mõjutatakse tahkeid ja pastataolisi aineid standardtsel pinnal määratud koormuse ja suhtelise liikumise abil tekitatud hõõrdumisega.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Täpsustamata.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Termiline tundlikkus (leegi mõju)****1.6.1.1. Seade**

Seade koosneb ühekordselt kasutatavast terashülsist korduvkasutatava sulguriga (joonis 1), mis on paigutatud kaitsvasse kuumutusseadmesse. Kõik hülsid on valmistatud sügavtõmbamisel lehtterasest (vt liidet) ja on 24 mm sisediameetriga, 75 mm pikad ja 0,5 mm paksuse seinaga. Hülsidel on avatud otsas äärik hülsi sulgemiseks düüsigi plaadiga sulgurseadme abil. Sulgur koosneb keskel asuva düüsigi survekindlast plaadist, mis kaheosalise keermega liitmiku (mutter ja keermega võru) abil kindlalt hülsi külge kinnitatakse. Mutter ja keermega võru on valmistatud kroom-mangaanterasest (vt liidet), mis on sädemevaba kuni temperatuurini 800 °C. Düüsigi plaadid on 6 mm paksud, valmistatud kuumuskindlast terasest (vt liidet) ja neid on mitmesuguse avasuurusega.

**▼B**1.6.1.2. *Katsetingimused*

Tavaliselt uuritakse ainet töötlemata kujul, kuid mõningatel juhtudel, nt kui see on kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud, võib olla vaja see enne katsetusi purustada.

Tahkete ainete puhul määratakse katsetes kasutatav ainekogus kaheetapilisel proovitäitmisel. Kaalutud hülss täidetakse  $9\text{ cm}^3$  ainega ja tambitakse kogu hülsi ristlõike ulatuses avaldatava 80 N jõuga kokku. Ohutuse huvides või juhtudel, kus proovi füüsikaline olek võib surve mõjul muutuda, võib kasutada muid täitmismeetodeid; nt väga hõõrdetundliku aine puhul ei saa tampimist kasutada. Kui ainet on võimalik kokku suruda, lisatakse veel ainet ja jätkatakse tampimist, kuni hülss on täidetud 55 mm kauguseni üläärest. Määratakse hülsi 55 mm tasemeni täitmiseks vajalik ainekogus ja lisatakse veel kaks lisakogust, mis kumbki 80 N jõuga tampimisel tihendatakse. Seejärel ainet vastavalt vajadusele kas lisatakse ja tambitakse või eemaldatakse, nii et hülss täitub 15 mm kõrguseni üläärest. Järgmiseks tehakse teine proovitäitmine, alustades tambitud ainekogusega, mis moodustab kolmandiku esimesel proovitäitmisel leitud kogumassist. Lisatakse veel kaks lisakogust, mis 80 N jõuga tampimisel tihendatakse, ja ainekogus reguleeritakse lisamisel või eemaldamisel 15 mm kõrguseni üläärest. Teisel proovitäitmisel leitud ainekogust kasutatakse edasistes katsetes, täites hülsi kolmes võrdses osas, mis surutakse kokku ruumalani  $9\text{ cm}^3$  mis tahes selleks vajaliku jõuga. (Selleks võib abivahendina kasutada vaherõngaid).

Vedelikud ja geelid viiakse hülsi 60 mm kõrguseni, vältides geelide puhul hoolikalt õhuvahede teket. Keermega võru libistatakse altpoolt hülsi peale, paigaldatakse sobiv düüsiga plaat ja keeratakse mutter pärast molübdeendisulfiidmäärde lisamist kinni. Väga oluline on kontrollida, et ainet ei jääks ääriku ja plaadi või keermete vahele.

Kuumutamisel kasutatakse propaani rõhuregulaatori (60–70 mbar) ja voolumõõturiga tööstuslikust balloonist, millest gaas jagatakse jaotustoru kaudu ühtlaselt (kontrollitakse visuaalselt põletite leekide järgi) nelja põleti vahel. Põletid asetsevad ringikujuliselt ümber katsekambri, nagu on näidatud joonisel 1. Kolme põleti kogukulu on umbes 3,2 liitrit propaani minutis. Kasutada võib muid küttegaase ja põleteid, kuid kuumutamise kiirus peab vastama joonisel 3 täpsustatule. Kõigi seadmete puhul tuleb kuumutamise kiirust regulaarselt kontrollida, kasutades selleks dibütüülftaaladiga täidetud hülsse, nagu on näidatud joonisel 3.

1.6.1.3. *Katsete tegemine*

Iga katset sooritatakse hülsi purunemiseni või viie minuti möödumiseni kuumutamise algusest. Plahvatusega lõppenuks loetakse katse, mille tulemusel hülss puruneb kolmeks või enamaks tükiks, mis võivad omavahel olla kitsaste metalliribadega ühendatud, nagu on näha joonisel 2. Väiksema arvu tükkidega või purunemiseta lõppenud katset plahvatusega lõppenuks ei loeta.

**▼B**

Alguses tehakse kolm katsed 6,0 mm düüsiga plaadiga ja kui plahvatust ei toimu, tehakse teine kolmene katseseeria 2,0 mm düüsiga plaadiga. Kui kummaski katseseerias plahvatust ei toimu, pole edasised katsed vajalikud.

1.6.1.4. *Hindamine*

Katse loetakse positiivseks, kui kummaski eespool nimetatud katseseerias toimub plahvatus.

1.6.2. **Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**1.6.2.1. *Seade (joonis 4)*

Tüüpilise kukkuva vasaraga seadme põhiosa on valuterasest plokk aluse, alasi, posti, juhtrööbaste, kukkuvate raskuste, päästiku ja proovianumaga. 100 mm (läbimõõt) × 70 mm (kõrgus) terasalasi on kruvitud 230 mm (pikkus) × 250 mm (laius) × 200 mm (kõrgus) terasplokile valatud 450 mm (pikkus) × 450 mm (laius) × 60 mm (kõrgus) alusele. Tõmmatud terastorst liitekohtadeta post on kinnitatud terasploki tagaküljel olevasse fiksaatorisse. Seade on nelja kruviga ankurdatud monoliitsele 60 × 60 × 60 cm betoonplokile nii, et juhtrööpad on täiesti püstsuunalised ja kukkuv raskus langeb vabalt. Kasutada saab nii 5 kg kui ka 10 kg monoliitset terasest raskusi. Iga raskuse löökpea on valmistatud karastatud terasest, HRC 60–63, ja selle miinimumläbimõõt on 25 mm.

Uuritav proov on suletud löögiseadmesse, mis koosneb kahest koaksiaalsest, üksteise kohal paiknevast monoliitset terassilindrist õõnsas silindrilises terasjuhtvõrus. Monoliitsed terassilindrid peaksid olema läbimõõduga 10 (– 0,003, – 0,005) mm ja kõrgusega 10 mm ning poleeritud pinna, ümarate nurkadega (kõverusraadius 0,5 mm) ja kõvadusega HRC 58–65. Õõnessilindril peab olema 16 mm välisdiameeter, poleeritud 10 (+ 0,005, + 0,010) mm sisediameeter ja 13 mm kõrgus. Vahealasil (läbimõõt 26 mm ja kõrgus 26 mm) on paigaldatud terasest löögiseade, mille keskosas on tekkivaid gaase läbi laskva perforatsiooniga rõngas.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 40 mm<sup>3</sup> või muule seadmele sobiva mahuga. Tahkeid aineid tuleks uurida kuivana ja need ette valmistada järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga 0,5–1 mm ja see fraktsioon peab esindama töötlemata algainet.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana või vähemalt eemaldada eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist. Vedelikke testitakse 1 mm vahega alumise ja ülemise terassilindri vahel.

**▼ B**1.6.2.3. *Katsete tegemine*

Tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria, kukutades 10 kg raskust 0,40 m kõrguselt (40 J). Kui kuue katse jooksul 40 J juures toimub plahvatus, tuleb teha järgmine kuue katsega katseseeria, kukutades 5 kg raskust 0,15 m kõrguselt (7,5 J). Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.2.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseadmetega mis tahes katse plahvatus (põlema lahvamine ja/või paugatused on plahvatusega samaväärsed) või kui proov osutub muus löögikatses tundlikumaks kui 1,3-dinitrobenseen või RDX.

1.6.3. **Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**1.6.3.1. *Seade (joonis 5)*

Hõõrdeseade koosneb valatud terasest alusplaadist, millele on paigaldatud hõõrdeseade. Viimane koosneb fikseeritud portselanpulgast ja liikuvast portselanplaadist. Portselanplaat asub kahel juhtrööpal jooksval kelgul. Kelk on ühendusvarda, ekstsentrilise nuki ja sobiva ülekande abil ühendatud elektrimootoriga nii, et portselanplaati liigutatakse portselanpulga all ainult üks kord 10 mm ulatuses edasi-tagasi. Portselanpulgale rakendatav jõud võib olla 120–360 N.

Tasased portselanplaadid on valmistatud valgest tehnilisest portselanist (jämedusega 9–32 µm) ja nende mõõtmed on 25 mm (pikkus) × 25 mm (laius) × 5 mm (kõrgus). Silindriline portselanpulk on samuti valmistatud valgest tehnilisest portselanist ja on 15 mm pikk, 10 mm läbimõõduga ja karestatud ümarate otsapindadega, mille kõverusraadius on 10 mm.

1.6.3.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 10 mm<sup>3</sup> või muule seadmele sobiva mahuga.

Tahkeid aineid uuritakse kuivana ja nad valmistatakse ette järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga < 0,5 mm.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana. Kui pastast ei ole kuiva ainet võimalik valmistada, testitakse pastat (eemaldades eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist) 0,5 mm paksuse, 2 mm laiuse ja 10 mm pikkuse, šablooni abil tekitatud kihina.



**▼B**1.6.3.3. *Katsete tegemine*

Portselanpulk viiakse uuritava proovi kohale ja rakendatakse koormus. Katse ajal peavad karedad jooned portselanplaadil olema liikumissuunaga risti. Tuleb jälgida, et pulk toetuks proovile, et pulga all oleks küllaldane kogus testainet ja et plaat pulga all õigesti liiguks. Pastataolised ained kantakse plaadile 0,5 mm paksuse, 2 × 10 mm avaga šablooni abil. Portselanplaat peab portselanpulga all 0,44 sekundi jooksul 10 mm edasi ja tagasi liikuma. Iga plaadi ja pulga pinna osa võib kasutada ainult ühe korra; pulga mõlemat otsa võib kasutada kaheks katseks ja plaadi kumbagi külge kolmeks katseks.

360 N koormusega tehakse kuuest katsest koosnev katseseeria. Kui nende kuue katse käigus saadakse positiivne tulemus, tehakse 120 N koormusega veel üks kuuest katsest koosnev katseseeria. Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.3.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katse plahvatus (pragin ja/või paugatused või põlema lahvatamine on plahvatusega samaväärsed) või kui proov vastab muus hõõrdekatses võrdväärsetele tingimustele.

2. **ANDMED**

Aine loetakse direktiivi mõistes plahvatusohtlikuks juhul, kui termilise, löögi- või hõõrdetundlikkuse katses saadakse positiivne tulemus.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne;
- proovi füüsikalist olekut ja seda, kas seda on purustatud ja/või sõelutud;
- termilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt proovi massi, kildude arvu jne);
- mehaanilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt suure suitsukoguse teke või täielik lagunemine ilma paugatusete, leekide, sädemete, pragina jne esinemiseta);
- igat tüüpi katsete tulemusi;
- kui kasutatud on muid seadmeid, tuleb esitada teaduslik põhjendus ning tõendid tulemuste vastavuse kohta kirjeldatud seadmetel saadud tulemustega;

**▼B**

- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid kommentaare, nagu viiteid katsetele analoogsete ainetega;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

## 3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE JA HINDAMINE

Katsearuandes tuleb ära märkida kõik tulemused, mis loeti valeks, anomaalseks või mitterelevantseks. Kui mõnda tulemust ei arvestata, tuleb selle kohta lisada selgitus ja muude või täiendavate katsete tulemused. Kui anomaalsele tulemusele ei leitud seletust, tuleb seda arvestada täisväärtusliku tulemusena ja kasutada aine vastaval liigitamisel.

## 4. VIITED

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750- 60103-5,1990.
3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.
4. NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼B

Liide

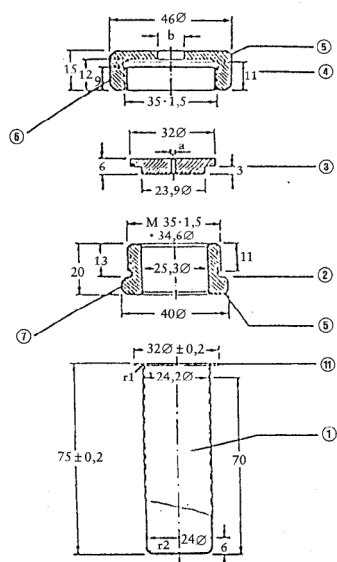
### Näitlik materjalide spetsifikatsioon termilise tundlikkuse katseks (vt DIN 1623)

- 1) Hülss: materjalispetsifikatsioon nr 1.0336 505 g
- 2) Düüsiga plaat: materjalispetsifikatsioon nr 1.4873
- 3) Keermega võru ja mutter: materjalispetsifikatsioon nr 1.3817

Joonis 1

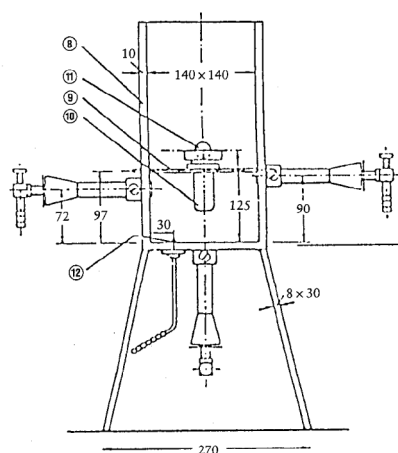
#### Termilise tundlikkuse katseade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 1a. Terashülss ja abivahendid

- (1) hülss
- (1a) välisäärik
- (2) keermega võru, madala hõõrdvusega keere
- (3) düüsiga plaat, läbimõõt  $a = 2,0$  või  $6,0$  mm
- (4) mutter, läbimõõt  $b = 10$  mm
- (5) ümardatud pind
- (6) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 41



Joonis 1b. Kaitsev kuumutusseade

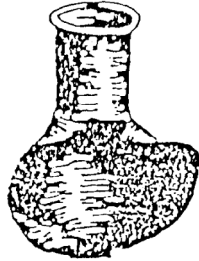
- (7) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 36
- (8) killunemiskindel kest
- (9) 2 tugivarrast hülssile
- (10) komplekteeritud hülss
- (11) tagumise põleti asukoht; ülejäänud põletid on nähtaval
- (12) süüteleek

▼B

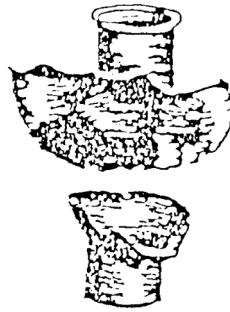
*Joonis 2*

**Termilise tundlikkuse katse**

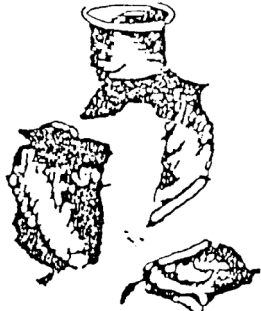
(purunemise näited)



Plahvatuseta purunemine



Plahvatuseta purunemine



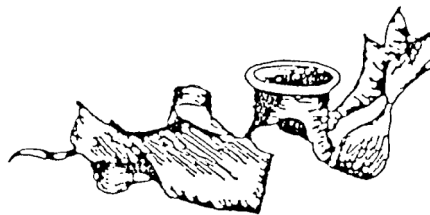
Plahvatuslega purunemine



Plahvatuslega purunemine



Plahvatuslega purunemine

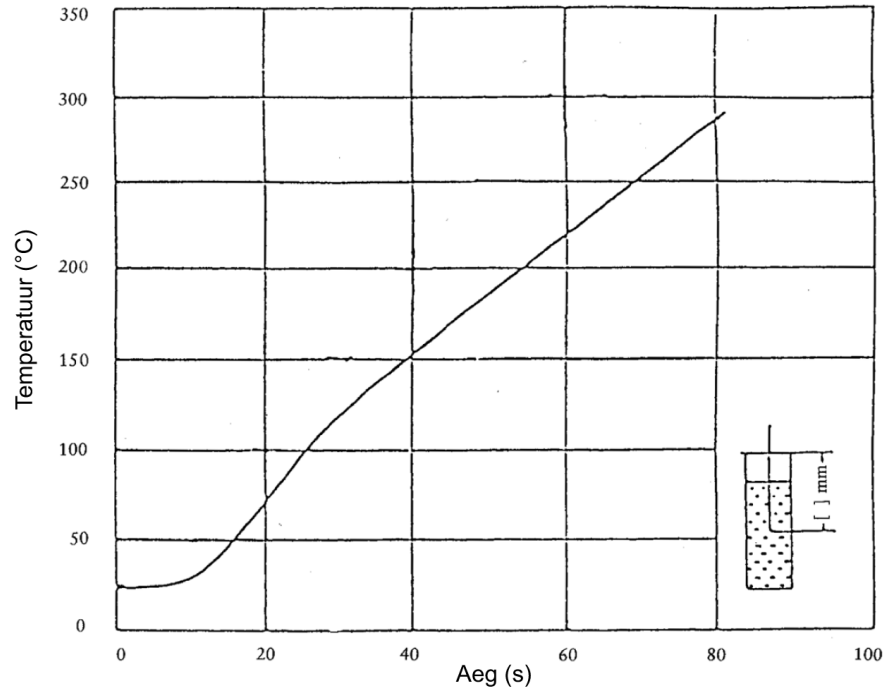


Plahvatuslega purunemine

▼B

Joonis 3

## Kuumutamiskiiruse kalibrimine termilise tundlikkuse katseks



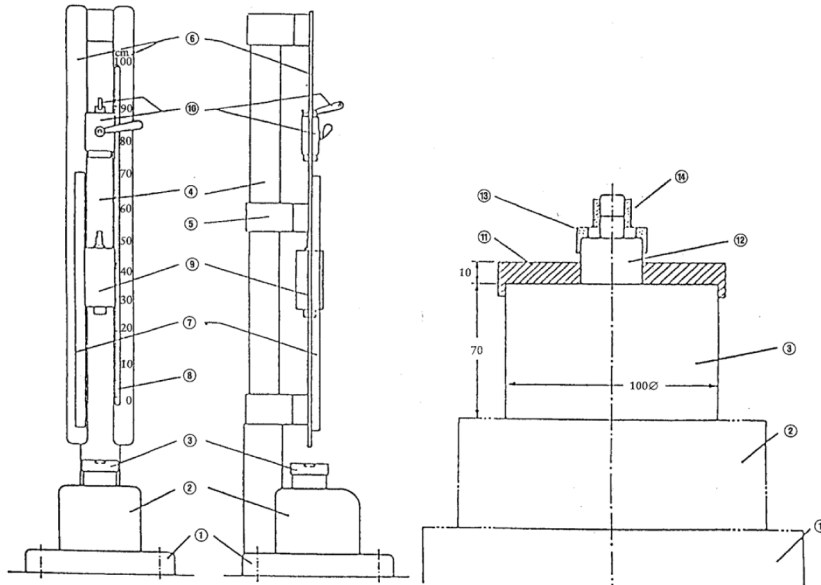
Temperatuuri/aja graafik 27 cm<sup>3</sup> dibutüülftalaadi kuumutamisel suletud (1,5 mm düüsisiga plaadiga) hülsis propaani voolukiirusel 3,2 l/min. Temperatuur määratakse 1 mm läbimõõduga roostevabast terasest kattega kromellist/alumellist termopaariga, mis on paigutatud mõõteseadme keskele 43 mm allapoole hülsi serva. Kuumutamise kiirus temperatuurivahemikus 135-285 °C peats olema 185-215 K/min.

▼B

Joonis 4

## Löögikitse seade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 4a. Langev vasar eest ja küljelt, üldvaade

Joonis 4b. Langev vasar, alumine osa

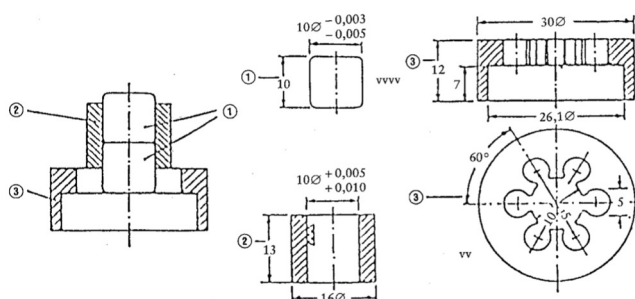
- (1) alus, 450 x 450 x 60
- (2) terasplokk, 230 x 250 x 200
- (3) alasi, 100 (diameeter) x 70
- (4) post
- (5) keskmine põiktala
- (6) 2 juhtrööbast
- (7) hammaslatt

- (8) jaotistega skaala
- (9) langev vasar (langev raskus)
- (10) fiksaator/päästikseade
- (11) juhtplaat
- (12) vahetatav vahealasi, 26 (diameeter) x 26
- (13) düüsidega juhtrõngas
- (14) löögiseade

▼B

Joonis 4

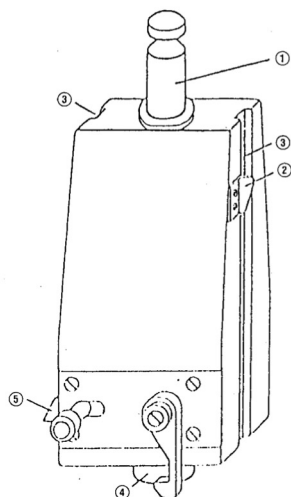
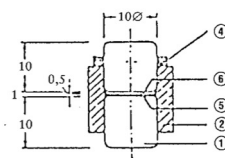
Jätk



Joonis 4c. Löögiseade pulbriliste või pastataoliste ainete jaoks

Joonis 4d. Löögiseade vedelike jaoks

- (1) terassilindrid
- (2) terassilindrite juhtvõru
- (3) düüsidega juhtrõngas
  - a) püstsuunaline läbilõige
  - b) pealtvaade
- (4) kummirõngas
- (5) vedelik (40 mm<sup>3</sup>)
- (6) vedelikuvaba ruum



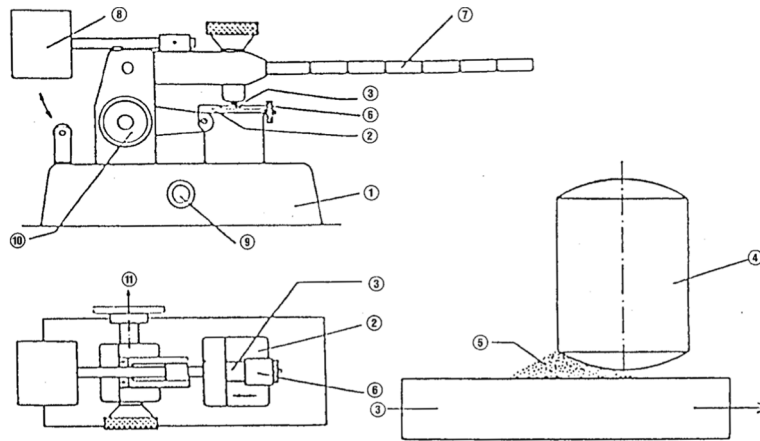
Joonis 4e. Vasar (langev 5 kg raskus)

- (1) riputusnagapulk
- (2) kõrgusemärgis
- (3) fikseeriv soon
- (4) silindriline löökpea
- (5) tagasikäigukonks

▼B

Joonis 5

## Hõõrdetundlikkuse katseseade



Joonis 5a Hõõrdeseade, eestvaade ja pealtvaade

Joonis 5b Pulga algsitsiooniproovil

- |   |   |
|---|---|
| (1) terasalus   | (6) pulgahoidja                         |
| (2) liikuv kelk                                       | (7) koormusõlg                          |
| (3) portselanplaat, 25 × 25 × 5 mm, kelgul            | (8) vastukaal                           |
| (4) fikseeritud portselanpulk, 10 (diameeter) × 15 mm | (9) lüliti                              |
| (5) uuritav proov, ligikaudu 10 mm <sup>3</sup>       | (10) ratas kelgu algasendisse viimiseks |
|   | (11) elektrimootori suund               |



**▼ B**

A.15. **ISESÜTTIMISTEMPERatuur (VEDELIKUD JA GAASID)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B**

A.16. **TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERA-  
TUUR**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B**

A.17. **OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

**▼ B****A.18. POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS****1. MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 118 (1996) koopia. Meetodi põhimõte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviites 1.

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mis kirjeldaks täpselt eraldamis- ja analüüsitingimusi, mis kataks kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja olukordi. Eelkõige on keeruliste polümeerisegude lahutamine geelkromatograafia abil sageli võimatu. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Muude standardite kasutamisel peab nende jaoks andma täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdisperssusega polüstüreeni proove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsimiseks võib osutada vajalikuks meetodis muudatuste tegemine.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Arvkeskmise molekulmassi  $M_n$  ja masskeskmise molekulmassi  $M_w$  arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

kus

$H_i$  on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsiooniruumala  $V_i$  jaoks,

$M_i$  on retentsiooniruumalale  $V_i$  vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja

$n$  on mõõtepunktide arv.

Molekulmassi jaotuse ulatus, mis iseloomustab segu disperssust, leitakse  $M_w/M_n$  suhtest.

**▼ B**

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenistandardeid, mille keskmised molekulmassid  $M_n$  ja  $M_w$  ning molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühesuguselt.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, polümetüül metakrülaati, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendada.

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafia abil võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse ( $M_n$ ,  $M_w$ ). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikkromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebaühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-absorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelikke molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenistandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

**▼B**

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse nõutav analüüsikorratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüstüreenis- perssused sõltuvad standardite molekulmassidest. Polüstüreenistand- dardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

( $M_p$  on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Polüstüreeni standardlahuste valmistamine

Polüstüreenistandardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkro- matograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruu- malad vahemikku 40 kuni 100  $\mu$ l, kui kolonni mõõdud on 30 cm  $\times$  7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasisid, kuid need ei tohiks ületada 250  $\mu$ l. Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

## 1.6.2. Proovilahuse valmistamine

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõudsed ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahydrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2  $\mu$ m.

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühendite- st. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasu- tama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.

## 1.6.3. Seadmed

— mahuti lahustile;

— degaseerija (vajaduse korral);

— pump;

**▼B**

- pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);
- injektioonisüsteem;
- kromatograafilised kolonnid;
- detektor;
- kulumõõtja (vajaduse korral);
- andmesalvesti ja -töötleja;
- nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

#### 1.6.4. Injektsiooni ja lahusti etteandmise süsteem

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

#### 1.6.5. Kolonn

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri analüüsiks kas ühte lihtsat kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

#### 1.6.6. Teoreetilised taldrikud

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mitte-polaarse lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmiste valemite põhjal:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{või} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

kus

$N$  = teoreetiliste taldrikute arv

$V_e$  = piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

**▼ B**

$W$  = piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$  = piigi laius poolel piigi kõrgusel

### 1.6.7. Lahutamise efektiivsus

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutamiseefektiivsus saadakse järgmisest valemist:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kus

$V_{e, M_x}$  = polüstireeni molekulmassiga  $M_x$  elutsiooniruumala

$V_{e,(10M_x)}$  = kümme korda suurema molekulmassiga polüstireeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõime defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kus

$V_{e1}, V_{e2}$  = kahe polüstireenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

$W_1, W_2$  = piigi laiused baasjoonel

$M_1, M_2$  = piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erineva kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

### 1.6.8. Lahustid

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetrahydofuraani puhtus on 99,5 %). Lahusti mahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

### 1.6.9. Temperatuurikontroll

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.



**▼ B**1.6.10. **Detektor**

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laiendamist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detekteerimiseks kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetriat. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muid detektsioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. **ANDMED**

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjaliste nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katsset. Neid katseid peab eraldi analüüsima.

Iga mõõtmise tulemused peavad hõlmama  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  ja  $M_p$  väärtusi. Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamise) esitatakse  $\log M_p$  väärtused (kus  $M_p$  on kalibreerimiseks kasutatava standardi piigi maksimum) ühe eeltoodud suuruse funktsioonina. Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpp-punkt määratakse kindlaks n-heksüülbenseeni või muu sobiva mittepolaarse soluudi abil. Arvkeskmised ja masskeskmised molekulmassid arvutatakse tavaliselt elektroonilise andmetöötusega, mis põhineb punktis 1.2 toodud valemitel. Kätsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalne sagedus või protsentide summa  $\log M$  funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

2.2. **ARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

**▼ B**

- Proovi eeltötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

**2.2.2. Seadmed**

- Eluendi mahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, ebapuhtused.
- Pump, pulsatsioonisummuti, injektioonisüsteem.
- Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).
- Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).
- Andmed piikide sümmeetria kohta.
- Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.
- Detektor (mõõtmise põhimõte, tüüp, küveti ruumala).
- Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).
- Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

**2.2.3. Süsteemi kalibreerimine**

- Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.
- Andmed selle meetodi kvaliteedikriteeriumite kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).
- Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus;
- Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:
  - proovi nimetus;
  - proovi tootja;
  - tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  ja  $M_w/M_n$  väärtused koos määramismetodi üksikasjadega;
  - süsteruumala ja -kontsentratsioon;

**▼ B**

- kalibreerimisel kasutatud  $M_p$  väärtus;
- piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;
- piigi maksimumile arvatud  $M_p$ ;
- arvatud  $M_p$  protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

**2.2.4. Hindamine**

- 1) Aja põhjal hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).
- 2) Teave selle kohta, kas hindamine viidi läbi elutsiooniruumala või retentsiooniaja põhjal.
- 3) Teave hindamise piiratuse kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.
- 4) Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.
- 5) Proovi ettevalmistamise ja eeltötluse protseduurid.
- 6) Lahustumatute osakeste olemasolu.
- 7) Süsteruumala ( $\mu\text{l}$ ) ja -kontsentratsioon ( $\text{mg/ml}$ ).
- 8) Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekaldumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.
- 9) Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.
  - Veapiiride üksikasjalikud andmed.
  - Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

**3. VIITED**

1. DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
2. Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
3. ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

**▼ B***Liide***Näited muudest meetoditest, mida kasutatakse polümeeride arvkeskmise molekulmassi ( $M_n$ ) määramisel**

Geelkromatograafia (GPC) on eelistatud meetod  $M_n$  määramiseks, eriti juhul, kui kättesaadav on standardite kogum, mille struktuur on võrreldav uuritava polümeeri struktuuriga. Kui geelkromatograafia kasutamisel on praktilist laadi raskused või olemasolevate andmete põhjal võib eeldada, et uuritav aine ei vasta esitatavatele  $M_n$  kriteeriumitele (vajab eelnevalt kinnitamist), siis on võimalik kasutada alternatiivseid meetodeid, näiteks järgmisi.

**1. Kolligatiivsete omaduste kasutamine****1.1. Ebullioskoopia/krüoskoopia**

Hõlmab lahusti keemistemperatuuri tõusu (ebullioskoopia) või külmumistemperatuuri alanemise (krüoskoopia) mõõtmist pärast polümeeri lisamist. Meetod põhineb sellel, et lahustunud polümeeri mõju keemis- või külmumistemperatuurile sõltub polümeeri molekulmassist (1, 2).

Rakendatavus:  $M_n < 20\,000$ .

**1.2. Aururõhu alandamine**

Hõlmab valitud võrdlusvedeliku aururõhu mõõtmist enne ja pärast teadaoleva koguse polümeeri lisamist (1, 2).

Rakendatavus:  $M_n < 20\,000$  (teoreetiliselt; praktikas siiski piiratud).

**1.3. Membraanosmomeetria**

Põhineb osmoosi põhimõttel, st tasakaalu saavutamiseks läbivad lahusti molekulid poolläbilaskvat membraani lahjemast lahusest kontsentreeritumasse lahusesse. Katses kasutatav lahja lahus on nullkontsentratsiooniga ja kontsentreeritud lahus sisaldab polümeeri. Läbi membraani tungiv lahusti tekitab rõhkude erinevuse, mis sõltub polümeeri kontsentratsioonist ja molekulmassist (1, 3, 4).

Rakendatavus:  $M_n$  vahemikus 20 000 – 200 000.

**1.4. Aurufaasi osmomeetria**

Hõlmab puhta lahusti aerosooli aurustumiskiiruse võrdlemist vähemalt kolme aerosooliga, mis sisaldavad uuritava polümeeri erinevaid kontsentratsioone (1, 2, 4).

Rakendatavus:  $M_n < 20\,000$ .

**▼ B****2. Lõpprühma alüüs**

Selle meetodi kasutamiseks on vajalik teada nii polümeeri üldist struktuuri kui ka ahela otsmiste rühmade keemilist koostist (mis peab olema eristatav põhiahelast näiteks NMR või tiitrimise/derivatiseerimise abil). Polümeeris esinevate otsmiste rühmade molekulaarse kontsentratsiooni määramise kaudu saab leida molekulmassi (7, 8, 9).

Rakendatavus:  $M_n$  kuni 50 000 (kahaneva usaldusväärsusega).

**3. Viited**

1. Billmeyer, F. W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
2. Glover, C. A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P. E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
3. ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25 to 52.
5. ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
6. Morris, C. E. M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
7. Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
8. Garmon, R. G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P. E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
9. Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

**▼B****A.19. MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS POLÜMEERIS****1. MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 119 (1996) koopia. Meetodi põhimõtte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviidetes.

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mille lahutamise- ja analüüsi tingimused katavad kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja iseärasusi. Sageli ei ole keeruliste polümeerisegude koostisosadeks lahutamine geelkromatograafiaga võimalik. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Kasutada võib ka muid standardeid, kui neile antakse täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdisperssusega polüstüreenproove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsil võib osutada vajalikuks meetodi muutmine.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Madal molekulmass on kokkuleppeliselt molekulmass, mis on väiksem kui 1 000 daltonit.

Arvkeskmise molekulmassi  $M_n$  ja masskeskmise molekulmassi  $M_w$  arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

kus

$H_i$  = on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsioonimahu  $V_i$  jaoks

$M_i$  = on retentsioonimahule  $V_i$  vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja  $n$  on mõõdepunktide arv

Molekulmassi jaotuse laius, mis iseloomustab segu disperssust, saadakse  $M_w/M_n$  suhtest.

**▼ B**

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenstandardeid, mille keskmised molekulmassid  $M_n$  ja  $M_w$  ja molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühtviisi.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katsele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, polümetüülmetakrülaati, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendada.

## 1.4. KATSE MEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafiaga võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse ( $M_n$ ,  $M_w$ ). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikkromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebaühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-adsorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelikke molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenstandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

**▼ B**

Nimetatud kõveralt saadakse madalmolekulaarsete ainete sisaldus. Arvutused saavad olla täpsed vaid siis, kui madala molekulmassiga ühendid annavad massi alusel detektorile samase signaali kui kogu polümeer.

## 1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse analüüsi nõutav korratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüstüreenpersused sõltuvad standardite molekulmassidest. Polüstüreenistandardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

( $M_p$  on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

## 1.6. MEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Polüstüreeni standardlahuste valmistamine

Polüstüreeni standardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkromatograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruumalad vahemikku 40 kuni 100  $\mu\text{l}$ , kui kolonni mõõdud on 30 cm  $\times$  7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasisid, kuid need ei tohiks ületada 250  $\mu\text{l}$ . Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

## 1.6.2. Proovilahuse valmistamine

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõuded ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahydrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2  $\mu\text{m}$ .

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühenditest. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasutama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.



**▼B****1.6.3. Parandused ebapuhtuste ja lisandite sisalduse jaoks**

Tavaliselt on vajalik molekulmassiga  $M < 1\,000$  ühendite sisalduse korrigeerimine, mis on tingitud mittepõlmeersetest komponentidest (näiteks ebapuhtused ja/või lisandid), välja arvatud juhul, kui nende ühendite mõõdetud sisaldus on niigi  $< 1\%$ . Selleks analüüsitakse otse polümeerilahust või geelkromatograafi eluaati.

Kui eluaat on pärast kolonni läbimist liiga lahja edasiseks analüüsiks, siis peab seda kontsentreerima. Vajalik võib olla eluaadi kuivaks aurutamine ja saadud jäägi uuesti lahustamine. Eluaati peab kontsentreerima tingimustel, mis ei põhjusta eluaadis muutusi. Geelkromatograafi eluaadi töötlemine sõltub kvantitatiivseks määramiseks kasutatavast analüütilisest meetodist.

**1.6.4. Seadmed**

Geelkromatograafia seadmed sisaldavad järgmisi komponente:

- mahuti lahustile;
- degaseerija (vajaduse korral);
- pump;
- pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);
- injektsioonisüsteem;
- kromatograafilised kolonnid;
- detektor;
- kulumõõtja (vajaduse korral);
- andmesalvesti ja-töötaja;
- nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

**1.6.5. Injektsiooni ja lahusti etteandmise süsteem**

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektsiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

**1.6.6. Kolonn**

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri iseloomustamiseks kas ühte kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

**▼ B****1.6.7. Teoreetilised taldrikud**

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mittepolaarset lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmiste valemite põhjal:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{või} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

kus

$N$  = on teoreetiliste taldrikute arv

$V_e$  = on piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

$W$  = on piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$  = on piigi laius poolel piigi kõrgusel

**1.6.8. Lahutamise efektiivsus**

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutuse efektiivsus saadakse järgmisest seosest:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kus

$V_{e, M_x}$  = on polüstireeni molekulmassiga  $M_x$  elutsiooniruumala

$V_{e,(10M_x)}$  = on kümme korda suurema molekulmassiga polüstireeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõimet defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kus

$V_{e1}, V_{e2}$  = on kahe polüstireenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

$W_1, W_2$  = on piigi laiused baasjoonel

$M_1, M_2$  = on piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erineva kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

**▼ B****1.6.9. Lahustid**

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetra-hüdrofuraani puhtus on 99,5 %). Lahustimahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

**1.6.10. Temperatuurikontroll**

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.

**1.6.11. Detektor**

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laiendamist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detektorina kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetriat. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muud tüüpi detektsioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

**2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. ANDMED**

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjalike nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katset. Neid katseid peab eraldi analüüsima. Kõikidel juhtudel on oluline arvestada ka pimekatse andmeid, mis on tehtud prooviga samadel katsetingimustel.

Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamise) esitatakse  $\log M_p$  väärtused (kus  $M_p$  on kalibratsioonistandardi piigi maksimum) ühe järgnevalt toodud suuruse funktsioonina:  $M_n$ ,  $M_w$  või  $M_w/M_n$ . Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpppunkt määratakse kindlaks n-heksüülbenseeni või muu sobiva mittepolarse soluudi abil. Kõvera osa, mis vastab molekulmassidele alla 1 000, analüüsitakse ja parandatakse ebapuhustuste ja lisandite suhtes. Elutsioonikõveraid analüüsitakse tavaliselt elektrooniliste andmetöötluse vahenditega. Käsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

**▼B**

Juhul, kui mis tahes lahustumatu polümeer jääb kolonni, siis on selle molekulmass tõenäoliselt suurem kui mis tahes komponendi oma lahustavas fraktsioonis ja selle arvesse võtmata jätmisel hinnatakse üle madala molekulmassiga komponentide sisaldust. Madala molekulmassiga komponentide sisalduse määramise parandusjuhised lahustumatu polümeeri jaoks on toodud lisas.

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalne sagedus või protsentide summa  $\log M$  funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

**2.2. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

**2.2.1. Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

— Proovi eeltötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

**2.2.2. Seadmed**

— Eluendimahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, ebapuhtused.

— Pump, pulsatsioonisummuti, injektsioonisüsteem.

— Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).

— Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).

— Andmed piikide sümmeetria kohta.

— Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.

— Detektor (mõõtmispõhimõte, tüüp, küveti ruumala).

— Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).

— Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

**2.2.3. Süsteemi kalibreerimine**

— Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.

**▼ B**

- Andmed selle meetodi kvaliteedinõuete kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).
- Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus.
- Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:
  - proovi nimetus;
  - proovi tootja;
  - tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  ja  $M_w/M_n$  väärtused, koos määramismetodi üksikasjadega;
  - süsteruumala ja -kontsentratsioon;
  - kalibreerimisel kasutatud  $M_p$  väärtus;
  - piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;
  - piigi maksimumile arvatud  $M_p$ ;
  - arvatud  $M_p$  protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

**2.2.4. Andmed madalamolekulaarse polümeeri sisalduse kohta**

- Analüüsimeetodite kirjeldus ja katsete tegemise viis.
- Madalamolekulaarsete komponentide protsentuaalne sisaldus (massi järgi) võrreldes kogu prooviga.
- Andmed ebapuhtuste, lisandite ja muude mittepolümeersete komponentide kohta massiprotsendina kogu proovist.

**2.2.5. Hindamine**

- Retentsioonija järgi hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).
- Teave selle kohta, kas hinnati elutsiooniruumala või retentsioonija põhjal.
- Teave hindamise piiratuse kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.
- Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.
- Proovi ettevalmistamise ja eeltöötuse protseduurid.
- Lahustumatute osakeste olemasolu.

**▼ B**

- Süsteruumala ( $\mu\text{l}$ ) ja -kontsentratsioon (mg/ml).
- Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekaldumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.
- Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.
- Veapiiride üksikasjalikud andmed.
- Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

3.

**VIITED**

1. DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
2. Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
3. ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

**▼ B***Liide***Madala molekulmassiga komponentide sisalduse parandamise juhised lahustumatu polümeeri olemasolul**

Proovis sisalduv lahustumatu polümeer põhjustab massikadu geelkromatograafilises analüüsis. Lahustumatu polümeer jääb pöördumatult kolonni või proovi ettevalmistamisel kasutatud filtrile, kuid proovi lahustuv osa läbib kolonni. Kui polümeeri refraktsiooniindeksi juurdekasvu ( $dn/dc$ ) saab hinnata või mõõta, siis on võimalik hinnata proovi massikadu kolonnis. Sellisel juhul kasutatakse paranduse tegemiseks välist kalibreerimist teadaoleva kontsentratsiooniga ja  $dn/dc$  väärtusega standardainetega, et kalibreerida refraktomeetri signaali. Järgnevas näites kasutatakse polü(metüülmetakrülaat) (pMMA) standardit.

Akrüülpolümeeride analüüsil välise kalibreerimise saamiseks viiakse geelkromatograafi teadaoleva kontsentratsiooniga pMMA standardi lahuse tetrahydrofuraanis ja saadud andmeid kasutatakse refraktomeetri konstandi leidmiseks järgmise valemi põhjal:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kus

K = refraktomeetri konstant (mikrovoltsekund/ml)

R = pMMA standardi signaal (mikrovolt/sekund)

C = pMMA standardi kontsentratsioon (mg/ml)

V = süsteruumala (ml) ja  $dn/dc$  pMMA lahuse tetrahydrofuraanis refraktsiooniindeksi juurdekasv (ml/mg)

Järgmised andmed on tüüpilised pMMA standardi jaoks:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

$dn/dc = 9 \times 10^{-5}$  ml/mg

Saadavat K väärtust,  $3,05 \times 10$ , kasutatakse teoreetilise detektori signaali arvutamiseks, kui 100 % süstitud polümeerist elueerus läbi detektori.

**▼ B**

A.20. **POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.



**▼ B**

A.21. **OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod või muud asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 1.

▼ **M1****A.22. KIUDUDE PIKKUSE JÄRGI KAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMINE DIAMEETER****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

See meetod kirjeldab protseduuri lahtiste keemiliste mineraalkiudude (MMMF, *Man Made Mineral Fibres*) pikkuse järgi kaalutud geomeetrilise keskmise diameetri (LWGMD, *Length Weighted Geometric Mean Diameter*) mõõtmiseks. Kuna kogumi LWGMD on 95 % tõenäosusega proovi 95 % usalduspiiride vahel (LWGMD  $\pm$  kaks standardviga), asub esitatud väärtus (testväärtus) proovi madalamal 95 % usalduspiiril (st LWGMD – kaks standardviga). Meetod põhineb 1994. aasta juunis uuendatud HSE tööstusprotseduuri kavandil, mis kooskõlastati ECFIA ja HSE kohtumisel Chesteris 26. septembril 1993 ja mida arendati edasi teise laboritevahelise katse jaoks ja selle põhjal (1, 2). Seda mõõtmismeetodit saab kasutada selliste lahtiste ainete või toodete kiudiametri iseloomustamiseks, mis sisaldavad MMMFisid, kaasa arvatud tulekindlad keraamilised kiud (RCF, *refractory ceramic fibres*), keemilised klaaskiud (MMVF, *man-made vitreous fibres*), kristallilised ja polükristallilised kiud.

Pikkuse järgi kaalumise on viis kompenseerida diameetri jaotumist, mida põhjustab pikkade kiudude murdumine materjalist proovi võtmisel või materjali käsitlemisel. Geomeetrilist statistikat (geomeetrilist keskmist) kasutatakse MMMFide diameetri suuruse järgi jaotumise mõõtmiseks, kuna nende diameetrite jaotus suuruse järgi on tavaliselt lähedane logaritmilisele normaaljaotusele.

Nii pikkuse kui diameetri mõõtmine on tüütu ja aeganõudev, aga kui mõõdetakse vaid neid kiudusid, mis puudutavad lõpmatult peenikest riba skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) vaateväljas, siis on antud kiu valimise tõenäosus võrdeline selle pikkusega. Kuna sellega võetakse arvesse pikkust pikkuse järgi kaalumise arvutustes, on ainus nõutav mõõtmine diameetri mõõtmine ja „LWGMD – kaks standardviga” võib arvutada kirjeldatud viisil.

**1.2. MÕISTED**

**Partikkel** – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe on vähem kui 3:1.

**Kiud** – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe (formaadisuhe) on vähemalt 3:1.

**1.3. RAKENDUSALA JA PIIRANGUD**

Meetod on mõeldud vaatlemaks diameetri jaotumisi, keskmise diameetriga alates 0,5  $\mu\text{m}$  kuni 6  $\mu\text{m}$ . Suuremaid diameetreid võib mõõta, kasutades väiksemaid SEMi suurendusi, kuid meetodi täpsus väheneb peenemate kiudude jaotuste puhul ja kui keskmine diameeter on alla 0,5  $\mu\text{m}$ , soovitatakse mõõtmist TEMiga (transmissiooni elektronmikroskoop).

**▼ M1**

## 1.4. Katsemeetodi põhimõte

Kiu kihist või lahtisest kiumassist võetakse mitu representatiivset südamikuproovi. Lahtiste kiudude pikkust vähendatakse purustava protseduuri abil ja representatiivne osaproov hajutatakse vees. Eraldatakse alikvoodid ja filtreeritakse need läbi 0,2 µm poorisuurusega polükarbonaadifiltri ja valmistatakse ette uurimiseks SEMi tehnikate abil. Kiu diameeter mõõdetakse 10 000-kordse või suurema ekraanis suurendusega, <sup>(1)</sup> kasutades erapooletu keskmise diameetri hinnangu andmiseks liini katkestamise meetodit. Arvutatakse madalam 95 % usaldusvahemik (mis põhineb ühepoolisel testil), et anda hinnang materjali kiudia meetri geomeetrilise keskmise väikseima väärtuse kohta.

## 1.5. Katsemeetodi kirjeldus

## 1.5.1. Turvalisus/ettevaatusabinõud

Isiklikku kokkupuudet õhus sisalduvate kiududega tuleks minimeerida ja kuivkiudude käsitsemisel tuleks kasutada tõmbekappi või laminaar-boksi. Kontrollmeetodite tõhususe kindlaksmääramiseks tuleks läbi viia korrapäraselt isikliku kokkupuute seiret. MMMFide käsitsemisel tuleb nahaärrituse vähendamiseks ja ristsaastumise ärahoidmiseks kanda ühekordselt kasutatavaid kindaid.

## 1.5.2. Seadmed/vahendid

- Press ja pressvormid (võimelised tekitama 10 MPa).
- 0,2 µm poorisuurusega polükarbonaat-kapillaarfiltrid (25 mm diameetriga).
- 5 µm poorisuurusega tselluloos-ester membraanifilter tugifiltrina kasutamiseks.
- Klaasist filtreermisseadmed (või ühekordselt kasutatavad filtreerimissüsteemid) 25 mm diameetriga filtritele (nt Millipore'i klaasist mikroanalüüsikomplekt, tüüp nr XX10 025 00).
- Värskest destilleeritud vesi, mis on mikroorganismide eemaldamiseks lastud läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri.
- Pihusti kuld- või kuld/pallaadiumotsaga.
- Skaneeriv elektronmikroskoop lahutamisevõimega kuni 10 nm ja 10 000-kordse suurendusega.
- Muu: spaatlid, tüüp 24, skalpellitera, pintsetid, SEMi torud, süsinikliim või süsinikteip, kolloidhõbe.
- Ultrahelisond või lauale asetatav ultrahelivann.
- Südamiku proovivõtuvahend või korgipuur südamikuproovide võtmiseks MMMFide kihist.

<sup>(1)</sup> See suurendusväärtus kehtib 3 µm kiu puhul, 6 µm kiu puhul võib 5 000-kordne suurendus olla sobivam.

**▼ M1****1.5.3. Katsemenetlus****1.5.3.1. Proovivõtmine**

Mineraalvilla ja villaku puhul kasutatakse ristlõikest proovide võtmisel 25 mm südamikuproovide võtmise vahendit või korgipuuri. Proovid peaksid olema võrdselt jaotatud kihi laiuse ulatuses või võetud suvalistest kohtadest, kui käepärast on pikki kihte. Samade vahendite abil on võimalik eraldada juhuslikke proove lahtisest kiust. Võimaluse korral tuleks ruumiliste variatsioonide peegeldamiseks lahtises materjalis võtta kuus proovi.

Kuus südamikuproovi purustatakse 50 mm läbimõõduga vormis 10 MPa juures. Materjal segatakse spaatliga ja pressitakse uuesti 10 MPa juures. Seejärel võetakse materjal vormist välja ja säilitatakse seda suletud klaaspudelis.

**1.5.3.2. Proovi ettevalmistamine**

Orgaanilist sideainet saab vajaduse korral eemaldada, asetades kiu umbes tunniks 450 °C sulatusahju.

Proovi jaotamiseks vormitakse see koonuseks ja lõigatakse see neljaks (seda tuleks teha tolmukapis).

Spaati abil lisatakse väike hulk (< 0,5 g) proovist 100 ml värskelt destilleeritud veele, mis on lastud läbi 0,2 µm membraaniga filtri (alternatiivina võib kasutada ultrapuhast vett muudest allikatest, kui need vastavad nõuetele). Proov hajutatakse põhjalikult ultrahelisondi abil 100 W võimsuse juures ja seda pööratakse nii, et tekiks kavitatsioon. (Kui sondi pole käepärast, kasutada järgmist meetodit: proovi raputatakse ja pööratakse korduvalt ümber 30 sekundi jooksul; hoitakse viis minutit lauale asetatavas ultrahelivannis; seejärel raputatakse ja pööratakse korduvalt veel 30 sekundi jooksul).

Kohe pärast kiu hajutamist eemaldatakse teatud arv alikvoote (näit kolm 3, 6 ja 10 ml alikvooti), kasutades laiasuulist pipetti (2–5 ml mahutavusega).

Iga alikvoot vaakumfiltreeritakse läbi 0,2 µm polükarbonaatfiltri, mida toetab 5 µm poorisuurusega MEC-tugifilter, kasutades 25 mm klaasist filterletrit silindrilise mahutiga. Umbkaudu 5 ml filtreeritud destilleeritud veest tuleks asetada lehrisse ja alikvoot aeglaselt vette pipettida, hoides pipetiotsa allpool meniskit. Peale pipettimist tuleb pipett ja veemahuti põhjalikult läbi loputada, kuna peenikesed kiud kipuvad jääma pinnale.

Filter eemaldatakse hoolikalt ja eraldatakse see tugifiltrist enne mahutisse kuivama asetamist.

▼ **M1**

Filtreeritud osast lõigatakse veerand või pool tüüp 24 skalpelliga edasi-tagasi liigutuste abil. Lõigatud osa kinnitatakse ettevaatlikult SEMi esemelaua külge süsinikeibi või süsinikliimi abil. Kolloidhõbedat tuleks lisada vähemalt kolme kohta, et parandada elektrilist kontakti filtri ja esemelaua äärtel. Kui liim/kolloidhõbe on kuiv, pihustada proovi pinnale umbes 50 nm kulla või kulla/pallaadiumi kiht.

1.5.3.3. *SEMi kalibreerimine ja kasutamine*1.5.3.3.1. *Kalibreerimine*

SEMi kalibreerimist tuleks kontrollida vähemalt kord nädalas (ideaaljuhul kord päevas), kasutades sertifitseeritud kalibreerimisvõret. Kalibreerimist tuleks kontrollida sertifitseeritud standardi alusel ja kui mõõdetud väärtus (SEM) ei jää  $\pm 2\%$  sisse sertifitseeritud väärtusest, siis tuleb SEM-kalibreerimist kohandada ja uuesti kontrollida.

SEM peaks olema võimeline lahendama vähemalt minimaalselt nähtava diameetri 0,2  $\mu\text{m}$ , kasutades tegelikku proovimaatriksit, 2 000-kordse suurendusega.

1.5.3.3.2. *Kasutamine*

SEM peaks töötama 10 000-kordse suurenduse<sup>(1)</sup> juures tingimustel, mis annavad hea lahutusvõime lubatava kujutise aeglasel skaneerimiskiirusel, näiteks 5 sekundit kaadri kohta. Kuigi erinevate SEMide kasutamissoodused võivad varieeruda, tuleks suhteliselt väikese aatommassiga materjalide korral üldiselt parima nähtavuse ja resolutsiooni saavutamiseks kasutada kiirendavat pinget 5–10 keV, väikest laotuspunkti seadistust ja lühikest töökaugust. Lineaarse skaneerimise puhul tuleb kasutada 0° kallet, et minimeerida refokuseerimine, või kui SEMil on võimalik kohaldada kõrgust, tuleks kasutada kohaldatud kõrgusega töökaugust. Võib kasutada väiksemat suurendust, kui materjal ei sisalda väikseid (väikese diameetriga) kiude ja kiudude diameeter on suur ( $> 5 \mu\text{m}$ ).

1.5.3.4. *Suuruse järgi sorteerimine*1.5.3.4.1. *Väikese suurendusega uurimine proovi hindamiseks*

Algselt tuleks proovi uurida väikese suurendusega, et otsida tõendust suurte kiudude pundarde kohta ning hinnata kiutihedust. Juhul kui moodustub liiga palju puntraid, on soovitatav ette valmistada uus proov.

Statistilise täpsuse jaoks on vaja mõõta miinimumarv kiude ja suur kiutihedus võib tunduda soovitatav, kuna tühjade väljade uurimine on aeganõudev ega oma analüüsi jaoks väärtust. Kui aga filter on üle koormatud, muutub kõigi mõõdetavate kiudude mõõtmine siiski raskeks, ja kuna väikesed kiud võivad jääda suuremate varju, võivad need jääda kahe silma vahele.

<sup>(1)</sup> 3  $\mu\text{m}$  kiudude korral vt eelmist märkust.

▼ **M1**

Kalduvus LWGMD ülehindamisele võib tuleneda kiutihedustest enam kui 150 kiudu millimeetri kohta lineaarse sammu puhul. Teisest küljest pikendab väike kiukontsentratsioon analüüsi aega ja sageli on mõistlikum valmistada ette proov, mille kiutihendus on lähedasem optimaalsele, kui jätkata madala kontsentratsiooniga filtrite loendamist. Optimaalne kiutihendus peaks andma keskmiselt üks või kaks loendatavat kiudu vaatevälja kohta 5 000-kordse suurendusega. Siiski sõltub optimaalne tihedus kiudude suurusest (diameetrist), nii et on vajalik, et operaator kasutaks teatavat eksperdi hinnangut otsustamaks, kas kiu tihedus on optimaalse lähedane või mitte.

## 1.5.3.4.2. Kiu diameetri kaalumise pikkuse järgi

Loendatakse vaid kiude, mis puudutavad (lõpmatult) peenikest SEMi ekraanile tõmmatud joont (või lõikuvad sellega). Selleks on ekraani keskele tõmmatud horisontaalne (või vertikaalne) joon.

Alternatiivina võib ekraani keskele asetada üksiku punkti ja alustada pidevat skaneeringut ühes suunas üle filtri. Mõõdetakse ja salvestatakse iga sellise kiu diameeter, mille formaadisuhe on suurem kui 3:1 ja mis puudutab või ületab seda punkti.

## 1.5.3.4.3. Kiudude sorteerimine suuruse järgi

Soovitav on mõõta minimaalselt 300 kiudu. Iga kiudu mõõdetakse ainult korra ja selles punktis, kus ta lõikub kujutisele paigutatud joone või punktiga (või lõikumiskoha lähedal, kui kiu servad on hägused). Kui leidub ebaühtlase põiklõikega kiude, tuleks kasutada mõõtmist, mis vastab kiu keskmisele diameetrile. Hoolikas tuleb olla kiuservade määramisel ja nende vahelise lühima kauguse mõõtmisel. Sorteerimist võib läbi viia *on-line* või *off-line* salvestatud kujutistel või fotodel. Soovitatakse kasutada poolautomatiseeritud kujutise mõõtmise süsteeme, mis laadivad andmed otse arvutustabelisse, kuna need säästavad aega ja välistavad ümberkirjutusvead ning arvutusi on võimalik automatiseerida.

Pikkade kiudude otsi tuleks kontrollida väikese suurendusega, et välistada nende tagasikeerdumine mõõtmise vaatevälja ja tagada, et neid mõõdetakse ainult üks kord.

2. **ANDMED**2.1. **TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Kiudiameetritel ei esine tavaliselt normaaljaotust. Siiski on logaritmitseisenduse abil võimalik saavutada normaaljaotusele lähenev jaotus.

Arvutatakse  $n$  kiudiameetri ( $D$ ) naturaallogaritmide ( $\ln D$ ) aritmeetiline keskmine (keskmine  $\ln D$ ) ja standardhälve ( $SD_{\ln D}$ ).

$$\text{keskmine } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

**▼ M1**

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{keskmine } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardhälve jagatakse mõõtmiste arvu (n) ruutjuurega, et saada standardviga ( $SE_{\ln D}$ ).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Keskmisest lahutatakse kahekordne standardviga ja arvutatakse selle väärtuse eksponent (keskmine miinus kaks standardviga), et saada geometriline keskmine miinus kaks geometrilist standardviga.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{keskmine } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

**3. ARUANDMINE****KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks sisaldama vähemalt järgmist teavet:

- avaldise  $LWGMD - 2SE$  väärtus;
- mis tahes hälbed ja eriti need, mis võivad avaldada mõju tulemuste täpsusele, koos piisavate põhjendustega.

**4. VIITED**

- 1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Veebruar 1999.
- 2) G. Burdett ja G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼ **M4****A.23 JAOTUSKOEFIITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOL-VEESI):  
AEGLAISE SEGAMISE MEETOD****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 123 (2006). Aeglase segamise meetodiga saab täpselt määrata jaotuskoeffitsientide süsteemis 1-oktanol-vesi ( $P_{OW}$ ) kuni  $\log P_{OW}$  väärtuseni 8,2 (1). Sellepärast sobib see meetod väga hüdrofoobsete ainete  $P_{OW}$  otseseks katseliseks määramiseks.
2. Muud meetodid jaotuskoeffitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanol-vesi ( $P_{OW}$ ) on loksutatava kolvi meetod (2) ja  $P_{OW}$  määramine pööratud faasi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsioonija andmetest (3). Loksutatava kolvi meetod võib anda aga vale tulemuse, kuna veefaasi kanduvad üle mikroskoopilised oktanolii piisakesed. Mida suurem on  $P_{OW}$  väärtus, seda rohkem kiputakse veefaasis olevate oktanolii mikropiiskade tõttu ülehindama uuritava aine kontsentratsiooni vees. Sellepärast võib loksutatava kolvi meetodit kasutada ainult ainete puhul, mille  $\log P_{OW} < 4$ . Teine meetod põhineb otse määratud usaldusväärsel  $P_{OW}$  väärtustel, mida kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsioonija ja mõõdetud  $P_{OW}$  väärtuste vahelise seose kaliibrimiseks. Mõnda aega oli kättesaadav OECD katsejuhendi kavand (4) ioniseeruvate ainete jaotuskoeffitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanol-vesi, kuid seda meetodit enam ei kasutata.
3. Käesolev katsemeetod on välja töötatud Madalmaades. Siin kirjeldatud meetodite täpsust on kontrollitud ja optimeeritud laboritevaheliste võrdluskatsete uuringuga, milles osales 15 laborit (5).

**LÄHTEKAALUTLUSED****Olulisus ja kasutamine**

4. On kindlaks tehtud, et inertsete orgaaniliste ainete bioakumulatsioon kalades korreleerub väga tugevasti nende ainete jaotuskoeffitsiendiga süsteemis 1-oktanol-vesi ( $P_{OW}$ ). Lisaks on näidatud, et  $P_{OW}$  korreleerub kemikaalide toksilise mõjuga kaladele ning seostumisega tahkete ainetega, nagu pinnas ja setted. Ulatuslik ülevaade nendest seostest on esitatud publikatsioonis 6.
5. On kindlaks tehtud, et aine 1-oktanol-vee-süsteemi jaotuskoeffitsiendi ja muude omaduste vahel on palju keskkonnatoksikoloogia ja -keemia seisukohast olulisi seoseid. Sellepärast on jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktanol-vesi saanud tähtsaks parameetriks, mille abil hinnatakse kemikaalide keskkonnohtlikkust ja ennustatakse nende käitumist keskkonnas.

**Kasutusala**

6. Aeglane segamine peaks vähendama 1-oktanolii mikropiisakeste moodustumist veefaasis olevatest 1-oktanolii tilkadest. Sellega välditakse aine kontsentratsiooni ülehindamist veefaasis mikropiiskades leiduvate uuritava aine molekulide tõttu. Seepärast on aeglase segamise meetod eriti sobiv  $P_{OW}$  määramiseks ainetel, mille eeldatav  $\log P_{OW}$  väärtus on 5 või suurem ja mille puhul loksutatava kolvi meetod (2) võib anda vale tulemuse.



## ▼M4

## MÕISTED JA ÜHIKUD

7. Aine jaotuskoefitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktaanool) vahel iseloomustab kemikaali tasakaalulist jaotumist kahe faasi vahel. Aine jaotuskoefitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktaanool) vahel ( $P_{OW}$ ) on suhe, mis saadakse veega küllastunud 1-oktaanooli faasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooni ( $C_O$ ) jagamisel 1-oktaanooliga küllastunud veefaasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooniga ( $C_W$ ).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kuna jaotustegur on kontsentratsioonide suhe, on see mõõtühikuta suurus. Enamasti väljendatakse seda kümnendlogaritmi kujul ( $\log P_{OW}$ ).  $P_{OW}$  sõltub temperatuurist, sellepärast tuleb andmete esitamisel märkida ka mõõtmistemperatuur.

## MEETODI PÕHIMÕTE

8. Jaotuskoefitsiendi määramiseks tasakaalustatakse püsival temperatuuril omavahel vesi, 1-oktaanool ja uuritav aine. Seejärel määratakse uuritava aine kontsentratsioon mõlemas faasis.
9. Siin kirjeldatavas aeglase segamise katses on võimalik vähendada eksperimentaalseid raskusi, mida loksutatava kolvi katses põhjustab mikropiiskade tekkimine. Aeglase segamise katses tasakaalustatakse vesi, 1-oktaanool ja uuritav aine termostateeritavas ja segajaga varustatud katsenõus. Aine jaotumist faaside vahel kiirendab segamine. Segamine tekitab piiratud turbulentsi, mis kiirendab jaotumist 1-oktaanooli ja vee vahel, kuid seejuures ei teki mikropiisku (1).

## KATSE RAKENDATAVUS

10. Kuna lisandid võivad mõjutada uuritava aine aktiivsuskoeffitsienti, määratakse jaotuskoefitsient ainult puhta aine jaoks. 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise uurimisel tuleb kasutada müügilolevaid kõrgeima puhtusastmega kemikaale.
11. Käesolev meetod on rakendatav puhta aine korral, mis ei dissotsieeru, assotsieeru ega ole märkimisväärselt pindaktiivne. Meetodit võib kasutada selliste ainete ja nende segude 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise suhte määramiseks. Kui meetodit kasutatakse segu puhul, on määratav 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise suhe tinglik ja oleneb uuritava segu ning veefaasina kasutatava elektrolüüdi keemilisest koostisest. Täiendavate abinõude rakendamisel võib seda meetodit kasutada ka dissotsieeruvate või assotsieeruvate ühendite puhul (vt punkt 12).
12. Kuna dissotsieeruvate ainete, nagu orgaanilised happed, fenoolid, orgaanilised alused ja metallorgaanilised ühendid, jaotumisel 1-oktaanooli ja vee vahel kujuneb vees ja 1-oktaanoolis mitmeastmeline tasakaal, on jaotuskoefitsient süsteemis 1-oktaanool-vesi tinglik konstant, mis sõltub tugevasti elektrolüüdi koostisest (7, 8). Seega eeldab jaotuskoefitsiendi määramine süsteemis 1-oktaanool-vesi, et katse jooksul kontrollitakse pH väärtust ja elektrolüüdi koostist ning esitatakse need andmed. Nende jaotuskoefitsientide hinnangulise väärtuse saamiseks kasutatakse eksperdihindamist. Dissotsiatsioonikonstandi (-konstantide) alusel valitakse sobivad pH väärtused, et määrata iga ionisatsiooniastme jaotuskoefitsient. Metallorgaaniliste ühendite jaotumise uurimisel kasutatakse puhvreid, mis ei moodusta komplekse (8). Arvestades vesilahuste keemia andmeid (komplekside moodustumise tasakaalukonstandid, dissotsiatsioonikonstandid), valitakse katsetingimused nii, et oleks võimalik hinnata, millises vormis on uuritav aine veefaasis. Kõikide katsete puhul luuakse taustelektrolüüdi abil ühesugune ioonne jõud.

▼ **M4**

13. Vees vähe lahustuvate või suure  $P_{OW}$  väärtusega ainete jaotuskoeffitsiendi määramist võib raskendada see, et aine väikest kontsentratsiooni vees on raske täpselt määrata. Käesolevas metoodikas antakse juhendeid, kuidas seda probleemi lahendada.

**ANDMED UURITAVA AINE KOHTA**

14. Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad või veelgi kõrgema puhtusastmega. Uuritava aine soovitatakse kasutada teadaoleva keemilise koostisega vähemalt 99-protsendilise puhtusastmega radioaktiivse märgiseta aineid või teadaoleva keemilise koostise ja radiokeemilise puhtusastmega radioaktiivselt märgistatud aineid. Kui märgise poolestusaeg on lühike, tehakse isotoobi lagunemist arvestav parand. Radioaktiivse märgisega uuritava aine puhul tuleb ainespetsiifilise analüüsimeetodiga tõendada, et mõõdetav radioaktiivsus on otse seotud uuritava ainega.
15.  $\log P_{OW}$  hinnangu saamiseks võib kasutada müügilolevat  $\log P_{OW}$  hindamiseks ette nähtud tarkvara või kasutada kummaski lahustis lahustuvuste suhet.
16. Enne aeglase segamise katse korraldamist  $P_{OW}$  määramiseks peaks uuritava aine kohta teadma järgmist:
- struktuurivalem,
  - analüüsimeetodid, mis sobivad uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks vees ja 1-oktaanoolis,
  - ioniseeruva aine dissotsiatsioonikonstandid (OECD juhis 112 (9)),
  - lahustuvus vees (10),
  - abiootiline hüdrolüüs (11),
  - kiire biolagunduvus (12),
  - aururõhk (13).

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed ja aparatuur**

17. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:
- magnetsegajad ja tefloniga kaetud segamispulgad, mida kasutatakse veefaasi segamiseks;
  - analüüsiseadmed, mis võimaldavad määrata uuritava aine eeldatavaid kontsentratsiooni väärtusi;
  - katsenõu, mille põhja juures on kraan. Olenevalt  $\log P_{OW}$  hinnangulisest väärtusest ja uuritava aine avastamise lävest tuleb vajaduse korral kasutada suuremat kui üheliitrise mahuga, kuid samasuguse kujuga katsenõu, et saaks võtta piisava koguse vett uuritava aine keemiliseks eraldamiseks ja määramiseks. Nii saadakse aine veest eraldamisel suurema sisaldusega kontsentraat ja usaldusväärsem analüüsi tulemus. 1. liite tabelis on esitatud vajaliku minimaalse mahu hinnangud, uuritava aine avastamise läved, hinnangulised  $\log P_{OW}$  väärtused ja lahustuvused vees. Tabel põhineb Pinsuwani jt (14) esitatud seosel ühelt poolt  $\log P_{OW}$  ning teiselt poolt oktaanoolis ja vees lahustuvuse (S) suhte vahel:

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼ **M4**

kus

$$SR = S_{\text{oct}}/S_w \text{ (väljendatud molaarsustes),}$$

ning Lymani (15) esitatud valemil, mis võimaldab ennustada vesilahustuvust. 1. liites esitatud valemi abil arvatud vesilahustuvust tuleb käsitleda esialgse hinnanguna. Tuleb märkida, et käesoleva meetodi kasutaja võib hinnata vesilahustuvust ka mis tahes muu valemi abil, kui ta arvab, et see kajastab hüdrofoobsuse ja lahustuvuse seost paremini. Näiteks tahkete ühendite puhul on soovitatav lahustuvuse hindamisel arvestada ka sulamistemperatuuri. Kui kasutatakse modifitseeritud valemit, tuleb kontrollida, kas valem lahustuvuse arvutamiseks oktanoolis ikkagi kehtib. 2. liites on skemaatiliselt kujutatud klaasist veesärgiga katsenõu mahuga umbes üks liiter. 2. liites kujutatud nõu proportsioonid on osutunud sobivaks ja muu mahuga nõu peaks olema samasuguse kujuga;

— oluline on sellise seadme olemasolu, mis hoiab aeglase segamise katse jooksul püsivat temperatuuri.

18. Nõud peavad olema valmistatud inertsest materjalist, et adsorptsioon nõu pinnale oleks tähtsusetu.

#### **Katselahuste valmistamine**

19.  $P_{\text{OW}}$  määramiseks kasutatakse müügilolevat suurima puhtusastmega (vähemalt üle 99 %) 1-oktanooli. 1-oktanool soovitatakse puhastada happe, aluse ja veega ekstraheerimise abil ning seejärel kuivatada. Lisaks sellele võib 1-oktanooli puhastada destilleerimisega. Puhastatud 1-oktanooli kasutatakse uuritava aine standardlahuste valmistamiseks.  $P_{\text{OW}}$  määramiseks kasutatav vesi peab olema destilleeritud klaas- või kvartsklaasist seadme abil, saadud puhastussüsteemist või olema kõrgefektiivse vedelikkromatograafia puhul nõutava puhtusega. Destilleeritud vesi filtritakse läbi filtri, mille poori suurus on 0,22  $\mu\text{m}$ , ja tehakse pimekatsed, millega kontrollitakse, et kontsentreeritud ekstraktis ei oleks uuritava aine käitumist mõjutavaid lisandeid. Klaaskiud-filtri kasutamisel puhastatakse see eelnevalt kuumutamise ja vähemalt kolme tunni jooksul 400 °C juures.
20. Enne katset küllastatakse mõlemad lahustid vastastikku, tasakaalustades neid piisavalt suure nõus. Selleks segatakse kahefaasilist süsteemi aeglaselt kahe ööpäeva jooksul.
21. Valitakse vajalik uuritava aine kontsentratsioon ja aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktanool-vesi tuleb määrata lahja 1-oktanool- ja vesilahuse jaoks. Sellepärast ei tohi uuritava aine kontsentratsioon ületada 70 % selle lahustuvusest kummaski faasis ega olla suurem kui 0,1 (1). Katses kasutatavas 1-oktanooli lahuses ei tohi olla uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi.
22. Vajalik kogus uuritavat ainet lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Kui võib arvata, et  $\log P_{\text{OW}}$  väärtus on suurem kui viis, tuleb hoolikalt jälgida, et katses kasutatavad 1-oktanooli lahused ei sisaldaks uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi. Nende ainete puhul, mille  $\log P_{\text{OW}} > 5$ , toimitakse seepärast järgmisel viisil:

— uuritav aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis;

**▼M4**

- lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et hõljuv aine sadestuks. Sadestumise ajal jälgitakse uuritava aine kontsentratsiooni;
- kui 1-oktanooli lahuses mõõdetav kontsentratsioon on saavutanud püsiva väärtuse, lahjendatakse põhilahus vajaliku mahu 1-oktanooli lisamisega;
- mõõdetakse lahjendatud põhilahuse kontsentratsioon. Lahjendatud põhilahust võib aeglase segamise katses kasutada, kui mõõdetud kontsentratsiooni väärtus vastab lahjendusele.

**Proovide ekstraheerimine ja analüüsimine**

23. Uuritava aine määramiseks kasutatakse valideeritud analüüsimeetodit. Uurija peab esitama tõendid, et katses kasutatavad uuritava aine kontsentratsioonid veega küllastunud 1-oktanoolis ja 1-oktanooliga küllastunud vees on suuremad kui kasutatava analüüsimeetodi mõõtmislävi. Kui on vaja kasutada ekstraheerimismeetodit, tuleb enne katset kindlaks teha vee faasis ja 1-oktanooli faasis oleva uuritava aine analüütilise määramise saagis. Analüüsiks kasutatava signaali tugevus peab olema parandatud pimekatses saadud signaali arvestamiseks; hoolikalt jälgitakse, et analüüsitava ainet ei kantaks üle ühest proovist teise.
24. Kuna hüdrofoobse uuritava aine kontsentratsioon vee faasis on väike, on vee faasi enne analüüsi tõenäoliselt vaja ekstraheerida orgaanilise lahustiga ja ekstrakti kontsentreerida. Samal põhjusel on vaja kontsentreerida võimalikke pimekatseid. Selleks tuleb kasutada kõrgpuhtaid lahusteid, eelistatavalt selliseid, mis sobivad kasutamiseks jääkide analüüsis. Töötamine hoolikalt puhastatud (lahustiga pestud või kõrgel temperatuuril kuumutatud) klaasnõudega aitab vältida ühe proovi saastamist teise prooviga.
25.  $\log P_{OW}$  hinnangulise väärtuse saamiseks võib kasutada hindamisprogrammi või eksperdihindamist. Kui hinnangu järgi on väärtus suurem kui kuus, tuleb pimekatse parandite arvestamisel ja analüüsitava aine võimaliku ülekande vältimisel olla eriti hoolikas. Kui hinnanguline  $\log P_{OW}$  on suurem kui kuus, tuleb määramise saagist arvestava parandi saamiseks kasutada asendavat standardainet, nii et oleks võimalik saavutada suurt eelkontsentreerimistegurit. Müügil on mitu  $P_{OW}$  hindamiseks ette nähtud tarkvaraprogrammi, <sup>(1)</sup> nt Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Hindamisviise on kirjeldatud publikatsioonides 20–22.
26. Tunnustatud meetodite abil tehakse kindlaks uuritava aine mõõtmisläve väärtused 1-oktanoolis ja vees. Rusikareeglina võib meetodi mõõtmisläve määratleda kui uuritava aine sellist kontsentratsiooni vees või 1-oktanoolis, mille puhul signaali ja müra taseme suhe on kümme. Valitakse sobiv ekstraheerimise ja eelkontsentreerimise meetod ning leitakse analüütilise määramise saagis. Analüütiliseks määramiseks vajaliku tugevusega signaali saamiseks valitakse sobiv eelkontsentreerimistegur.

<sup>(1)</sup> See teave on ette nähtud üksnes kasutaja abistamiseks. Võib kasutada ka muid samaväärtseid arvutiprogramme, kui saab näidata, et need annavad samad tulemused.

▼ **M4**

27. Analüüsimetodi parameetrite ja oodatavate kontsentratsioonide alusel määratakse kindlaks ligikaudne proovi maht, mis on vajalik uuritava aine täpseks määramiseks. Tuleb vältida liiga väikeste veeproovide kasutamist, mis ei anna piisavalt tugevat analüütilist signaali. Tuleb hoiduda ka ülemäära suurte veeproovide võtmisest, kuna sel juhul võib vett mitte jätkuda nõutava minimaalse arvu ( $n = 5$ ) analüüside tegemiseks. 1. liites on esitatud proovi väikseima mahu sõltuvus nõu mahust, uuritava aine avastamise lävest ja lahustuvusest.
28. Uuritava aine sisaldus mõõdetakse selle aine kaliibrimiskõvera võrdlemise teel. Standardproovide kontsentratsioonivahemik peab ulatuma uuritava proovi kontsentratsioonist mõlemale poole.
29. Kui uuritava aine hinnanguline  $\log P_{OW}$  väärtus on suurem kui kuus, tuleb enne ekstraheerimist lisada veeproovile asendavat standardainet, et osata arvesse võtta kadusid veeproovi ekstraheerimisel ja eelkontsentreerimisel. Määramise saagist arvestava parandi õige väärtuse saamiseks peavad asendava standardaine omadused olema uuritava aine omadustega väga sarnased või identsed. Selleks kasutatakse eelistatavalt (stabiilsete) isotoopidega (nt deuterium või  $^{13}C$ ) märgistatud uuritava aine analooge. Kui stabiilsete isotoopidega (nt deuterium või  $^{13}C$ ) märgistatud analooge kasutada ei saa, tuleb usaldusväärsete kirjandusandmete põhjal näidata, et asendava standardaine füüsikalised-keemilised omadused on väga sarnased uuritava aine omadustega. Vee faasi ekstraheerimisel lahustiga võib moodustuda emulsioon. Emulsiooni vähendamiseks võib lisada soola ja lasta faasidel eralduda järgmise päevani. Ekstraheerimiseks ja proovide eelkontsentreerimiseks kasutatud meetodid märgitakse katseprotokolli.
30. Vajaduse korral võib enne analüüsi 1-oktanooli faasist võetud proovi lahendada sobiva lahustiga. Asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks on soovitatav ka siis, kui uuritava aine saagisekatsete tulemused on väga varieeruvad (suhteline standardhälve  $> 10\%$ ).
31. Analüüsimetodi üksikasjad märgitakse katseprotokolli. Nende hulka kuuluvad ekstraheerimismeetod, eelkontsentreerimis- ja lahendustegur, analüüsiseadme parameetrid, kaliibrimismeetod, kaliibrimise kontsentratsioonivahemik, vee faasis oleva uuritava aine määramise saagis, asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks, fooni tase, avastamislävi ja mõõtmislävi.

**Katse läbiviimine***Optimaalne 1-oktanooli ja vee mahu suhe*

32. Vee ja 1-oktanooli mahtude valimisel tuleb arvestada mõõtmisläve väärtust 1-oktanoolis ja vees, veeproovide puhul kasutatavaid eelkontsentreerimistegureid, 1-oktanooli ja vee prooviks võetavaid koguseid ja eeldatavaid kontsentratsioone. Tehnilistel põhjustel valitakse 1-oktanooli maht aeglaselt segatavas süsteemis selliselt, et 1-oktanooli kiht oleks küllalt paks (üle 0,5 cm), nii et 1-oktanooli faasist saaks võtta proovi seda faasi häirimata.
33. Ühendite puhul, mille  $\log P_{OW}$  on 4,5 või suurem, kasutatakse tavaliselt järgmist faaside suhet: üheliitrisse nõusse pannakse 950–980 ml vett ja 20–50 ml 1-oktanooli.

▼ **M4***Katsetingimused*

34. Katse ajal termostateeritakse katsenõu nii, et temperatuurikõikumised on väiksemad kui 1 °C. Katse tuleb teha 25 °C juures.
35. Katsesüsteemi kaitsmiseks päevavalguse eest tehakse katse pimedas ruumis või kaetakse katsenõu alumiiniumfooliumiga.
36. Katse tehakse võimalikult tolmuvabas keskkonnas.
37. 1-oktanolii ja vee süsteemi segatakse tasakaalu saabumiseni. Tasakaalustamisaja hindamiseks tehakse eeluuring, mille jooksul süsteemi segatakse aeglaselt ning võetakse perioodiliselt 1-oktanolist ja veest proove. Proove võetakse mitte sagedamini kui viie tunni tagant.
38. Iga  $P_{OW}$  määramiseks tehakse vähemalt kolm sõltumatut aeglase segamise katset.

*Tasakaalustamisaja määramine*

39. Eeldatakse, et tasakaal on saavutatud, kui 1-oktanolii faasi ja veefaasi kontsentratsioonide suhte ja aja regressioonisirge tõus nelja järjestikuse proovivõtu ulatuses ei erine oluliselt nullist usaldusnivool 0,05. Enne proovivõtu alustamist tasakaalustatakse süsteemi vähemalt üks ööpäev. Kogemused näitavad, et kui aine hinnanguline  $\log P_{OW}$  väärtus on alla viie, saab proovid võtta teisel ja kolmandal päeval. Hüdrofoobsemate ühendite puhul võib tasakaalustamine kesta kauem. Ühendi puhul, mille  $\log P_{OW}$  väärtus on 8,23 (dekaklorobifenüül), oli piisav tasakaalustamisaeg 144 tundi. Tasakaalu hindamiseks võetakse korduvalt proove ühest nõust.

*Katse alustamine*

40. Katse alguses täidetakse katsenõu veega, mis on küllastunud 1-oktanoliga. Püsiva temperatuuri saavutamiseks termostateeritakse katsenõu piisava aja jooksul.
41. Katsenõusse lisatakse ettevaatlikult vajalik kogus uuritavat ainet, mis on eelnevalt lahustatud sobivas mahus veega küllastunud 1-oktanolis. See etapp on väga oluline, kuna siin tuleb vältida kahe faasi turbulentset segunemist. Selleks võib 1-oktanolii faasi lisada aeglaselt pipetiga, hoides pipetti vastu katsenõu seina veefaasi pinna läheduses. 1-oktanolii faas voolab mööda klaasseina, moodustades veefaasi peale kihi. Mingil juhul ei tohi 1-oktanolii kallata otse katsenõusse; 1-oktanolii tilgad ei tohi kukkuda otse vette.
42. Pärast segamise alustamist tõstetakse segamise kiirust aeglaselt. Kui segaja mootorit ei saa vajalikul määral reguleerida, tuleb kasutada trafot. Segamise kiirus reguleeritakse selliseks, et vee ja 1-oktanolii piirpinnal tekiks 0,5–2,5 cm sügavune keeris. Kui keerise sügavus ületab 2,5 cm, tuleb segamise kiirust vähendada; vastasel korral võivad 1-oktanolii tilkadest veefaasis tekkida mikropiisakesed, mille tagajärjel uuritava aine kontsentratsiooni vees hinnatakse tegelikust suuremaks. Maksimaalselt 2,5 cm sügavusele keerisele vastavat segamiskiirust soovitatakse laboritevaheliste võrdluskatsete tulemuste alusel (5). See on kompromiss, mis võimaldab 1-oktanolii mikropiiskade tekke piiramisega samal ajal süsteemi kiiresti tasakaalustada.

**▼ M4***Proovi võtmine ja ettevalmistamine*

43. Enne proovi võtmist peatatakse segaja ja oodatakse, kuni vedelike liikumine lakkab. Kui proovid on võetud, pannakse segaja uuesti aeglaselt tööle, nagu eespool kirjeldatud, ja seejärel suurendatakse järk-järgult segamise kiirust.
44. Vee proove võetakse katsenõu alumises osas oleva kraani kaudu. Kraani sees olev tasakaalustamata veekogus visatakse alati ära (2. liites kujutatud nõu puhul on selle maht umbes 5 ml). Kraani sees olev vesi ei segune ülejäänud faasiga ega ole sellepärast tasakaalus. Registreeritakse veeproovide mahud ja jälgitakse, et massibilansi koostamisel võetaks arvesse ka äravisatud vees leiduv uuritava aine kogus. Aurumiskao vähendamiseks lastakse veel rahu-likult voolata jaotuslehtrisse, nii et vee- ja 1-oktaanoolikihi olekut ei häiritaks.
45. 1-oktaanooli proove võetakse 1-oktaanooli kihist väikeste alikvootide (umbes 100 µl) kaupa 100-mikroliitrise tervenisti klaasist ja metallist süstla abil. Seejuures jälgitakse, et ei häiritaks faasidevahelist piirpinda. Registreeritakse proovide mahud. Väiksest alikvoodist piisab, kuna 1-oktaanooli proovi lahjendatakse.
46. Tuleb vältida asjatuid proovi ülekandmisi. Seepärast määratakse proovi maht gravimeetriselt. Veeproovi puhul saab seda teha nii, et proov võetakse jaotuslehtrisse, millesse on enne pandud vajalik kogus lahustit.

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**

47. Käesoleva katsetoodika kohaselt tehakse  $P_{OW}$  määramiseks uuritava ainega ühesugustes tingimustes kolm aeglase segamise katset (kolm paralleelkatset). Tasakaalu saavutamist näitav regressioonikõver peab põhinema  $C_O/C_W$  määramisel vähemalt neljas järjestikuses eri aegadel võetud proovis. See võimaldab arvutada dispersiooni, mis iseloomustab paralleelkatsetest leitud keskväärtuse määramatust.
48.  $P_{OW}$  väärtust võib iseloomustada igast paralleelkatsest saadud andmete dispersiooni abil. Neid andmeid kasutatakse kaalutud keskmise  $P_{OW}$  väärtuse arutamiseks üksikute paralleelkatsete tulemuste alusel. Selleks kasutatakse statistilise kaaluna paralleelkatsete tulemuste dispersiooni pöördväärtust. Suure hajuvusega (suure dispersiooniga) ja seega vähem usaldatavad andmed mõjutavad kaalutud keskmist tulemust vähem kui väiksema dispersiooniga andmed.
49. Samal viisil arvutatakse ka kaalutud standardhälve. See iseloomustab  $P_{OW}$  määramise korratavust. Kaalutud standardhälbe väike väärtus näitab, et  $P_{OW}$  määramise tulemus on ühes ja samas laboratooriumis hästi korratav. Järgnevalt on kirjeldatud katseandmete formaalstatistilist analüüsi.

▼ **M4****Tulemuste töötlemine***Tasakaalu saavutamise näitamine*

50. Iga proovivõtuhetke jaoks arvutatakse 1-oktaanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide suhte logaritm ( $\log C_O/C_W$ ). Tasakaalu saavutamise näitamiseks ehitatakse graafik, mis kajastab selle suhte sõltuvust ajast. Kui vähemalt nelja proovi tulemused moodustavad graafikul platoo, tähendab see, et tasakaal on saavutatud ja uuritav aine on 1-oktaanoolis tõesti lahustunud. Kui kõnesolevat platood ei ole, jätkatakse katset, kuni nelja järjestikuse proovi tulemused annavad tõusu, mis ei erine oluliselt 0-st usaldusnivool 0,05, näidates, et  $\log C_O/C_W$  ei sõltu ajast.

*Log  $P_{OW}$  arvutamine*

51. Iga paralleelkatse log  $P_{OW}$  saamiseks arvutatakse kaalutud keskmine log  $C_O/C_W$  väärtus kõvera log  $C_O/C_W$  vs. aeg tasakaaluolekule vastaval osal. Kaalutud keskmise arvutamisel kaalutakse katseandmeid dispersiooni pöördväärtusega; selle tulemusena on katseandmete mõju lõpptulemusele pöördvõrdeline nende määramatusega.

*Keskmine log  $P_{OW}$* 

52. log  $P_{OW}$  keskvaartuse arvutamiseks eri paralleelkatsete keskvaartustest leitakse vastavate dispersioonidega kaalutud paralleelkatsete tulemuste keskmine.

Arvutused tehakse järgmiselt:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

kus

$\log P_{OW,i}$  = on paralleelkatses i leitud log  $P_{OW}$  väärtus,

$\log P_{OW,Av}$  = on üksikutes paralleelkatsetes määratud log  $P_{OW}$  väärtuste kaalutud keskmine,

$w_i$  = on paralleelkatses i log  $P_{OW}$  väärtusele omistatud statistiline kaal.

Statistilise kaaluna  $w_i$  kasutatakse log  $P_{OW,i}$  dispersiooni pöördväärtust ( $w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$ ).

53. log  $P_{OW}$  keskvaartuse viga hinnatakse tasakaaluolekus üksikutes paralleelkatsetes määratud log  $C_O/C_W$  väärtuste korratavuse järgi. See väljendatakse log  $P_{OW,Av}$  kaalutud standardhällbena ( $\sigma_{\log P_{OW,Av}}$ ), mis omakorda on log  $P_{OW,Av}$  väärtusega seotud vea mõõt. Kaalutud standardhällbe võib arvutada kaalutud dispersioonist ( $\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$ ) järgmisel viisil:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

n on paralleelkatsete arvu tähis.



**▼ M4****Katseprotokoll**

54. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav aine:*

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (mis näitab määrgistuse asukohta, kui kasutatakse radioaktiivselt määrgistatud ainet) ja olulised füüsikalise-keemilised omadused (vt punkt 17);
- uuritava aine puhtusaste (lisandid);
- määrgistatud kemikaali määrgise puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral);
- log P<sub>OW</sub> esialgne hinnanguline väärtus ja selle tuletusviis.

*Katsetingimused:*

- uuringu kuupäevad;
- katsetemperatuur;
- 1-oktanooli ja vee maht katse alguses;
- võetud 1-oktanooli ja vee proovide maht;
- pärast proovide võtmist katsenõusse jäänud 1-oktanooli ja vee maht;
- katsenõu ja segamistingimuste kirjeldus (segamispulga ja katsenõu ehitus, keerise sügavus millimeetrites ja segamiskiirus, kui see on teada);
- uuritava aine määramiseks kasutatud analüüsimeetod ja selle meetodi mõõtmislävi;
- proovivõtuajad;
- vee faasi ja kasutatud puhvrite pH (kui ioniseeruvate molekulide tõttu reguleeriti pH väärtust);
- paralleelkatsete arv.

*Tulemused:*

- kasutatud analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus;
- 1-oktanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide sõltuvus ajast;
- massibilansi kontroll;
- katsetemperatuur ja selle standardhälve või katsetemperatuuri vahemik;
- kontsentratsioonide suhte ja aja seost kajastav regressioonikõver;
- keskvväärtus log P<sub>OW,Av</sub> ja selle standardhälve;
- tulemuste arutelu ja tõlgendus;

▼ **M4**

- representatiivse analüüsi originaalarvandmete näidis (hea laboritava kohaselt säilitatakse kõik originaalandmed), kaasa arvatud asendavate standardainete saagised, kaliibrimisel kasutatud kontsentratsioonide arv (koos kaliibrimiskõvera korrelatsioonikordaja kriteeriumidega) ning kvaliteedi tagamise ja/või kontrolli tulemused;
- kui on olemas, siis: mõõtmismeetodi valideerimisaruanne (esitatakse kirjandusviitena).

*KIRJANDUS*

- 1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring” method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499–512.
- 2) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.
- 3) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.
- 4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- 5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- 6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.
- 7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
- 8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.
- 9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.
- 10) Käesoleva lisa peatükk A.6. Lahustuvus vees.
- 11) Käesoleva lisa peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine hüdrolüüsi teel sõltuvalt pH-st.
- 12) Käesoleva lisa peatükk C.4, II–VII osa (meetodid A–F). Kiire biolagunevuse määramine.
- 13) Käesoleva lisa peatükk A.4. Aururõhk.
- 14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.
- 15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 to 2–52.
- 16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- 17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- 18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- 19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

**▼M4**

- 20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- 21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.
- 22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼ **M4**

## 1. liide

**Eri log P<sub>OW</sub> väärtusega uuritavate ainete veefaasis määramiseks vajalike vee miinimumkoguste arvutamise tabel**

Eeldused

- Ühe alikvoodi maksimaalne maht on 10 % üldmahust, 5 alikvooti on 50 % üldmahust.
- Uuritava aine kontsentratsioon on 70 % lahustuvusest kummaski faasis. Väiksema kontsentratsiooni puhul on vaja kasutada veel suuremat mahtu.
- Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht on 100 ml.
- Uuritavatel ainetel on mõistlikud log P<sub>ow</sub> vs. log S<sub>w</sub> ja log P<sub>ow</sub> vs. SR (S<sub>oct</sub>/S<sub>w</sub>) sõltuvused.

*S<sub>w</sub> hindamine*

log P <sub>ow</sub>	Võrrand	log S <sub>w</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

*S<sub>oct</sub> hindamine*

log P <sub>ow</sub>	Võrrand	S <sub>oct</sub> (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

▼ **M4**

Uuritava aine üldmass (mg)	Mass <sub>oct</sub> /Mass <sub>H2O</sub>	Mass <sub>H2O</sub> (mg)	Konts <sub>H2O</sub> (mg/l)	Mass <sub>oct</sub> (mg)	Konts <sub>oct</sub> (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

*Mahtude arvutamine***Veefaasi väikseim vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral**

log K <sub>ow</sub>	Avastamislävi (mikrogramm/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l)	0,1					

*Selgitused arvutuste kohta*

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 1-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 2-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 5-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 10-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Ületab 10 % isegi 10-liitrise katsenõu mahust.

## ▼M4

**Vajaliku mahu sõltuvus lahustuvusest vees ja log P<sub>ow</sub> väärtusest**

Veefaasi väikseim vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral (ml)

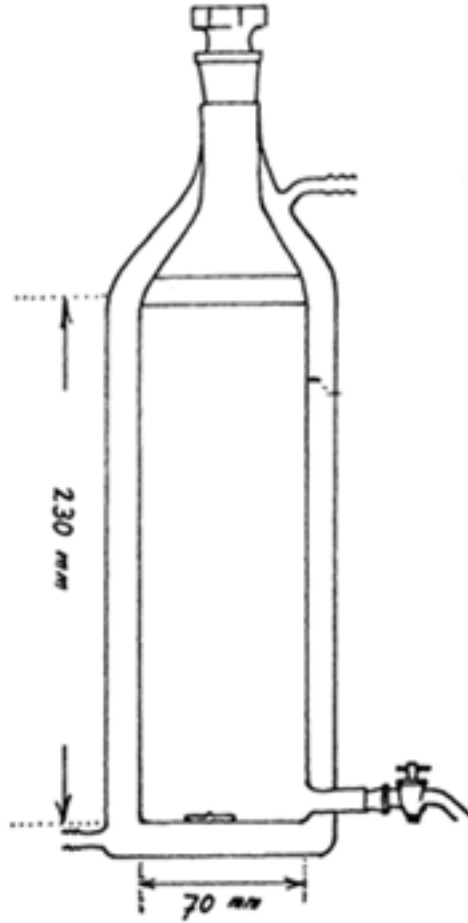
log P <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼ **M4**

log P <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l) on		0,1					

▼ M4

2. liide

Klaasist veesärgiga katsenõu  $P_{OW}$  määramiseks aeglase segamise katse abil



▼ **M6****A.24. JAOTUSKOEFIITSIENT (*N*-OKTANOOL/VESE): KÕRGEFEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) MEETOD****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 117 (2004).

1. Jaotuskoeffiitsient (*P*) on määratletud kui kahest omavahel praktiliselt segunematust lahustist koosnevas kahefaasilises süsteemis lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide suhe. Lahustite *n*-oktanooli ja vee puhul:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanool}}{C_{vesi}}$$

Kuna jaotuskoeffiitsient on kahe kontsentratsiooni suhtarv, puudub sellel mõõtühik ning seda väljendatakse tavaliselt suhtarvu kümnendlogaritmina.

2.  $P_{ow}$  on oluline näitaja, mille abil kirjeldatakse keemiliste ainete käitumist keskkonnas. On tõendatud, et esineb väga tugev seos ainete ioniseerimata vormi  $P_{ow}$  ja nende ainete kalades bioakumuleerumise vahel. Samuti on leitud, et  $P_{ow}$  on kasulik näitaja ainete pinnases ja setetes adsorbeerumise ennustamiseks ning ainete struktuuri ja toime vahelise kvantitatiivse seose kindlakstegemiseks paljude erinevate bioloogilise mõju viiside puhul.
3. Algne ettepanek selle katsemeetodi kasutamiseks põhineb C. V. Eadsforthi ja P. Moseri artiklil (1). Katsemeetodi väljatöötamist ja OECD laboritevahelise võrdlusuuringu tegemist kooskõlastas 1986. aastal Saksamaa Liitvabariigi asutus Umweltbundesamt (2).

**LÄHTEKAALUTLUSED**

4. Log  $P_{ow}$  väärtused vahemikus – 2 kuni 4 (vahel kuni 5 või rohkem) <sup>(1)</sup> saab eksperimentaalselt kindlaks teha loksutamismeetodil (käesoleva lisa peatükk A.8, OECD katsejuhend nr 107). HPLC-meetod võimaldab määrata log  $P_{ow}$  väärtusi vahemikus 0–6 (1, 2, 3, 4, 5). Selle meetodi puhul võib olla vaja hinnata  $P_{ow}$  väärtust, et valida sobivad võrdlusained ja toetada saadavate katsetulemuste põhjal tehtavaid järeldusi. Arvutusmeetodeid kirjeldatakse lühidalt selle katsemeetodi liites. Kasutatakse isokraatlist HPLC töörežiimi.
5.  $P_{ow}$  väärtus sõltub keskkonningimustest, näiteks temperatuurist, pH-st, ionsest jõust jne, ning need katsetingimused tuleks kindlaks määrata, et  $P_{ow}$  andmeid oleks võimalik õigesti tõlgendada. Ioniseeritavate ainete puhul võib kasutusele tulla teinegi meetod (nt kavandatud OECD juhend pH mõõtmisel põhineva meetodi kohta ioniseeritud ainete jaoks (6)), mida saaks kasutada alternatiivmeetodina. Ehkki kõnealune kavandatud OECD juhend võib sobida selliste ioniseeritavate ainete  $P_{ow}$  määramiseks, on mõnel juhul asjakohasem kasutada HPLC-meetodit, mille puhul lähtutakse keskkonnas esinevatest pH väärtustest (vt punkt 9).

<sup>(1)</sup> Ülempiir on määratud vajadusega saavutada täielik faaside eraldumine pärast jaotumistasakaalu muutmist ja enne analüüsimiseks proovide võtmist. Hoolikalt tehtud katse puhul võib ülempiiriks olla suurem  $P_{ow}$  väärtus.

▼ **M6**

## MEETODI PÕHIMÕTE

- Pöördfaasilise HPLC jaoks kasutatakse analüütilisi kolonne, mis on täidetud müügiloleva tahke täidisega, mis sisaldab ränidioksiidiga kovalentselt seotud pikki süsivesinikuahelaid (nt C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>).
- Sellisesse kolonni süstitud kemikaal jaotub liikuvast faasist piki kolonni edasikandumisel liikuva lahustifaasi ja liikumatu süsivesinikufaasi vahel. Ainete jaotumine toimub proportsionaalselt nende jaotuskoeffitsiendiga süsteemis süsivesinik/vesi ning sellest tulenevalt elueeritakse hüdrofiilsed ained esimesena ja lipofiilsed ained viimasena. Retentsiooniaega kirjeldab mahtuvustegur  $k$ , mis arvutatakse järgmise vörrandiga:

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

kus  $t_R$  on uuritava aine retentsiooniaeg ja  $t_0$  on surnud aeg, st keskmine aeg, mille jooksul lahustimolekul läbib kolonni. Kvantitatiivsete analüüsi-meetodite kasutamine ei ole vajalik, tuleb kindlaks teha üksnes retentsiooniaeg.

- Uuritava aine jaotuskoeffitsiendi arvutamiseks süsteemis oktanool/vesi määratakse katseliselt mahtuvustegur  $k$  ning sisestatakse see siis järgmisse vörrandisse:

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

kus

$a$  ja  $b$  on lineaarse regressiooni kordajad.

Selle vörrandi lahendamiseks leitakse regressioonanalüüsi teel lineaarne seos süsteemis oktanool/vesi täheldatava vördlusainete jaotuskoeffitsiendi logaritmi ja nende vördlusainete mahtuvusteguri logaritmi vahel.

- Pöördfaasilisel HPLC-l põhinev meetod võimaldab määrata jaotuskoeffitsiendi  $P_{ow}$  logaritmitud vöärtusi vahemikus 0–6, ent meetodi ulatust on erandjuhul võimalik laiendada kuni  $\log P_{ow}$  vahemikuni 6–10. Sel juhul võib olla vaja modifitseerida liikuvat faasi (3). Kõnealune meetod ei ole kasutatav tugevate hapete ja aluste, metallikomplekside, elueerimiseks kasutatava lahusega reageerivate ainete või pindaktiivsete ainete puhul. Ioniseeritavate ainete puhul saab mõõta nende ioniseerimata vormi (vaba hape või vaba alus) üksnes juhul, kui kasutatakse sobivat puhvrit, mille pH on väiksem kui vaba happe  $pK_a$  või suurem kui vaba aluse  $pK_a$ . Ioniseeritavate ainete analüüsimiseks võib kasutusele tulla ka pH mõõtmisel põhinev meetod (6), mida saaks kasutada alternatiivmeetodina (6). Kui  $\log P_{ow}$  vöärtus määratakse keskkonnaohtlikkuse alusel klassifitseerimiseks või keskkonnaohu hindamiseks, tuleks katse teha pH vöärtuste vahemikus, mis vastab looduskeskkonnas esinevatele pH vöärtustele, st vahemikus 5,0–9,0.
- Mõnel juhul võivad lisandid raskendada tulemuste tõlgendamist, kuna piike ei saa enam üheselt identifitseerida. Lahutamata jäänud piikidega segu puhul tuleks esitada  $\log P_{ow}$  ülem- ja alampiir ning igale  $\log P_{ow}$  vöärtusele vastava piigi protsentuaalne pindala. Homoloogsete ainete rühmast koosneva segu puhul tuleks märkida ka kaalutud keskmine  $\log P_{ow}$  (7), mis on arvutatud iga üksiku  $P_{ow}$  vöärtuse ja sellele vastava piigi protsentuaalse pindala põhjal (8). Arvutustes tuleks arvesse võtta kõiki piike, mille pindala on vähemalt 5 % piikide kogupindalast (9):

▼ **M6**

$$\text{kaalutud keskmine log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{pindala } (\%))}{\text{piikide kogupindala } (\%)} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\text{pindala } (\%)_i)}{\sum_i \text{pindala } (\%)}$$

Kaalutud keskmine log  $P_{ow}$  kehtib üksnes homoloogidest (nt alkaanidest) koosneva aine või segu (nt tallõli) kohta. Segu mõõtmisel võib mõtestatud tulemusi saada juhul, kui kasutatava analüütilise detektori tundlikkus on kõikide segus sisalduvate ainete suhtes ühesugune ja neid aineid on võimalik üksteisest piisavalt lahutada.

## TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

11. Enne meetodi kasutamist peaks olema teada aine dissotsiatsioonikonstant, struktuurivalem ja lahustuvus liikuvus faasis. Peale selle oleks abiks teave aine hüdrolüüsi kohta.

## KVALITEEDIKRITEERIUMID

12. Mõõtmistulemuste usaldusvärsuse suurendamiseks tuleb iga mõõtmist teha kaks korda.

— Korratavus: identsetes katsetingimustes ja sama võrdlusainete rühmaga tehtud korduvmõõtmistel saadud log  $P_{ow}$  väärtused ei tohiks logaritmskaalal erineda rohkem kui  $\pm 0,1$  ühikut.

— Reprodutseeritavus: mõõtmiste kordamisel erineva võrdlusainete rühmaga võidakse saada erinevad tulemused. Tavaliselt on log  $k$  ja log  $P_{ow}$  vahelist seost väljendava korrelatsioonikordaja  $R$  väärtus katses kasutatavate ainete rühma puhul umbes 0,9, mis vastab oktanool-vee jaotuskoeffitsiendi log  $P_{ow}$  varieeruvusele  $\pm 0,5$  logaritmilist ühikut.

13. Laboritevahelisest võrdlusuuringust on selgunud, et HPLC-meetodiga saadud log  $P_{ow}$  väärtused erinevad loksutamismeetodiga saadud väärtustest kuni  $\pm 0,5$  ühikut (2). Kirjandusest võib leida ka muid võrdlusandmeid (4, 5, 10, 11, 12). Kõige täpsemad tulemused saadakse struktuurilt lähedastel võrdlusainetel põhinevate korrelatsioonigraafikute kasutamisel (13).

## VÕRDLUSAINED

14. Aine mõõdetud mahtvusteguri  $k$  korreleerimiseks aine  $P_{ow}$ -ga tuleb koostada vähemalt kuuest punktist koosnev kaliibrimisgraafik (vt punkt 24). Katse tegija valib ise sobivad võrdlusained. Võrdlusainete log  $P_{ow}$  väärtused peaksid üldjuhul moodustama vahemiku, mis hõlmab uuritava aine log  $P_{ow}$  väärtust, st vähemalt ühe võrdlusaine  $P_{ow}$  peaks olema suurem kui uuritaval ainel ja vähemalt ühe võrdlusaine  $P_{ow}$  peaks olema uuritava aine omast väiksem. Ekstrapoleerimist tuleks kasutada ainult erandjuhul. Sellised võrdlusained peaksid eelistatult olema oma struktuurilt uuritava ainega sarnased. Kaliibrimiseks kasutatavate võrdlusainete log  $P_{ow}$  väärtused peaksid põhinema usaldusväärsetel katseandmetel. Ainete puhul, mille log  $P_{ow}$  väärtus on suur (tavaliselt üle 4), võib usaldusväärsete katseandmete puudumisel kasutada siiski ka arvatud väärtusi. Ekstrapoleeritud väärtuste kasutamisel tuleks märkida ülempiir.

15. On olemas log  $P_{ow}$  väärtuste ulatuslikud loetelud paljude kemikaalirühmade kohta (14, 15). Kui struktuurilt sarnaste ainete jaotuskoeffitsiente käsitlevad andmed ei ole kättesaadavad, võib kasutada muudel võrdlusainetel põhinevat üldisemat kaliibrimist. Soovitavad võrdlusained ja nende  $P_{ow}$  väärtused on loetletud tabelis 1. Ioniseeritavate ainete kohta esitatud väärtused kehtivad ioniseerimata vormi puhul. Esitatud väärtuste usaldusvärsust ja kvaliteeti on kontrollitud laboritevahelise võrdlusuuringu käigus.

## ▼ M6

Tabel 1.  
Soovitavad võrdlusained.

	CASi number	Võrdlusaine	log P <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>
1	78-93-3	2-butanoon (metüületüülketoon)	0,3	
2	1122-54-9	4-atsetüülpüridiin	0,5	
3	62-53-3	Aniliin	0,9	
4	103-84-4	Atsetaniliid	1,0	
5	100-51-6	Bensüülalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksüfenool	1,3	pK <sub>a</sub> = 10,26
7	122-59-8	Fenoksüüdikhape	1,4	pK <sub>a</sub> = 3,12
8	108-95-2	Fenool	1,5	pK <sub>a</sub> = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenool	1,5	pK <sub>a</sub> = 3,96
10	100-47-0	Bensonitriil	1,6	
11	140-29-4	Fenüülsetonitriil	1,6	
12	589-18-4	4-metüülbensüülalkohol	1,6	
13	98-86-2	Atsetofenoon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenool	1,8	pK <sub>a</sub> = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobensoehape	1,8	pK <sub>a</sub> = 3,47
16	106-47-8	4-kloroaniliin	1,8	pK <sub>a</sub> = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenseen	1,9	
18	104-54-1	Tsinnamüülalkohol (kaneelalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Bensoehape	1,9	pK <sub>a</sub> = 4,19
20	106-44-5	<i>p</i> -kresool	1,9	pK <sub>a</sub> = 10,17
21	140-10-3 ( <i>trans</i> )	Kaneelhape	2,1	pK <sub>a</sub> = 3,89 ( <i>cis</i> ) 4,44 ( <i>trans</i> )
22	100-66-3	Anisool	2,1	
23	93-58-3	Metüülbensoaat	2,1	
24	71-43-2	Benseen	2,1	
25	99-04-7	3-metüülbensoehape	2,4	pK <sub>a</sub> = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenool	2,4	pK <sub>a</sub> = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetüleen	2,4	
28	1912-24-9	Atrasiin	2,6	
29	93-89-0	Etüülbensoaat	2,6	

▼ M6

	CASi number	Võrdlusaine	log P <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>
30	1194-65-6	2,6-diklorobensonitriil	2,6	
31	535-80-8	3-klorobensoehape	2,7	pK <sub>a</sub> = 3,82
32	108-88-3	Tolueen	2,7	
33	90-15-3	1-naftool	2,7	pK <sub>a</sub> = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroaniliin	2,8	
35	108-90-7	Klorobenseen	2,8	
36	1746-13-0	Allüülfentüüleeter	2,9	
37	108-86-1	Bromobenseen	3,0	
38	100-41-4	Etüülbenseen	3,2	
39	119-61-9	Bensofenoon	3,2	
40	92-69-3	4-fenüülfenool	3,2	pK <sub>a</sub> = 9,54
41	89-83-8	Tümoöl	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklorobenseen	3,4	
43	122-39-4	Difenüülamiin	3,4	pK <sub>a</sub> = 0,79
44	91-20-3	Naftaleen	3,6	
45	93-99-2	Fenüülbensoaat	3,6	
46	98-82-8	Isopropüülbenseen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklorofenool	3,7	pK <sub>a</sub> = 6
48	92-52-4	Bifenüül	4,0	
49	120-51-4	Bensüülbensoaat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6- <i>sec</i> -butüülfenool	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklorobenseen	4,2	
52	143-07-7	Dodekaanhape	4,2	pK <sub>a</sub> = 5,3
53	101-84-8	Difenüüleeter	4,2	
54	85-01-8	Fenantreen	4,5	
55	104-51-8	<i>n</i> -butüülbenseen	4,6	
56	103-29-7	Dibensüül	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenüülpüridiin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranteen	5,1	
59	603-34-9	Trifenüülamiin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

**▼M6****MEETODI KIRJELDUS****Jaotuskoefitsiendi esialgne hindamine**

16. Vajaduse korral võib uuritava aine jaotuskoefitsienti hinnata, kasutades soovitatavalt kas arvutusmeetodit (vt liide) või kui see on asjakohane, siis suhtarvu, mis iseloomustab aine lahustuvust puhastes lahustites.

*Seadmed*

17. Läheb vaja vähepulseeriva pumba ja sobiva tuvastamissüsteemiga vedeliku-kromatograafi. Paljude keemiliste rühmade tuvastamiseks sobib UV-detektor, mis töötab lainepikkusel 210 nm, või murdumisnäitaja detektor. Polaarseste rühmade esinemine liikumatus faasis võib HPLC-koloni efektiivsust oluliselt vähendada. Seepärast peaks polaarsete rühmade sisaldus liikumatus faasis olema võimalikult väike (16). Võib kasutada müügilolevaid pöördfaasilisi mikrograanultäidiseid või valmiskolonne. Sisestamissüsteemi ja analüütilise koloni vahele võib paigaldada kaitsekoloni.

*Liikuv faas*

18. Elueerimislahuse valmistamiseks kasutatakse HPLC jaoks piisava puhtusega metanooli ja destilleeritud või deioniseeritud vett ning enne kasutamist lahus degaseeritakse. Tuleks kasutada isokraatilist elueerimist. Metanooli ja vee suhe peaks olema selline, et lahuse veesisaldus on vähemalt 25 %. Tavaliselt piisab ainete puhul, mille log P on 6, elueerimisest ühe tunni jooksul voolukiirusel 1 ml/min seguga, milles metanooli ja vee ruumalasuhe on 3:1. Ainete puhul, mille log P on üle 6, võib olla vaja uuritava aine ja võrdlusainete elueerimisega lühendada; selleks vähendatakse liikuva faasi polaarsetust või koloni pikkust.
19. Uuritav aine ja võrdlusained peavad olema liikuv faasis piisaval määral lahustuvad, et võimaldada nende tuvastamist. Lisaaineid võib metanooli ja vee segus kasutada üksnes erandjuhul, kuna need muudavad koloni omadusi. Sellisel juhul tuleb kontrollida, et lisaaine ei mõjuta uuritava aine ja võrdlusainete retentsiooniaega. Metanooli ja vee segu sobimatus korral võib kasutada muid orgaanilise lahusti ja vee segusid, nt etanooli ja vee, atsetonitrili ja vee või isopropüülalkoholi (2-propanooli) ja vee segu.
20. Ioniseeritavate ainete puhul on oluline eluendi pH. See peaks jääma koloni töövahemikku, mis on tavaliselt 2–8. Soovitatav on kasutada puhverlahust. Tuleks ära hoida soolade väljasadenemist ja koloni omaduste halvenemist, mis võib juhtuda mõne orgaanilise lahusti ja puhverlahuse segu puhul. Ränidioksiidil põhineva liikumatu faasi kasutamisel ei ole soovitatav teha HPLC-analüüsi pH väärtustel üle 8, kuna leeliseline liikuv faas võib koloni omadusi järsult halvendada.

*Lahustatavad ained*

21. Uuritav aine ja võrdlusained peavad olema piisavalt puhtad, et võimaldada igale ainele vastava piigi tuvastamist kromatogrammil. Võimaluse korral lahustatakse uuritavad ja kalibreerimiseks kasutatavad ained liikuv faasis. Kui uuritava aine ja võrdlusainete lahustamiseks kasutatakse liikuva faasi lahusest erinevat lahustit, tuleks enne ainete süstimist kasutada lõpplahjenduse tegemiseks liikuva faasi lahust.

*Katsetingimused*

22. Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui  $\pm 1$  °C.

▼ **M6****Surnud aja  $t_0$  määramine**

23. Surnud aja  $t_0$  mõõtmiseks võib kasutada kolonnis mittepeetuvaid orgaanilisi aineid (nt tiokarbamiid või formamiid). Täpsema surnud aja saamiseks võib määrata homoloogsete ainete (nt  $n$ -alküülmetüülketoonid) seeriasse kuuluva umbes seitsme aine retentsiooniaja ( $t_R$ ). Koostatakse graafik retentsiooniaegade  $t_R(n_C + 1)$  ja  $t_R(n_C)$  vahelise sõltuvuse kohta;  $n_C$  tähistab süsinikuaatomite arvu. Saadakse sirge  $t_R(n_C + 1) = A \times t_R(n_C) + (1 - A) \times t_0$ , kus  $A$  väljendab suhet  $k(n_C + 1)/k(n_C)$  ja on konstantne. Surnud aeg  $t_0$  leitakse algordinaadi  $(1 - A) \times t_0$  ja tõusu  $A$  väärtuste alusel.

**Regressioonivõrrand**

24. Järgmise sammuna koostatakse  $\log k$  ja  $\log P$  vahelist sõltuvust väljendav graafik sobivate võrdlusainete kohta, mille  $\log P$  väärtused on sarnased uuritava aine eeldatava  $\log P$  väärtusega. Praktikas süstitakse seadmesse üheaegselt kuus kuni kümme võrdlusainet. Määratakse retentsiooniajad, soovitatavalt meerikuga integraatori abil, mis on ühendatud tuvastamissüsteemiga. Vastavad mahtuvusteguri  $k$  logaritmitud väärtused esitatakse graafikul  $\log P$  funktsioonina. Regressioonivõrrandit kontrollitakse korrapäraste ajavahemike järel, vähemalt kord päevas, et võtta arvesse võimalikke muutusi kolonni efektiivsuses.

**UURITAVA AINE  $P_{OW}$  MÄÄRAMINE**

25. Uuritav aine süstitakse seadmesse väikseimas tuvastatavas koguses. Retentsiooniaeg määratakse kahes korduses. Uuritava aine jaotuskoeffitsient saadakse arvutatud mahtuvusteguri interpoleerimisel kaliibrimisgraafiku abil. Väga väikeste ja väga suurte jaotuskoeffitsiendi väärtuste korral tuleb kasutada ekstrapoleerimist. Sel juhul tuleb pöörata erilist tähelepanu regressioonisirge usaldusvahemikule. Kui proovi retentsiooniaeg on võrdlusainete retentsiooniaegade vahemikust väljaspool, tuleks märkida asjaomane ülem- või alampiir.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Katseprotokoll**

26. Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:
- esialgse hindamise kohane jaotuskoeffitsiendi väärtus, kui see on määratud, ning kasutatud meetod; arvutusmeetodi kasutamisel selle täielik kirjeldus, sealhulgas andmed kasutatud andmebaasi kohta ja üksikasjalik teave fragmentide valimise kohta;
  - uuritava aine ja võrdlusainete puhtus, struktuurivalem ja CASi number;
  - seadmete ja katsetingimuste kirjeldus: analüütiline kolonn, kaitsekolonn,
  - liikuv faas, määramismeetod, temperatuurivahemik, pH;
  - elueerimisprofiilid (kromatogrammid);
  - surnud aeg ja selle määramise meetod;
  - kaliibrimisel kasutatud võrdlusainete retentsiooniandmed ja nende  $\log P_{ow}$  väärtused kirjanduse andmeil;
  - andmed sobitatud regressioonisirge ( $\log k$  versus  $\log P_{ow}$ ) ja vastava korrelatsioonikordaja kohta, sealhulgas usaldusvahemik;

▼ **M6**

- uuritava aine keskmine retentsiooniaeg ja interpoleeritud  $\log P_{ow}$  väärtus;
- segu puhul elueerimisprofili kromatogramm, kus on märgitud piikide piirid;
- $\log P_{ow}$  väärtused võrrelduna neile vastavate piikide protsentuaalse pindalaga;
- regressioonisirge põhjal tehtud arvutused;
- vajaduse korral arvatud kaalutud keskmine  $\log P_{ow}$  väärtus.

## KIRJANDUS

- (1) Eadsforth, C. V., ja Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere* 12: 1459.
- (2) Klein, W. Kördel, W., Weiss, M., ja Poremski, H. J. (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) Eadsforth, C. V. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pestic. Sci.* 17: 311.
- (4) Ellgehausen, H., D'Hondt, C., ja Fuerer, R. (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pestic. Sci.* 12: 219.
- (5) McDuffie, B. (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. Juhendi kavand, november 2000.
- (7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, 10. lisa. Merereostuse ärahoidmise Oslo ja Pariisi konventsioonide programmide ja meetmete komitee, Oviedo, 20.–24. veebruar 1995.
- (8) Thatcher, M., Robinson, M., Henriquez, L. R., ja Karman, C. C. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Versioon 1.0, 3. august.
- (9) Vik, E. A., Bakke, S., ja Bansal, K. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environ. Model. Software* 13: 529–537.
- (10) Renberg, L. O., Sundstroem, S. G., ja Sundh-Nygård, K. (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) Hammers, W. E., Meurs, G. J., ja De-Ligny, C. L. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chrom.* 247: 1.
- (12) Haky, J. E., ja Young, A. M. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromat.* 7: 675.
- (13) Fujisawa, S., ja Masuhara, E. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 787.



**▼M6**

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

▼ **M6***Liide***P<sub>ow</sub> arvutamise meetodid****SISSEJUHATUS**

1. Käesolevas liites tutvustatakse lühidalt P<sub>ow</sub> arvutamist. Lisateave on kättesaadav käsiraamatutes (1, 2).
2. P<sub>ow</sub> arvutatud väärtusi kasutatakse:
  - katsemeetodi valimiseks: log P<sub>ow</sub> väärtuste vahemiku –2 kuni 4 puhul loksutamismeetod ja log P<sub>ow</sub> väärtuste vahemiku 0–6 puhul HPLC-meetod;
  - HPLC kasutustingimuste (võrdlusained, metanooli ja vee suhe) valimiseks;
  - katseliselt saadud väärtuste usaldusväärseuse kontrollimiseks;
  - hinnangulise väärtusena, kui katsemeetodeid ei saa kasutada.

**Arvutusmeetodite põhimõte**

3. Allpool kirjeldatud arvutusmeetodid põhinevad molekuli teoreetilisel jagamisel sobivateks alaosadeks, mille kohta on teada usaldusväärsed log P<sub>ow</sub> osaväärtused. Log P<sub>ow</sub> saamiseks liidetakse alaosade log P<sub>ow</sub> osaväärtused ja molekulisiseseid vastasmõjusid arvestavad parandustegurid. Alaosade konstandid ja parandustegurid on loetletud mitmes allikas (1, 2, 3, 4, 5, 6). Mõnda allikat ajakohastatakse korrapäraselt (3).

**Arvutatud väärtuste usaldusväärsus**

4. Üldjuhul on arvutusmeetodite usaldusväärsus seda väiksem, mida keerukam on uuritav aine. Väikese molekulmassiga lihtsate, ühe või kahe funktsionaalrühmaga molekulide puhul on eeldatav vahe erinevate osadeks jagamise meetodite abil leitud ja mõõdetud log P<sub>ow</sub> väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Veamäär sõltub kasutatud alaosade konstantide usaldusväärseusest, oskusest võtta arvesse molekulisiseseid vastasmõjusid (nt vesiniksidemed) ja parandustegurite õigest kasutamisest. Ioniseeruvate ainete puhul tuleb arvesse võtta laengut ja ioniseerituse ulatust (10).

**Fujita-Hansch'i π-meetod**

5. Hüdrofoobse asendaja konstant π, mille algselt võtsid kasutusele Fujita *et al.* (7), on määratletud järgmiselt:

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

kus PhX aroomaatne derivaat on ja PhH on lähteaine.

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

π-meetodit kasutatakse eelkõige aroomaatsete ainete puhul. π väärtused on kättesaadavad paljude asendajate kohta (4, 5).

**Rekkeri meetod**

6. Rekkeri meetodi (8) kohaselt arvutatakse log P<sub>ow</sub> väärtus järgmiselt:

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

**▼M6**

kus  $a_i$  on arv, mis näitab, mitu korda konkreetne alaosa molekulis esineb, ja  $f_i$  on selle alaosa log  $P_{ow}$  osaväärtus. Vastasmõjutegurid on summaarselt väljendatavad konstandi  $C_m$  (nn maagiline konstant) kordsena. Alaosade konstandid  $f_i$  ja konstant  $C_m$  on määratud 825 aine 1 054 katseliselt saadud  $P_{ow}$  väärtuse põhjal, kasutades mitme muutujaga regressioonianalüüsi (6, 8). Vastasmõjutegurite määramine toimub kindlate eeskirjade kohaselt (6, 8, 9).

**Hansch-Leo meetod**

7. Hanschi-Leo meetodi (4) kohaselt arvutatakse log  $P_{ow}$  väärtus järgmiselt:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j,$$

kus  $f_i$  on alaosa konstant,  $F_j$  on parandustegur ning  $a_i$  ja  $b_j$  on vastavad esinemissagedused. Aatomite ja funktsionaalrühmade konstantide ja parandustegurite  $F_j$  loetelud on koostatud katse-eksituse meetodil katseliselt saadud  $P_{ow}$  väärtuste alusel. Parandustegurid on jagatud mitmesse eri klassi (1, 4). Kõikide eeskirjade ja parandustegurite arvessevõtmiseks on välja töötatud tarkvarapaketid (3).

**KOMBINEERITUD MEETOD**

8. Keerukate molekulide log  $P_{ow}$  arvutamise täpsust on võimalik oluliselt suurendada, kui molekul jagatakse suuremateks alaosadeks, mille kohta on olemas tabelites esitatud (3, 4) või mõõtmiste teel saadud usaldusväärsed log  $P_{ow}$  väärtused. Selliste alaosade (nt heterotsüklid, antrakinoon, asobeen) osaväärtused saab seejärel kombineerida Hanschi  $\pi$  väärtustega või Rekkeri või Leo meetodi puhul kasutatavate alaosa konstantidega.

*Märkused*

- i) Need arvutusmeetodid on osaliselt või täielikult ioniseeritud ainete puhul kasutatavad üksnes juhul, kui võetakse arvesse vajalikke parandustegureid.
- ii) Kui võib eeldada molekulisidest vesiniksidemete olemasolu, tuleb lisada vastavad parandustegurid (umbes + 0,6 kuni + 1,0 log  $P_{ow}$  ühikut) (1). Viiteid selliste sidemete olemasolule saab stereomudelitest ja spektroskoopiaandmetest.
- iii) Mitme tautomeerse vormi võimaliku esinemise korral lähtutakse arvutustes kõige tõenäolisemast vormist.
- iv) Tuleks hoolikalt jälgida alaosade konstantide loeteludes tehtavaid muudatusi.

**ARVUTUSMEETODEID KÄSITLEV KIRJANDUS**

- (1) Lyman, W. J., Reehl, W. F., ja Rosenblatt, D. H. (toim.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) Lyman, W. J., Block, J. H., ja Pearlman, R. S. (toim.). Partition Coefficient, Determination and Estimation. Pergamon Press, Elmsford (New York) ja Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA. Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) Hansch, C., ja Leo, A. J. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York (1979).

**▼M6**

- (5) Leo, A., Hansch, C., ja Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71: 525.
- (6) Rekker, R. F., ja de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* 14: 479.
- (7) Fujita, T., Iwasa, J., ja Hansch, C. (1964). A New Substituent Constant,  $\pi$ , Derived from Partition Coefficients *J. Amer. Chem. Soc.* 86: 5175.
- (8) Rekker, R. F. The Hydrophobic Fragmental Constant. Pharmacochimistry Library, 1. köide, Elsevier, New York (1977).
- (9) Eadsforth, C. V., ja Moser, P. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere* 12: 1459.
- (10) Scherrer, R. A. ACS – Symposium Series 255, lk 225. American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼ **M7****A.25. DISSOTSIATIOONIKONSTANDID VEES (TIITRIMISMEETOD, SPEKTROFOTOMEETRILINE MEETOD, KONDUKTOMEETRILINE MEETOD)****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 112 (1981).

**Eeltingimused**

- Sobiv analüüsimetod
- Lahustuvus vees

**Juhendteave**

- Struktuurivalem
- Konduktomeetrilise meetodi puhul elektrijuhtivus

*Erinõuded*

- Kõigi katsemeetodite puhul tuleb kasutada puhtaid või kaubandusliku puhtusklassiga aineid. Tuleb kaaluda, millist mõju võivad tulemustele avaldada lisandid.
- Tiitrimismetod ei sobi vähelahustuva uuritava aine puhul (vt allpool, katselahused).
- Spektrofotomeetriline meetod on kohaldatav ainult juhul, kui aine dissotsieerunud ja dissotsieerumata vormi UV või nähtava valguse neeldumisspektrid on oluliselt erinevad. See meetod võib samuti sobida vähese lahustuvusega ainete ja muu kui happe-aluse dissotsiatsiooni, st kompleksimoodustumise puhul.
- Kui Onsageri võrrand kehtib, võib konduktomeetrilist meetodit kasutada isegi mõõdukalt väikse kontsentratsioon ja isegi muu kui happe-aluse tasakaalu puhul.

*Alusdokumendid*

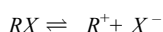
Käesolev katsemeetod põhineb meetoditel, mis on esitatud osas „Kirjandus“ loetletud dokumentides, samuti 18. augusti 1978. a EPA tootmiseelse teatise suuniste esialgsel kavandil (*Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA*).

**MEETOD: SISSEJUHATUS, EESMÄRK, KASUTUSALA, ASJAKOHASUS, KASUTAMINE JA KATSEMEETODI PIIRANGUD**

Aine keskkonnamõju hindamisel on oluline teada tema dissotsieerumist vees. Dissotsieerumisest oleneb, millisel kujul aine esineb; see omakorda määrab aine käitumise ja edasikandumise. See võib mõjutada kemikaali adsorptsiooni pinnasel ja setetes, samuti neeldumist rakkudes.

**Mõisted ja mõõtühikud**

Dissotsieerumine on pöörduv jagunemine kaheks või enamaks keemiliseks üksuseks, mis võivad olla ioonsed. Seda protsessi kirjeldatakse üldiselt võrrandiga



ning kontsentratsioonide kaudu väljendatud reaktsiooni tasakaaluolekut kirjeldab tasakaalukonstant

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Näiteks erijuhul, kui R on vesinik (aine on hape), kirjeldab konstanti võrrand

▼ **M7**

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

või

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

**Võrdlusained**

Järgmisi võrdlusaineid ei ole uue aine uurimisel alati vaja kasutada. Need on esitatud peamiselt selleks, et kalibrada aeg-ajalt meetodit ja võimaldada tulemuste võrdlemist muu meetodi abil saadud tulemusega.

	pK <sub>a</sub> (1)	Temperatuur, °C
<i>p</i> -nitrofenool	7,15	25 (1)
Bensoehape	4,12	20
<i>p</i> -kloroaniliin	3,93	20

(1) Väärtus 20 °C juures ei ole teada, kuid võib eeldada, et mõõtmistulemuste varieeruvus on suurem kui eeldatav temperatuurisõltuvus.

Kasulik oleks kasutada ainet, millel on mitu pK-d, nagu on näidatud allpool meetodi põhimõtte selgitamisel. Selline aine saaks olla:

sidrunhape	pK <sub>a</sub> (8)	Temperatuur, °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

**Katsemeetodi põhimõte**

Kirjeldatav keemiline protsess sõltub keskkonnatemperatuurile vastavas vahemikus üldiselt vaid vähe temperatuurist. Dissotsiatsioonikonstandi määramiseks on vaja mõõta kemikaali dissotsieerunud ja dissotsieerumata vormi kontsentratsioonid. Teades eespool mõistete ja mõõtühikute osas kirjeldatud stõhhiomeetriat, saab määrata asjakohase konstandi. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud erijuhumi korral käitub aine happe või alusena ja määramist on kõige parem teha aine ioniseeritud ja ioniseerimata vormi suhteliste kontsentratsioonide ja lahuse pH määramisega. Nende terminite vaheline seos on esitatud pK<sub>a</sub> valemiga, vt eespool osa „Mõisted ja mõõtühikud“. Mõnel ainel on rohkem kui üks dissotsiatsioonikonstant ja nende jaoks saab tuletada sarnased valemid. Mõned kirjeldatud meetoditest sobivad kasutamiseks ka muu kui happe-aluse dissotsiatsiooni puhul.

**Kvaliteedinõuded***Korduvus*

Dissotsiatsioonikonstandi väärtused (vähemalt kolmest paralleelmääramisest) peavad olema vahemikus ± 0,1 logaritmilist ühikut.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS**

pK<sub>a</sub> määramisele on kaks peamist lähenemisviisi. Ühe meetodi puhul tiitritakse aine teadaolevat kogust vastavalt vajadusele happe või aluse standardlahusega; teise meetodi puhul määratakse ioniseeritud ja ioniseerimata vormide suhteline kontsentratsioon ja selle pH-sõltuvus.

**▼ M7****Ettevalmistused**

Neile põhimõtetele tuginevad meetodid võib jaotada tiitrimiseks, spektrofotomeetriliseks ja konduktomeetriliseks määramiseks.

*Katselahused*

Tiitrimismeetodi ja konduktomeetrilise meetodi kasutamiseks tuleb kemikaal lahustada destilleeritud vees. Spektrofotomeetrilise meetodi ja muude meetodite puhul kasutatakse puhverlahuseid. Uuritava aine kontsentratsioon ei tohi ületada väiksemat järgmistest – 0,01 M või pool küllastuskontsentratsiooni – ning lahuste valmistamiseks tuleks kasutada aine kõige puhtamat kättesaadavat vormi. Kui aine on vees halvasti lahustuv, võib selle lahustada väheses koguses veega segunevas lahustis enne eespool osutatud kontsentratsioonide saavutamiseks vajaliku koguse lisamist.

Lahuseid tuleb kontrollida emulsiooni esinemise suhtes; selleks kasutatakse Tyndalli efekti; see on eriti oluline siis, kui lahustuvuse suurendamiseks lisati kaaslahustit. Puhverlahuse kasutamise korral ei tohi puhvri kontsentratsioon ületada 0,05 M.

**Katsetingimused***Temperatuur*

Temperatuuri tuleb reguleerida täpsusega vähemalt  $\pm 1$  °C. Mõõtmised tuleks eelistatult teha 20 °C juures.

Kui kahtlustatakse tugevat sõltuvust temperatuurist, tuleb määramised teha veel vähemalt kahel temperatuuril. Sellisel juhul peaksid temperatuuri intervallid olema 10 °C ja temperatuuri reguleerimise täpsus  $\pm 0,1$  °C.

*Analüüsid*

Meetodi valimine sõltub uuritava aine omadustest. Meetod peab olema piisavalt tundlik, et võimaldada aine eri vormide määramist igal uuritava lahuse kontsentratsioonil.

**Katse käik***Tiitrimismeetod*

Uuritavat lahust tiitritakse, vastavalt vajadusele kas aluse või happe standardlahusega, ning pH määratakse pärast iga titrandikoguse lisamist. Enne ekvivalentuspunkti saavutamist tuleb lisada vähemalt 10 titrandikogust. Kui tasakaal saavutatakse piisavalt kiiresti, võib kasutada registreerivat potentsiomeetrit. Selle meetodi puhul peavad nii aine üldkogus kui ka kontsentratsioon olema täpselt teada. Tuleb kasutada ettevaatusabinõusid, et välistada süsinikdioksiidi juurdepääs. Katse läbiviimise üksikasjad, ettevaatusabinõud ja arvutused on esitatud standardkatsete kirjeldustes (vt näiteks viited 1–4).

*Spektrofotomeetriline meetod*

Määratakse lainepikkus, mille juures ioniseeritud ja ioniseerimata vormi ekstinktsioonikoefitsiendid on märgatavalt erinevad. Määratakse muutumatu kontsentratsiooniga lahuste UV- või nähtava valguse neeldumisspekter pH eri väärtustel, millel aine on peamiselt ioniseerimata, on täielikult ioniseeritud, ning veel mitmel vahepealsel pH väärtusel. Seda võib teha kas kontsenteeritud happe (aluse) väikese ruumalaliste koguste lisamisega uuritava aine lahuse suhteliselt suurele ruumalalisele kogusele paljukromponendilises puhvril, mis on algul väikese (suure) pH-ga (viide 5), või uuritava aine põhilahuse (nt vees, metanoolis) võrdses ruumalal lisamisega muutumatu ruumalaga eri puhverlahustele, mille pH väärtused katavad kogu soovitud pH-vahemiku. pH väärtustest ja neeldumise väärtustest valitud lainepikkusel arvutatakse piisav arv  $pK_a$  väärtusi, kasutades andmeid, mis on saadud vähemalt viiel pH väärtusel, millel aine on vähemalt 10 % ja vähem kui 90 % ioniseeritud. Katse täiendavad üksikasjad ja arvutamismeetod on esitatud viites 1.

▼ **M7***Konduktomeetriline meetod*

Kasutades väikese ja teadaoleva konstandiga juhtivusandurit, mõõdetakse konduktomeetriaks sobivas vees lahustatud uuritava aine ligikaudu 0,1 M lahuse juhtivus. Mõõdetakse ka rea sellest lahusest täpselt valmistatud lahjenduste juhtivuse väärtused. Iga lahjendusega vähendatakse kontsentratsiooni poole võrra ja seeria peaks hõlmama vähemalt üht kontsentratsiooni suurusjärku. Määratakse ka juhtivuse piirväärtus lõpmatul lahjendusel; selleks tehakse samasugune katse naatriumisoolaga ja ekstrapoleeritakse. Seejärel võib iga lahuse juhtivusest arvutada Onsageri võrrandi abil dissotsiatsioonistme ja selle alusel arvutada Ostwaldi lahjenduseaduse abil dissotsiatsioonikonstandi  $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ , kus C on molaarne kontsentratsioon (mol/l) ja  $\alpha$  on aine dissotsieerunud fraktsioon. Tuleb kasutada ettevaatusabinõusid, et välistada CO<sub>2</sub> juurdepääs. Täiendavad katse üksikasjad ja arvutamismeetod on esitatud alustekstides ning viidetes 1, 6 ja 7.

## ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

**Tulemuste töötlemine***Tiitrimismeetod*

pK<sub>a</sub> arvutatakse tiitrimiskõvera 10 mõõdetud punkti järgi. Arvutatakse selliste pK<sub>a</sub>-de keskvärtus ja standardhälve. Andmed esitatakse tabelina ja koostatakse graafik pH sõltuvuse kohta aluse või happe standardlahuse lisatud ruumalast.

*Spektrofotomeetrilised meetodid*

Iga spektri kohta esitatakse tabelis neelduvus ja pH. Arvutatakse vähemalt viis väärtust pK<sub>a</sub> jaoks vahepealsetest spektriandmepunktidest; nendest väärtustest arvutatakse veel keskvärtus ja standardhälve.

*Konduktomeetriline meetod*

Arvutatakse ekvivalentjuhtivus  $\Lambda$  happe iga kontsentratsiooni jaoks ja sellise segu iga kontsentratsiooni jaoks, mille saamiseks segatakse üks ekvivalent hapet ja 0,98 ekvivalenti karbonaativaba naatriumhüdrosiidi. Hape on liias, et vältida hüdrolüüsi tõttu tekkivat OH<sup>-</sup> liiga. Tehakse graafik teljestikus  $1/\Lambda$  ja  $\bar{O}_C$  ning soola  $\Lambda_o$  saab sellest leida ekstrapoleerimisega kontsentratsioonile 0.

Happe  $\Lambda_o$  saab arvutada kirjanduses esitatud H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> väärtustest. pK<sub>a</sub> saab arvutada tulemustest  $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$  ja iga kontsentratsiooni  $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ . K<sub>a</sub> täpsemad väärtused saadakse siis, kui viiakse sisse ka liikuvust ja aktiivsust arvestavad parandid. Tuleb arvutada ka pK<sub>a</sub> väärtuste keskvärtus ja standardhälve.

**Katseprotokoll**

Kõik saadud töötlemata andmed ja arvutatud pK<sub>a</sub> väärtused tuleb esitada koos arvutamismeetodiga eelistatult tabelina, nagu on soovitatud viites 1, samuti tuleb esitada eespool kirjeldatud statistilised parameetrid. Tiitrimismeetodite puhul tuleb esitada titrantide standardimise üksikasjad.

Spektrofotomeetrilise meetodi puhul tuleb esitada kõik spektrid. Konduktomeetrilise meetodi puhul tuleb esitada konduktomeetri konstandi määramise üksikasjalik kirjeldus. Esitada tuleb ka kasutatud meetodit, analüüsimeetodeid ja kõiki kasutatud puhvreid käsitlev teave.

Tuleb esitada katse temperatuur(id).

## KIRJANDUS

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.



**▼ M7**

- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).
- (3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
- (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
- (6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (vt eespool (4)).
- (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

**▼B****B OSA: MÜRGISUSE JA MUUDE TERVISEMÕJUDE MÄÄRAMISE  
MEETODID**

## SISUKORD

## ÜLDINE SISSEJUHATUS

- B.1a. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR
- B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISU-SASTME MEETOD
- B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL
- B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)
- B.4. ÄGE NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS
- B.5. SILMADE ÄGE ÄRRITUS/SÖÖVITUS
- B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE
- B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL
- B.8. SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE UURING
- B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)
- B.10. *IN VITRO* KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJARAKKUDEGA
- B.11. KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIGA
- B.12. MIKROTUUMADE TEKKE KATSE IMETAJATE ERÜTROT-SÜÜTIDEGA
- B.13/14. MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÖÖRDMUTATSIOONKATSE
- B.17. HPRT VÕI XPRT GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA
- B.21. IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*
- B.22. DOMINANTSE LETAALSE MÕJU KATSE NÄRILISTEGA

**▼B**

- B.23. KROMOSOOMIABERRATSIOONIKATSE IMETAJATE SPERMATOGOONIDEGA
- B.25. HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON
- B.26. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING NÄRILISTEL
- B.27. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING MITTENÄRILISTEL
- B.28. SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIKIDEL
- B.29. SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 90-PÄEVANE UURING
- B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD
- B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS
- B.32. KANTSEROGEENSUSE UURINGUD
- B.33. KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSEROGEENSUSE UURING
- B.34. ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING
- B.35. KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE UURING
- B.36. TOKSIKOKINEETIKA
- B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT KOKKUPUUTUMIST
- B.38. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE KORDUSDOOSI UURING
- B.39. PLAANIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*
- B.40. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: TRANSKUTAANSE ELEKTRITAKISTUSE (TET) MÖÖTMISEL PÕHINEV KATSEMEETOD
- B.40b. *IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD
- B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE
- B.42. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE

**▼B**

- B.43. NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL
- B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD
- B.45. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD
- B.46. *IN VITRO* NAHAÄRRITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD
- B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA
- B.48. ISOLEERITUD KANASILMA KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA
- B.49. MIKROTUUMADE TEKKE *IN VITRO* KATSE IMETAJARAKKUDEGA
- B.50. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: DA
- B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: BRDU-ELISA
- B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD
- B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING
- B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS
- B.55. HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÕELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS
- B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING
- B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE
- B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE
- B.59. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN CHEMICO*: OTSENE REAKTSIOONIVÕIME KATSE PEPTIIDIDEGA (*DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY*, DPRA)
- B.60. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: ARE-NRF2 LUTSIFERAASI KATSEMEETOD
- B.61. FLUORESTSEIINI LEKKE KATSEMEETOD SILMI SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS
- B.62. LEELISELINE *IN VIVO* KOMEEDIKATSE IMETAJARAKKUDEGA

**▼B**

- B.63. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURING
- B.64. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURINGUT HÕLMAV KORDUVANNUSTAMISEL PÕHINEV MÜRGISU-SUURING
- B.65. *IN VITRO* MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETOD NAHA-SÖÖVITUSE UURIMISEKS
- B.66. STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA TRANSAKTIVATSIOONI *IN VITRO* KATSEMEETODID, MILLEGA AVASTATAKSE ÖSTROGEENIRETSEPTORITE AGONISTE JA ANTAGONISTE
- B.67. TÛMIDIINI KINAASI GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENI-MUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA
- B.68. LÛHIAJALISE KOKKUPUUTE *IN VITRO* KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA
- B.69. REKONSTRUEERITUD INIMESE SARVKESTA SARNASE EPITEELI (RhCE) KATSEMEETOD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA
- B.70. REKOMBINANTSEL INIMESE ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (hrER) PÕHINEVAD *IN VITRO* ANALÛSIMEETODID ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS
- B.71. NAHA SENSIBILISEERIMISE *IN VITRO* KATSED, MILLEGA UURITAKSE DENDRIITRAKKUDE AKTIVEERIMISEGA SEOTUD OLULIST ETAPPI NAHA SENSIBILISEERIMISES SEISNEVA KAHJULIKU TOIME RAJAS

**▼B**

## ÜLDINE SISSEJUHATUS

## A. UURITAVA AINE ISELOOMUSTUS

Uuritava aine koostis, sealhulgas peamised lisandid ja selle vastavad füüsikalised-keemilised omadused (sealhulgas stabiilsus), peaksid olema teada enne toksilisuse uuringu alustamist.

Uuritava aine füüsikalised-keemilised omadused annavad olulist teavet manustamisviisi valimise, iga konkreetse uuringu kavandamise ning uuritava aine käitlemise ja säilitamise jaoks.

Doseeritavas aines ja bioloogilises materjalis oleva uuritava aine (sealhulgas võimaluse korral peamiste lisandite) kindlakstegemiseks kasutatav kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüsimeetod tuleks välja töötada enne uuringu alustamist.

Katsearuanne peaks hõlmama kogu teavet uuritava aine identifitseerimise, selle füüsikalised-keemilised omaduste, selle puhtuse ja käitumise kohta.

## B. LOOMADE HOOLDAMINE

Toksilisuse uurimisel on oluline keskkonnatingimuste range kontroll ja õiged loomade hooldamise viisid.

i) *Pidamistingimused*

Katsealuste loomade ruumide või piirdeaedade keskkonnatingimused peaksid olema katseliikide jaoks sobivad. Rottide, hiirte ja merisigade puhul on sobiv toatemperatuur  $22 \pm 3$  °C ning suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %; küülikute puhul peaks temperatuur olema  $20 \pm 3$  °C ning suhteline õhuniiskus 30–70 %.

Mõned uurimismeetodid on temperatuuri suhtes eriti tundlikud ning sellistel puhkudel on sobivate temperatuuritingimuste üksikasjad lisatud uurimismeetodi kirjeldusse. Kõikide toksilise toime uuringute puhul tuleks jälgida temperatuuri ja niiskust, samuti tuleks need andmed registreerida ning uuringu lõpparuandesse lisada.

Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valget ja 12 tundi pimedat aega. Valgustustsükli üksikasjad tuleks registreerida ja märkida uuringu lõpparuandesse.

Kui meetodis ei ole teisiti sätestatud, võib loomi pidada üksikult või väikeste rühmadena, kus emas- ja isasloomad on eraldi; kui puuris on mitu looma, ei tohiks koos olla rohkem kui viis looma.

Loomkatsete aruannetes on oluline ära märkida, millist tüüpi puure kasutati ning mitu looma igas puuris nii keemilise ainega kokkupuutumise kui ka järgneva vaatlusperioodi jooksul oli.

**▼B**ii) *Söötistingimused*

Toiduvalik peaks vastama kõikidele katses kasutatava liigi toitainevajadustele. Kui uuritavat ainet manustatakse loomadele toidu kaudu, võib toidu toiteväärtust vähendada vastava uuritava aine ja toidukomponendi võrra. Sellise reaktsiooni võimalikkust tuleks katse tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Kasutada võib ka tavapärasel katseloomadele mõeldud toitu ning joogivee hulk peab olema piiramatult. Toidu valikut võib mõjutada vajadus tagada sobiv segu, mis võimaldab uuritava aine manustamist koos toiduga.

Toksilisust mõjutavaid toidu saasteaineid ei tohiks olla sellises kontsentratsioonis, et see segaks katse tegemist.

C. **ALTERNATIIVSED KATSED**

Euroopa Liit püüab edendada alternatiivmeetodite väljatöötamist ja kinnitamist, mis annaksid loomkatsetest saadud teabega tasemelt samaväärset teavet, kuid kus kasutatakse vähem loomi ja mis põhjustaksid vähem kannatusi või milles välditakse üldse loomade kasutamist.

Selliste meetodite olemasolu korral tuleb neid kasutada igal võimalusel ohu kirjeldamisel ja seejärel loomumase ohtlikkuse liigitamisel ja märgistamisel.

D. **HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Katsete hindamisel ja tõlgendamisel tuleb arvesse võtta seda, millisel määral on loomkatsete ja *in vitro* uuringute tulemusi võimalik ekstrapoleerida vahetult inimesele, ning seetõttu võib võimaluse korral kasutada katse tulemuste kinnitamiseks tõendeid kahjulikust toimest inimese tervisele.

E. **VIITED KIRJANDUSELE**

Enamik nendest meetoditest on töötatud välja OECD programmi „Testing Guidelines” raames ning neid tuleks kasutada kooskõlas heade laboritavadega, et tagada võimalikult laialdane „andmete vastastikune heakskiitmine”.

Lisateavet võib leida OECD suunistes olevatest viidetest ja muust asjakohasest kirjandusest.

**▼B****B.1 a. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD TG 420ga (2001).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Traditsioonilised ägeda mürgisuse hindamise meetodid kasutavad loomade surma lõpetamiskriteeriumina. 1984. aastal soovitas British Toxicology Society uut lähenemist ägeda mürgisuse katsetamisele, mis põhineb aine manustamisel kindla annusemääraga seeriana (1). See lähenemine vältis loomade surma kasutamist lõpetamiskriteeriumina ja tugines selle asemel selgete mürgisuse nähtude vaatlemisele ühel seeriast valitud kindlal annusemääral. Protseduur kiideti katsemeetodina heaks 1992. aastal Ühendkuningriigi (2) ja rahvusvaheliste (3) *in vivo* valideerimiste põhjal. Seejärel hinnati kindla annuse protseduuri statistilisi omadusi matemaatiliste mudelite abil mitmetes uuringutes (4, 5, 6). *In vivo* ja mudeluuringud on tõestanud, et protseduur on korratav, et selles kasutatakse vähe loomi ja et see põhjustab vähem kannatusi kui traditsioonilised meetodid ning et selle abil saab klassifitseerida ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetoditega.

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katsete juhisdokumendist („Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing” (7)). Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet katsemeetodi B.1a kasutamise ja tõlgendamise kohta.

Meetodi põhimõte on, et põhiuuringus kasutatakse üksnes mõõdukalt mürgiseid annuseid ja et tõenäoliselt surmavate annuste manustamist tuleks vältida. Samuti ei tohiks manustada annuseid, mis teatavasti põhjustavad märkimisväärset valu või kannatusi sööbivate või tõsiselt ärritavate mõjude tõttu. Suremas loomad või loomad, kes ilmselt on valus või kellel on tugeva ja kestva kannatuse tunnused, surmatakse humaanselt ning need võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu loomi, kes surid katse käigus. Eraldi juhisdokumendis (8) on esitatud kriteeriumid, mille põhjal tehakse otsus suremas või raskelt kannatavate loomade surmamiseks, ja juhised prognoositava või ähvardava surma kindlakstegemiseks.

Meetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida ainet ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimiseks vastavalt globaalselt harmoneeritud süsteemile (Globally Harmonised System – GHS (9)).

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nimetust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalisi-keemilisi omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähteannust.



**▼B**

## 1.2. MÕISTED

**Äge suukaudne mürgisus** – viitab sellistele kahjulikele mõjudele, mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

**Edasilükkunud surm** – loom ei sure ega näi olevat suremas 48 tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi jooksul.

**Annus** – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

**Ilmne mürgisus** – üldine mõiste, mis kirjeldab katseaine manustamise järel ilmnunud selgeid mürgisuse tunnuseid (vt näiteid viitest 3). Suuruselt järgmine kindel annus võib põhjustada enamikul loomadest tõenäoliselt kas tugevat valu ja kestva tugeva kannatuse tunnuseid, surmaeelset seisundit (kriteeriumid on toodud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)) või tõenäoliselt surma.

**GHS** – Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalised-keemilised omadused) ja ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm (IOMC).

**Ähvardav surm** – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Närilistel võiks sellisele seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine, loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

**LD<sub>50</sub> (surmava annuse mediaan)** – aine statistiliselt määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel manustamisel surma 50 %-l loomadest. LD<sub>50</sub> väärtust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

**Piirannus** – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele (2 000 või 5 000 mg/kg).

**Surmaeelne seisund** – loomad, kes on suremas või kes ei suuda ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

**Ennustatav surm** – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis viitavad sellele, et surm saabub teatud aja möödumisel enne katse kavandatavat lõppu, näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

**▼B**

## 1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ühesooliste loomade rühmadele annustatakse katseainet järk-järgult 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg kindlate annustena (erandkorras võidakse kasutada 5 000 mg/kg kindlat lisaannust, vt punkti 1.6.2). Esialgne annusemäär valitakse eelkatse põhjal annusena, mis eeldatavasti põhjustab mõningaid mürgisuse nähte, kuid ei põhjusta tõsiseid toksilisi mõjusid või suremust. Valu, kannatuse ja ähvardava surmaga seotud kliinilisi tunnuseid ja tingimusi kirjeldatakse üksikasjalikult OECD juhisdokumendis (8). Järgnevatele loomarühmadele võib annustada kaitseaine suuremaid või väiksemaid kindlaid annuseid sõltuvalt sellest, kas neil on olemas või puuduvad märgid mürgisuse või suremuse kohta. Käesolevat protseduuri jätkatakse seni, kuni on kindlaks tehtud tõenäoliselt mürgisust põhjustav annus või surmajuhtum, või kui suurim annus ei avalda mõju või kui väikseim annus põhjustab surma.

## 1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Loomaliikide valik

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (7). Selle põhjuseks on, et tavapäraseid LD<sub>50</sub> katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui erinevusi on täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (10). Kui struktuurselt samalaadsete kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokineetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse sooritatakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 20\%$  varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

## 1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C ( $\pm 3$  °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, peaks eesmärk olema hoida seda vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

## 1.4.3. Loomade ettevalmistamine

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puurides vähemalt 5 päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

**▼B****1.4.4. Annuste valmistamine**

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil. See on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi manustamisel ületada annuse suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta; vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuse valmistise koostamiseks on soovitatav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

**1.5. PROTSEDUUR****1.5.1. Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseaine. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutada vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

**1.5.2. Eelkatse**

Eelkatse eesmärk on võimaldada valida põhiuuringu tarbeks sobiv lähteannus. Katseainet manustatakse üksikutele loomadele järk-järgult lisas 1 toodud vooskeemide kohaselt. Eelkatse on lõpetatud siis, kui saab langetada otsuse põhikatse lähteannuse kohta (või kui tuvastatakse surm madalaima kindla annuse puhul).

Eelkatse lähteannus valitakse kindlate annusmäärade 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg hulgast annusena, mis eeldatavasti põhjustab ilmselt mürgisust, mis võimaluse korral põhineb sama kemikaali või struktuuriselt sarnaste kemikaalidega sooritatud *in vivo* ja *in vitro* katsete andmetel. Sellise teabe puudumise korral on lähteannuseks 300 mg/kg.

Iga looma korral on manustamiste vahel vähemalt 24tunnine vahemik. Kõiki loomi jälgitakse vähemalt 14 päeva.

**▼B**

Maksimaalset kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 3. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soovitud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000–5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmiseks.

Juhul kui loom, kelle peal katsetati madalaimat kindla annuse määra (5 mg/kg), eelkatse käigus sureb, on tavapäraseks toiminguks uuringu peatamine ja aine klassifitseerimine GHS 1. kategooriasse (nagu on näidatud 1. lisas). Kui on siiski nõutav klassifitseerimise täiendav kinnitamine, võib teha järgmise valikulise lisaprotseduuri. Teisele loomale manustatakse annus 5 mg/kg. Kui teine loom sureb, siis kinnitab see GHS 1. kategooriat ja katse lõpetatakse kohe. Kui teine loom jääb ellu, siis manustatakse maksimaalselt kolmele täiendavale loomale annus 5 mg/kg. Kuna suremuse risk on suur, tuleb ainet manustada kõnealustele loomadele üksikshaaval, et tagada nende heaolu. Ajavahemik igale loomale annuse manustamise vahel peab olema piisav selleks, et eelmine loom jääks tõenäoliselt ellu. Kui teine loom sureb, lõpetatakse viivitamata annustamine ja rohkematele loomadele doose ei manustata. Kuna teise surma juhtum (olenemata uuritud loomade arvust katse lõpetamise hetkel) kuulub tulemuse kategooriasse A (kaks või enam surma), järgitakse 5 mg/kg fikseeritud annuse puhul 2. lisas toodud klassifitseerimisreeglit (1. kategooria, kui on kaks või enam surmajuhtumit, või 2. kategooria, kui on vaid üks surmajuhtum). Lisaks sellele antakse 4. lisas juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

### 1.5.3. Põhiuuring

#### 1.5.3.1. Loomade arv ja annusemäärad

Lähteannuse tasemel katsete tegemise järel võetavad meetmed on esitatud 2. lisas toodud vooskeemides. Üks kolmest meetmest on nõutav; kas katse peatamine või sobiva ohuklassi määramine, katse sooritamine suurema kindla annusega või väiksema kindla annusega. Loomade kaitsmiseks ei kasutata põhiuuringus uuesti eelkatses surma põhjutanud annusemäära (vt 2. lisa). Kogemused on näidanud, et kõige tõenäolisem tulemus läheannuse tasemel on see, et ainet on võimalik klassifitseerida ja täiendavaid katseid ei ole vaja teha.

Igal uuritava annusemäära korral kasutatakse tavaliselt kokku viit ühest soost looma. Nende viie looma hulka kuulub üks loom eelkatses, kellele manustati valitud annusemääradele vastav annus, ja veel neli looma (v.a harvaesineval juhul, kui põhiuuringus kasutatav annusemäär ei sisaldunud eelkatses).

Annustamistevaheline ajavahemik iga annusemäära korral määratakse kindlaks mürgisuse tunnuste ilmnemise, kestuse ja ägeduse järgi. Järgmise annuse manustamist tuleb edasi lükata, kuni juba doosi saanud loomade ellujäämine on kindel. Vajaduse korral soovitatakse annustamistevaheliseks ajaks jätta iga annusemäära puhul 3 või 4 päeva, et võimaldada jälgida viivitud mürgisust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.

**▼ B**

Kui kasutatakse kõrgeimat kindlat annust 5 000 mg/kg, tuleks järgida 3. lisas esitatud protseduuri (vt ka punkti 1.6.2).

**1.5.3.2. Piirsalduskatse**

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus katse tegijal on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid või segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või mil katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Käesoleva juhise kohase piirkatsena võidakse tavalist protseduuri kasutades kasutada eelkatset, mille lähteannus on 2 000 mg/kg (või erandkorras 5 000 mg/kg), mille järel manustatakse veel neljale loomale sama annus.

**1.6. VAATLUSED**

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese 4 tunni jooksul ja seejärel iga päev, kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt nende heaolu pärast või kui loomad leitakse surnuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski jäigalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seega vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisusnähud võivad ilmuda hilistumisega (11). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

Täiendavad vaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karvkattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud väärinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (8). Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

**1.6.1. Kehamass**

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellujäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

**▼ B****1.6.2. Patoloogia**

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esiolgu annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

**2. ANDMED**

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahangu tehtud leiud.

**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama vastavalt vajadusele järgmist teavet.

Katseaine:

- füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerumine);
- identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;
- loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

Katsetingimused:

- katseaine valmistamise üksikasjalikud andmed, sh üksikasjalikud andmed manustatava aine füüsilise oleku kohta;
- katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;
- üksikasjalikud andmed toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- põhjendus lähteannuse valikuks.

**▼B**

Tulemused:

- tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgistustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;
- tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;
- iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;
- surma kuupäev ja kellaaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;
- iga looma korral mürgistusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;
- iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

Järeldused.

4. **VIITED**

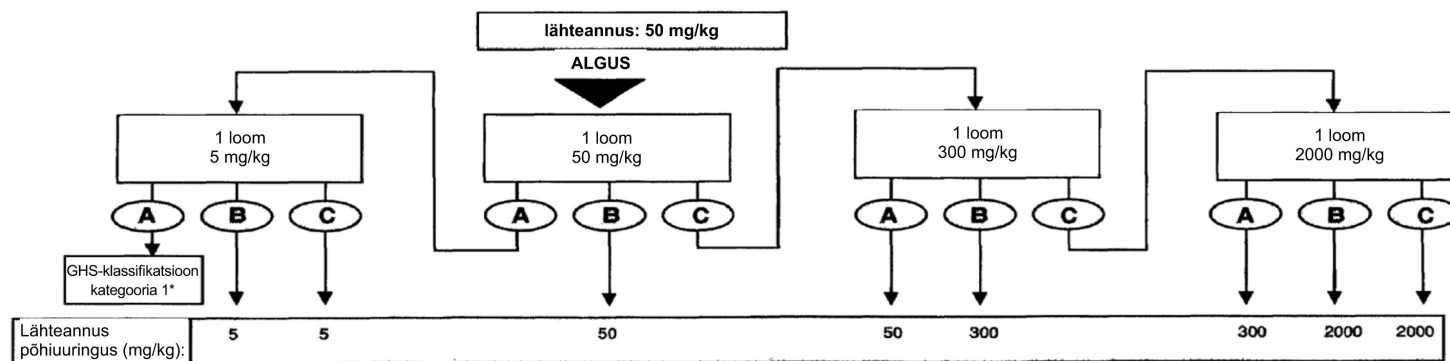
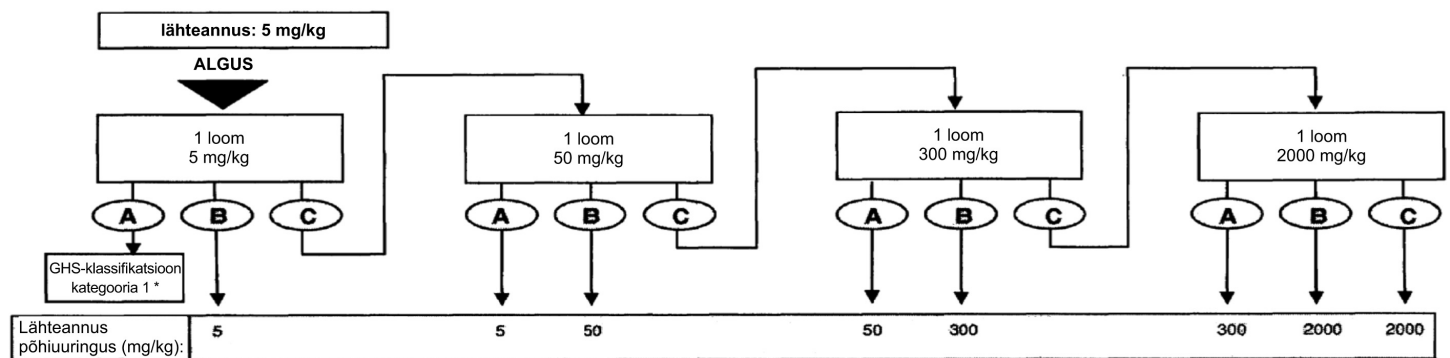
- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85–92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279–291.
- 3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Felling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469–482.
- 4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313–324.
- 5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315–323. *Human Exptl. Toxicol.*
- 6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183–196.
- 7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Pariis
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

**▼ B**

- 9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.Org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P, Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223–231.
- 11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3<sup>rd</sup> Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.



## EELKATSE VOOSKEEM



Tulemus

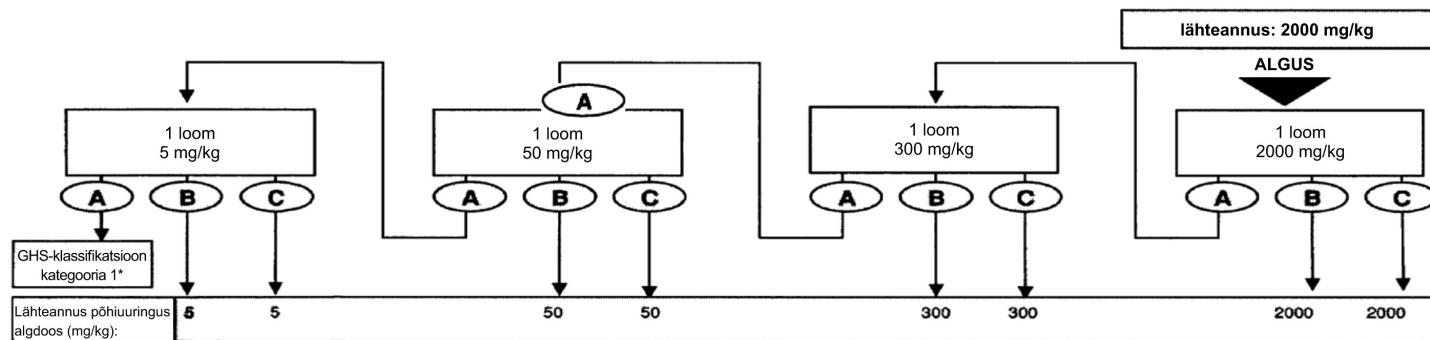
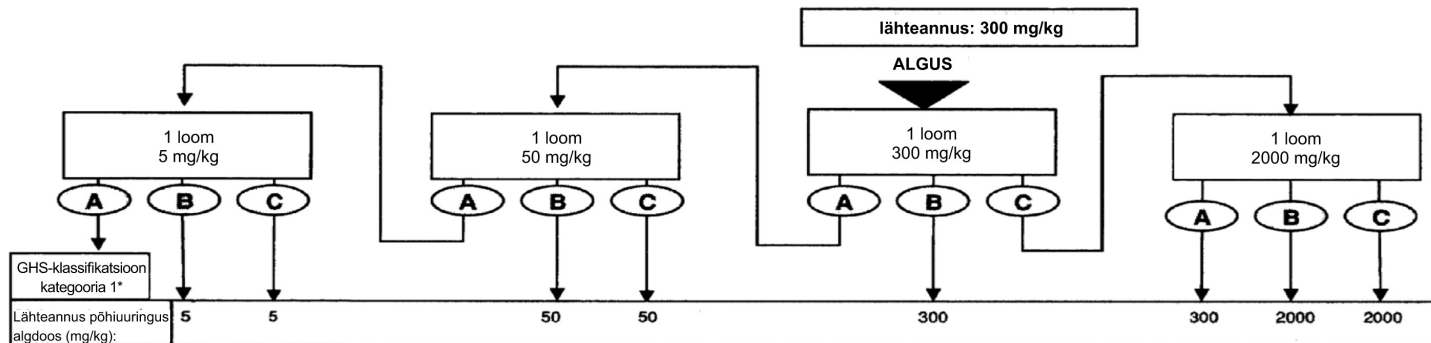
**A** surm

**B** ilmne mürgisus

**C** ei esine ilmselt mürgisust ega surma

\* tulemuse **A** korral 5 mg/kg annusega  
võidakse kasutada valikulist täiendavat menetlust GHS-  
klassifikatsiooni kinnitamiseks: vt punkt 1.5.2

▼B



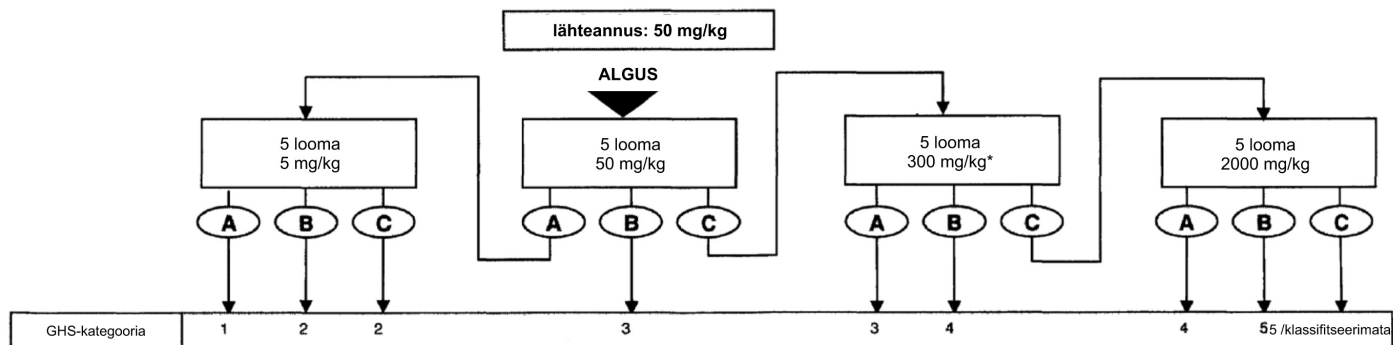
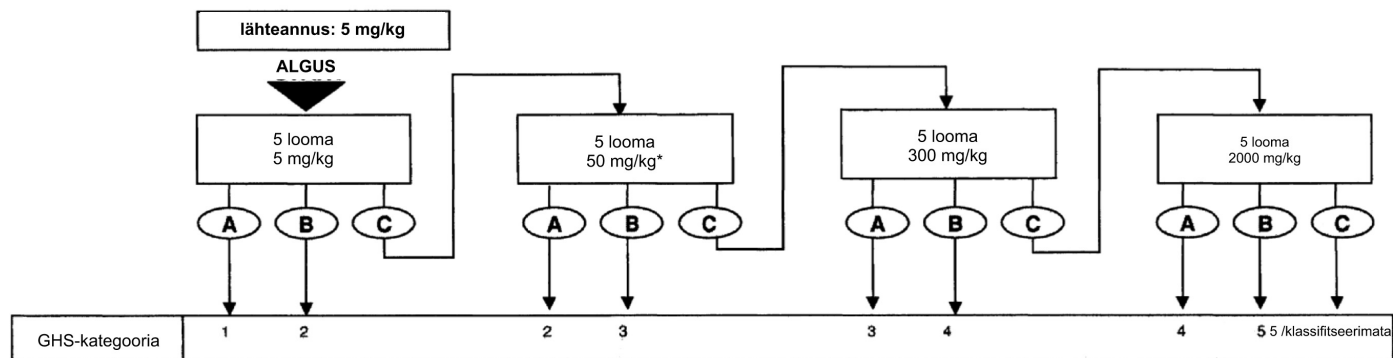
Tulemus

A	surm
B	ilmne mürgisus
C	ei esine ilmset mürgisust ega surma

\* tulemuse **A** korral 5 mg/kg annusega võidakse kasutada valikulist täiendavat protseduuri GHS-klassifikatsiooni kinnitamiseks: vt punkt 1.5.2

2. LISA

PÕHIUURINGU VOOSKEEM



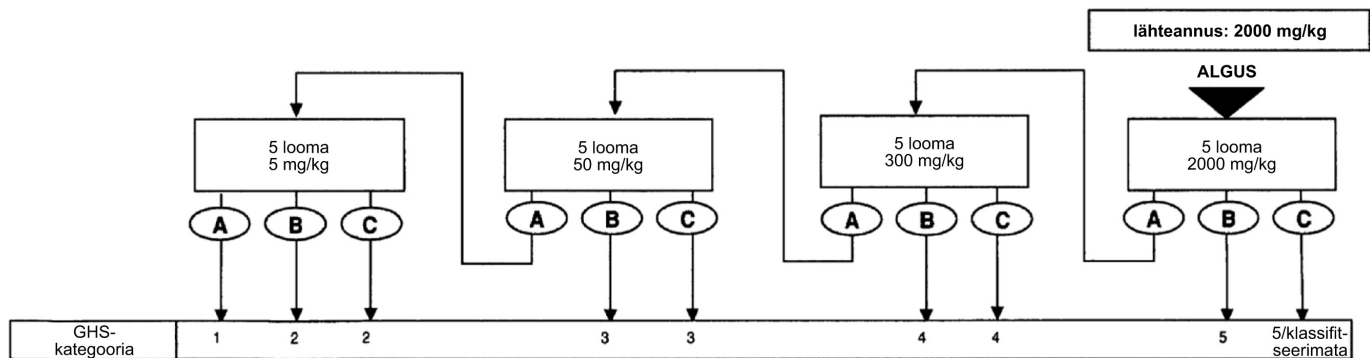
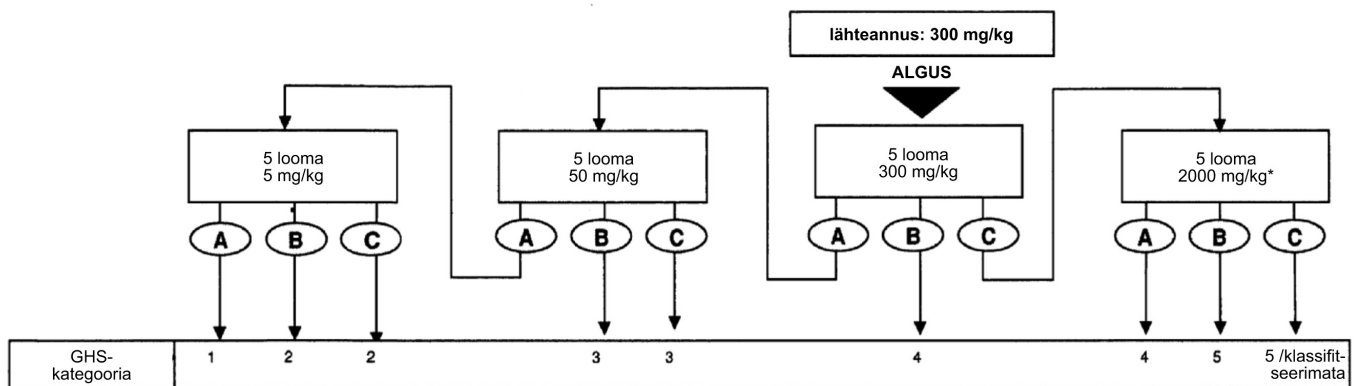
Tulemus

<b>A</b>	≥ 2 surma
<b>B</b>	≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm
<b>C</b>	ei esine ilmselt mürgisust ega surma

Rühma suurus  
Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni eelkatses samal annusemääral uuritud loom.

\* Loomade heaolu on esmajärguline  
Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse **A** juurde

▼B



<u>Tulemus</u>	
(A)	≥ 2 surma
(B)	≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm
(C)	ei esine ilmset mürgisust ega surma

Rühma suurus  
 Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni eelkatses samal annusemääral uuritud loom.

\* Loomade heaolu on esmajärguline  
 Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse (A) juurde.



### 3. Lisa

#### KRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KLASSIFITSEERIMISE JAOKS, MILLE KORRAL OODATAVAD LD<sub>50</sub> VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA UURIDA

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt madal, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete LD<sub>50</sub> väärtused on oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või naha-kaudsel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside korral. Katseained võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (GHS-kategooria 5), järgmistel juhtudel:

- a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisa 2 toodud mis tahes katsekava korral, mis põhineb surmajuhtumitel;
- b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD<sub>50</sub> väärtus asub kategooriale 5 vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;
- c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja

— usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või

— kui täheldatakse suuremat suukaudse manustamisega katsetes kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni või

— kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahutus, piloereksioon või hoollitsemata välimus, või

— kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärtete ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

#### KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA

Maksimaalset kindlat annust 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega. Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta katsetamist annustega 5 000 mg/kg heaks ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (9).

#### Eeluuring

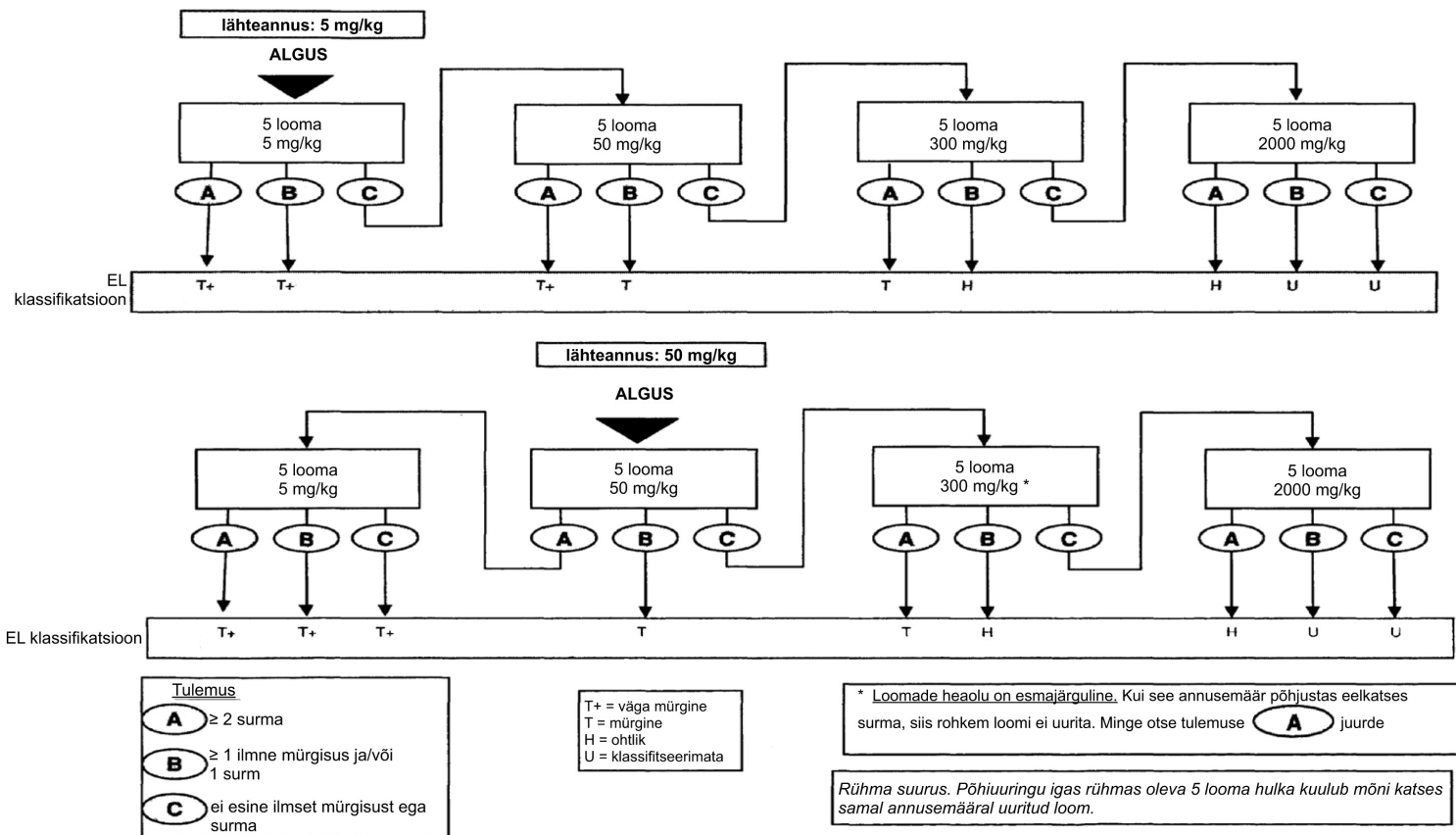
1. lisa esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse eeluuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A (surm) teise looma korral katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemused B ja C (ilmne mürgisus või ei esine mürgisust) lubavad valida põhiuuringus lähteannuseks 5 000 mg/kg. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus B või C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, on põhiuuringus lähteannuseks 2 000 mg/kg. Kui tulemuseks saadaks B ja C, on põhiuuringus aldoosiks lähteannuseks 5 000 mg/kg.

**▼B****Põhiuuring**

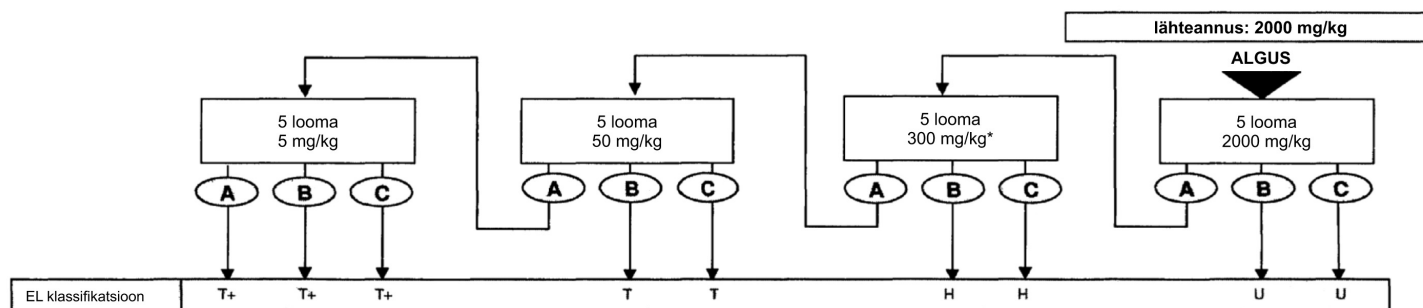
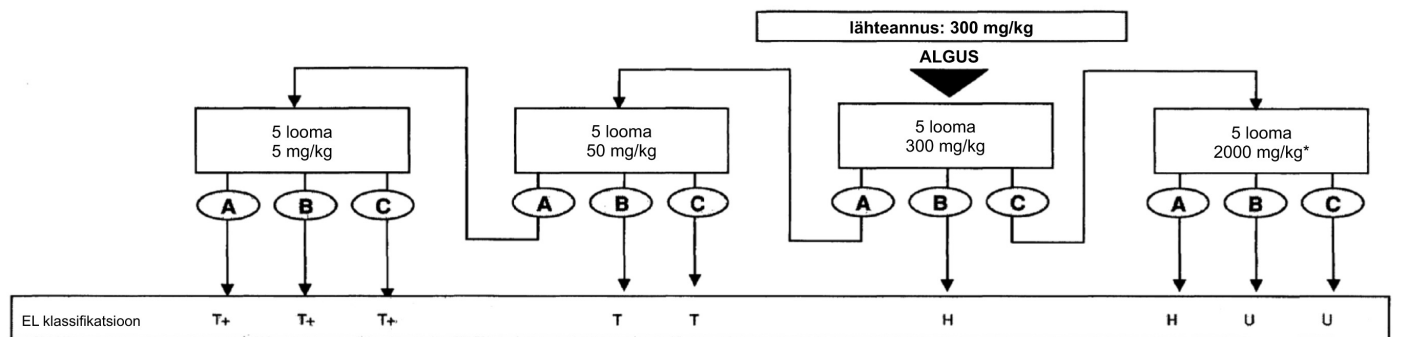
2. lisas esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse põhiuuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A ( $\geq 2$  surma) teise rühmaga katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemuste B (ilmne mürgisus ja/või  $\leq 1$  surm) või C (ei esine mürgisust) puhul on tulemuseks see, et ainet ei klassifitseerita vastavalt GHSile. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, klassifitseeritakse aine GHS 5. kategooriasse. Tulemuste B või C puhul jääb aine klassifitseerimata.

KATSEMEETOD B.1a

EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperioodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viites (8))



▼B



**Tulemus**

**A** ≥ 2 surma

**B** ≥ 1 ilme mürgisus ja/või 1 surm

**C** ei esine ilmselt mürgisust ega surma

T+ = väga mürgine  
 T = mürgine  
 H = ohtlik  
 U = klassifitseerimata

**Loomade heaolu on esmajärguline**  
 Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse **A** juurde

\* **Rühma suurus**  
 Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni katses samal annusemääral uuritud loom.



**▼B****B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISUSASTME MEETOD****1. MEETOD**

See katsemeetod on samaväärne OECD TG 423ga (2001).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolevas katses sätestatud ägeda mürgisusastme meetod (1) on astmeline meetod, mille igal etapil kasutatakse kolme samast soost looma. Olenevalt loomade suremusest ja/või sellest, kas loomad on suremas, on katseaine ägeda mürgisuse hindamiseks vaja keskmiselt 2–4 etappi. Käesolev protseduur on korratav, selles kasutatakse väga vähe loomi. Selle abil võidakse järjestada ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetodite puhul. Ägeda mürgisusastme meetod põhineb biomeetrilistel hindamistel (2, 3, 4, 5), kus kasutatakse kindlaid annuseid, mis on üksteisest piisavalt eraldatud aine klassifitseerimise eesmärgil ja ohu hindamiseks. 1996. aastal vastuvõetud meetodit valideeriti ulatuslikult *in vivo*, võrreldes kirjandusest saadud LD<sub>50</sub> väärtusi käsitlevaid andmeid nii riiklikul (6) kui ka rahvusvahelisel tasandil (7).

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katseid käsitlevast (8) juhisdokumentidist. Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet B.1b katsemeetodi rakendamise ja tõlgendamise kohta.

Katseaineid ei ole vaja manustada annustes, mis teadaolevalt põhjustavad märkimisväärset valu ja kannatusi sööbiva või tugeva ärritava toime tõttu. Suremas olevad loomad ja loomad, kes kannatavad ilmselgelt valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks surmata humaanselt; need loomad võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu katse käigus surnud loomi. Eraldi juhisdokumentis (9) on esitatud kriteeriumid, mille alusel tehakse otsus suremas olevate või tõsiselt kannatavate loomade surmamise kohta, ning juhised prognoositava või ähvardava surma äratundmiseks.

Meetod kasutab kindlaks määratud annuseid ja tulemused võimaldavad aineid järjestada ja klassifitseerida vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale globaalselt harmoneeritud süsteemile (10).

Põhimõtteliselt ei ole meetod ette nähtud võimaldama arvutada täpset LD<sub>50</sub> annust, kuid võimaldab kindlaks määrata määratletud kokkupuutevahemikku, kus suremus on eeldatav, kuna käesoleva katse põhipunkt on endiselt see, et osa loomi sureb. Meetod võimaldab kindlaks määrata LD<sub>50</sub> väärtuse üksnes siis, kui vähemalt kaks annust põhjustavad suremuse, mis on 0 %st suurem ja 100 %st väiksem. Tänu kindlaksmääratud annuste valikule sõltumata katseainest, ja klassifitseerimise selgelt väljendatud seosele erinevas seisundis täheldatud loomade arvuga on laborite aruanded järjepidevamad ja korratavamad.

**▼B**

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nime-  
tust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalise-keemilise omadusi,  
muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tule-  
musi, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine  
eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste  
veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks ja  
aitab valida sobivat lähteannust.

## 1.2. MÕISTED

**Äge suukaudne mürgisus** – viitab sellistele kahjulikele mõjudele,  
mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse  
annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

**Edasilükkunud surm** – loom ei sure ega näi olevat suremas 48  
tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi  
jooksul.

**Annus** – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katse-  
aine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

**GHS** – Globally Harmonised Classification System for Chemical  
Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt  
harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles  
osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu  
käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalise-keemilised omadused) ja  
ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide  
mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm  
(IOMC).

**Ähvardav surm** – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne  
järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Närilistel võiksid sellisele  
seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine,  
loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9)).

**LD<sub>50</sub> (surmava suukaudse annuse mediaan)** – aine statistiliselt  
määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel  
manustamisel surma 50 %l loomadest. LD<sub>50</sub> väärtust väljendatakse  
katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

**Piirannus** – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele  
(2 000 või 5 000 mg/kg).

**Surmaeelne seisund** – loomad, kes on suremas või kes ei suuda  
ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid  
lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9)).

**Ennustatav surm** – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis  
viitavad sellele, et surm saabub teatud aja pärast enne katse kavan-  
datavat lõppu; näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikas-  
jalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas  
juhisdokumendis (9)).

**▼B**

## 1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Tuginedes protseduurile, mille kohaselt kasutatakse igal etapil minimaalset arvu loomi, on katse põhimõtteks saada aine klassifitseerimiseks piisavalt teavet katseaine ägeda mürgisuse kohta. Ainet manustatakse katseloomade rühmale suukaudselt ühe kindlaksmääratud doosina. Ainet katsetatakse etapiviisiliselt, igal etapil kasutatakse kolme ühest soost looma (tavaliselt emaslooma). Ühendiga seotud suremuse puudumine või esinemine loomadel, kellele ühel etapil annustati ainet, määrab kindlaks järgmise etapi, s.t:

— lisakatseid ei ole vaja;

— aine sama annus manustatakse veel kolmele loomale;

— ainet manustatakse vastavalt vahetult järgmisele või eelmisele annusemäärale veel kolmele loomale.

Katseprotseduuri üksikasju on kirjeldatud 1. lisas. Meetod võimaldab langetada otsuse seoses katseaine klassifitseerimisega ühte mürgisuse kategooriasse, mis on määratletud kindlaksmääratud LD<sub>50</sub> piirväärtuse põhjal.

## 1.4. MEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Loomaliikide valik

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (9). Selle põhjuseks on, et tavapärased LD<sub>50</sub> katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui on erinevusi täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (11). Kui struktuurselt sarnaste kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokineetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse tehakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui ± 20 % varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

## 1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise aja, peaks seda hoidma vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

**▼B****1.4.3. Loomade ettevalmistamine**

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise jaoks ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

**1.4.4. Annuste valmistamine**

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil, ja see on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi ületada manustamisel annuste suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta: vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuse valmistise koostamiseks on soovitatav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus järgmine: lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

**1.5. PROTSEDUUR****1.5.1. Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates kogustes kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseainet. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutada vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

**1.5.2. Loomade arv ja annusemäärad**

Igal etapil kasutatakse kolme looma. Lähteannusena kasutatav annusemäär valitakse üks neljast kindlast suurusest – 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kehamassi kg. Lähteannuse määr peaks olema sellise väärtusega, mis kutsub suurima tõenäosusega esile suremust mõnede loomade hulgas, kellele ainet manustati. 1. lisas toodud vooskeemid kirjeldavad protseduure, mida tuleks järgida iga lähteannuse puhul. Lisaks sellele antakse 4. lisas juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

**▼B**

Kui olemasolev teave kinnitab, et suremus on ebatõenäoline suurima aldoosi taseme juures (2 000 mg/kg kehamassi kohta), tuleks teha piirkatse. Kui puudub teave uuritava aine kohta, soovitatakse loomade heaolu tagamiseks kasutada aldoosina 300 mg/kg kehamassi kohta.

Katserühmadele annustamiste ajavahemik määratakse kindlaks mürgisustunnuste algushetke, kestuse ja raskuse abil. Järgmise annuse manustamist loomadele tuleb edasi lükata hetkeni, kuni juba annuse saanud loomade ellujäämine on kindel.

Maksimaalset kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras ja ainult siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 2. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soovitud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000 – 5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmisel.

**1.5.3. Piirkatse**

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus eksperimentaatoril on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid, segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või kui katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Piirkatse võidakse teha ühel annusemääral (2 000 mg/kg kehamassi kohta) kuue loomaga (kolm looma igal etapil). Erandkorras võib piirkatse teha ühel annusemääral (5 000 mg/kg) kolme loomaga (vt 2. lisa). Kui esineb katseainega seotud suremust, võib sooritada lisakatseid astme võrra madalama annusemääraga.

**1.6. VAATLUSED**

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese nelja tunni jooksul ja seejärel iga päev kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt loomade heaolu pärast või kui nad leitakse surnuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski jäigalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seepärast vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisuse nähtud võivad ilmned hilistumisega (12). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

**▼ B**

Lisavaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karv-kattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud värvine, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaansid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume. Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

1.6.1. **Kehamass**

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellu jäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

1.6.2. **Patoloogia**

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esialgse annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

2. **ANDMED**

Andmed esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahangu tehtud leiud.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerimine);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandaine (vajaduse korral):

— kandaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

**▼ B**

- loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;
- loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

## Katsetingimused:

- katseaine valmistamise üksikasjad, sh üksikasjad manustatava aine füüsilise oleku kohta;
- katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- põhjendus lähteannuse valikuks.

## Tulemused:

- tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgisustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;
- tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;
- iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;
- surma kuupäev ja kellaaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;
- iga looma korral mürgisusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;
- iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutus ja tõlgendamine.

## Järeldused.

## 4.

**VIITED**

- 1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett., Suppl.* 31, 86.
- 2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336–341.
- 3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559–610.
- 4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729–734.
- 5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC<sub>50</sub> Tests. *ALTEX* 16, 129–134.
- 6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD<sub>50</sub> Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455–470.

**▼B**

- 7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659–670.
- 8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- 9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- 10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 11) Lipnick R.L., Cotruvo, J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD<sub>50</sub>, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223–231.
- 12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.





*1. LISA*

**PROTSEDUUR, MIDA JÄRGITAKSE IGA LÄHTEANNUSE PUHUL**

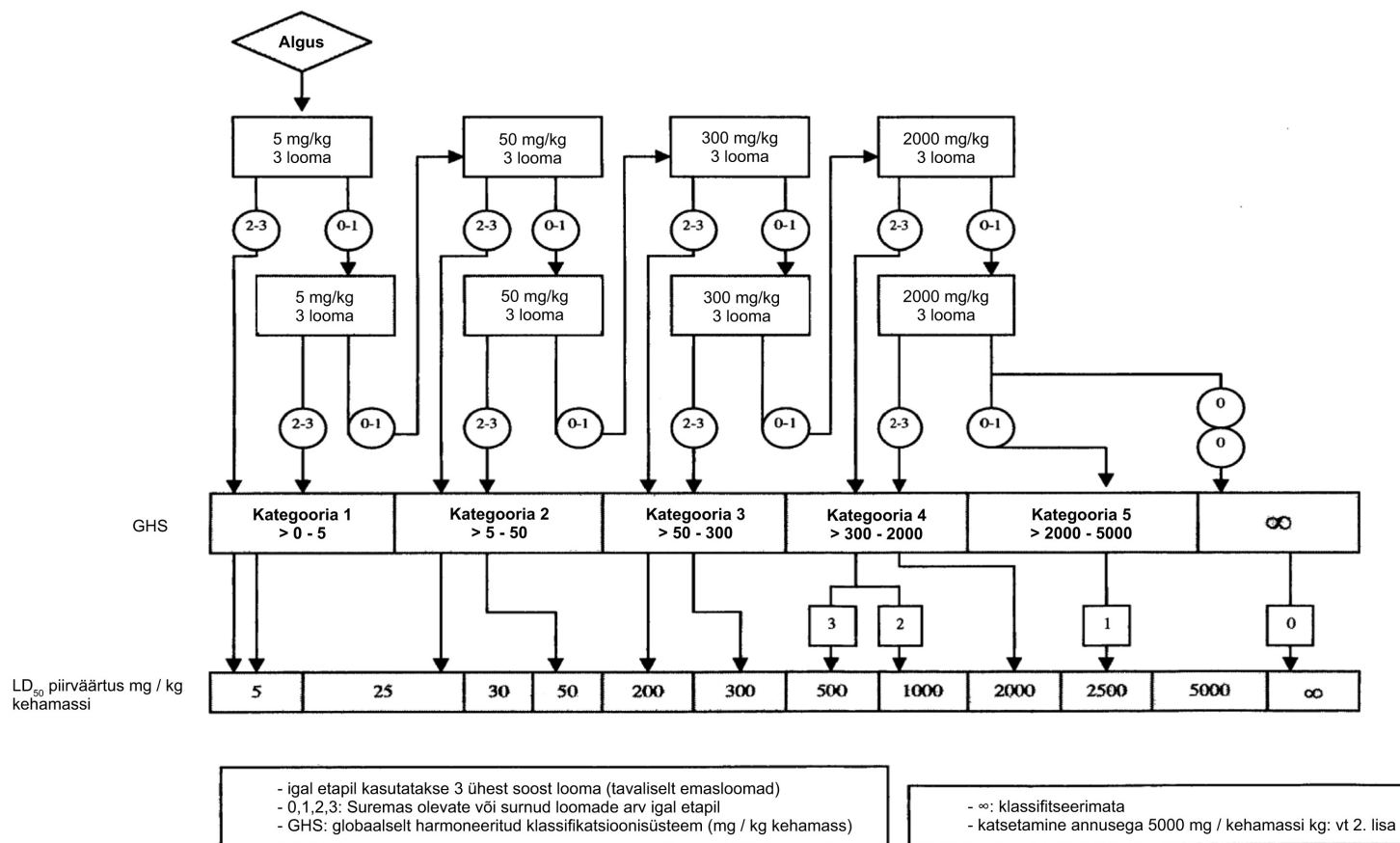
*ÜLDISED MÄRKUSED*

Selles lisa toodud vastavad katsekavad selgitavad protseduuri, mida tuleb järgida iga lähteannuse puhul.

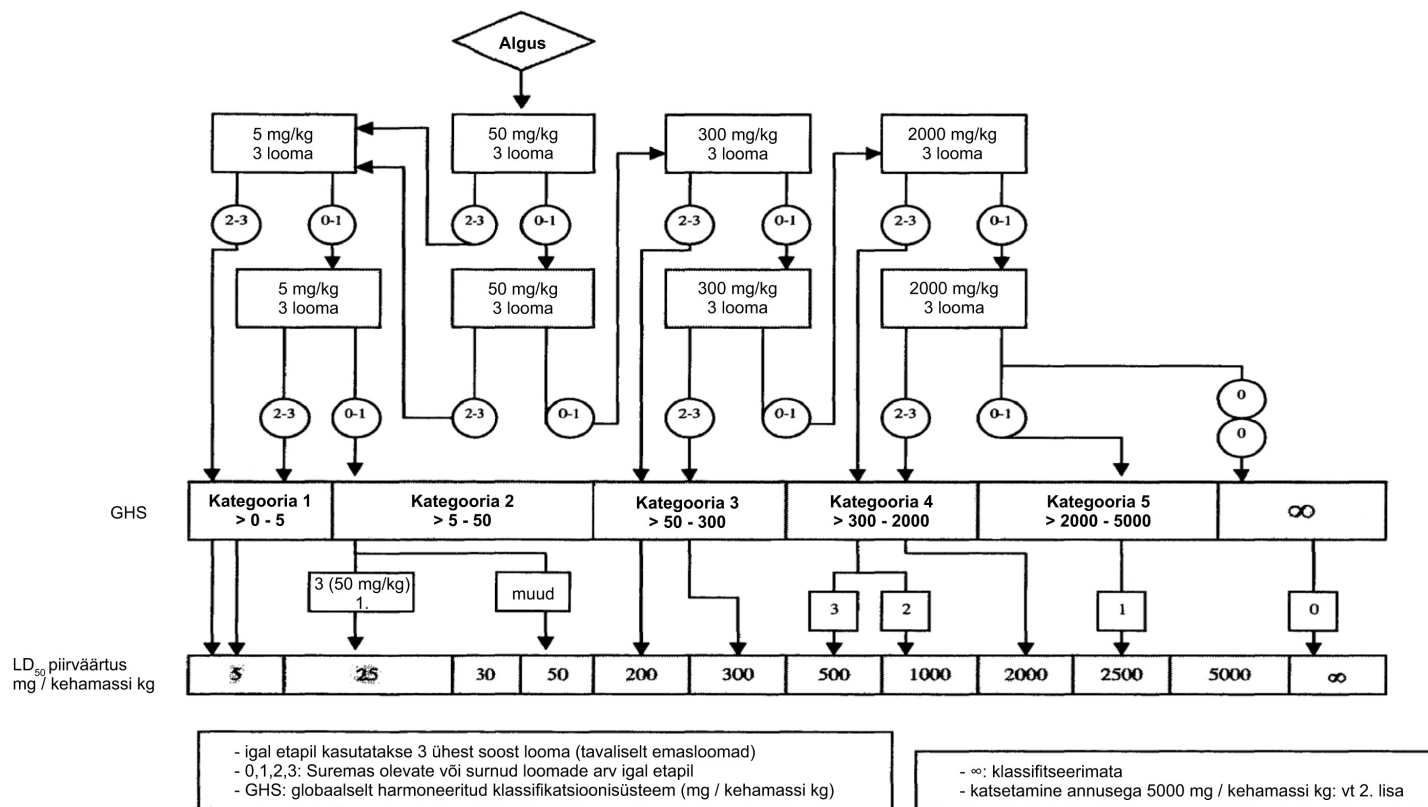
- 1a lisa: lähteannus on 5 mg kg kehamassi kohta
- 1b lisa: lähteannus on 50 mg kg kehamassi kohta
- 1c lisa: lähteannus on 300 mg kg kehamassi kohta
- 1d lisa: lähteannus on 2 000 mg kg kehamassi kohta

Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale.

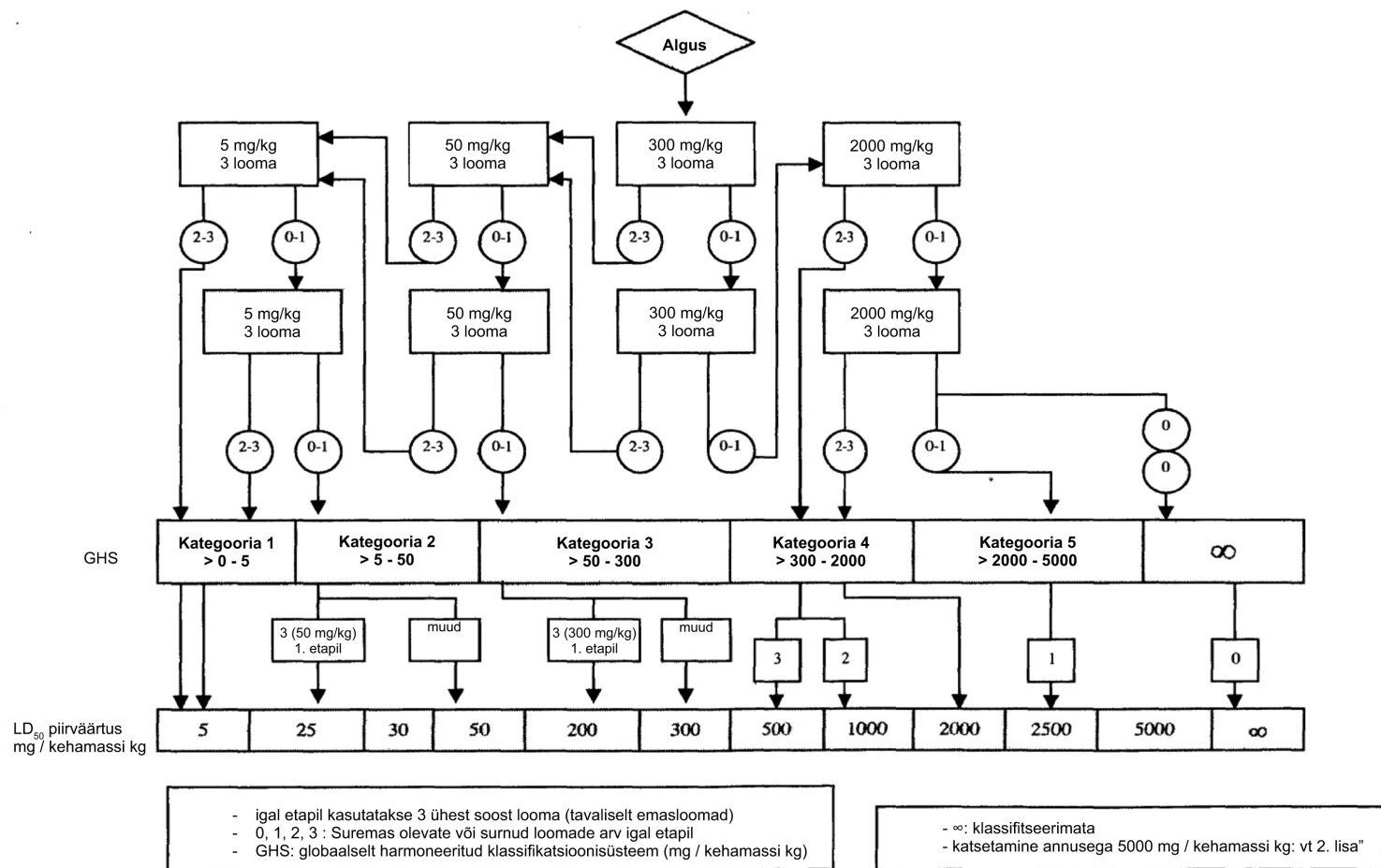
KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 5 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



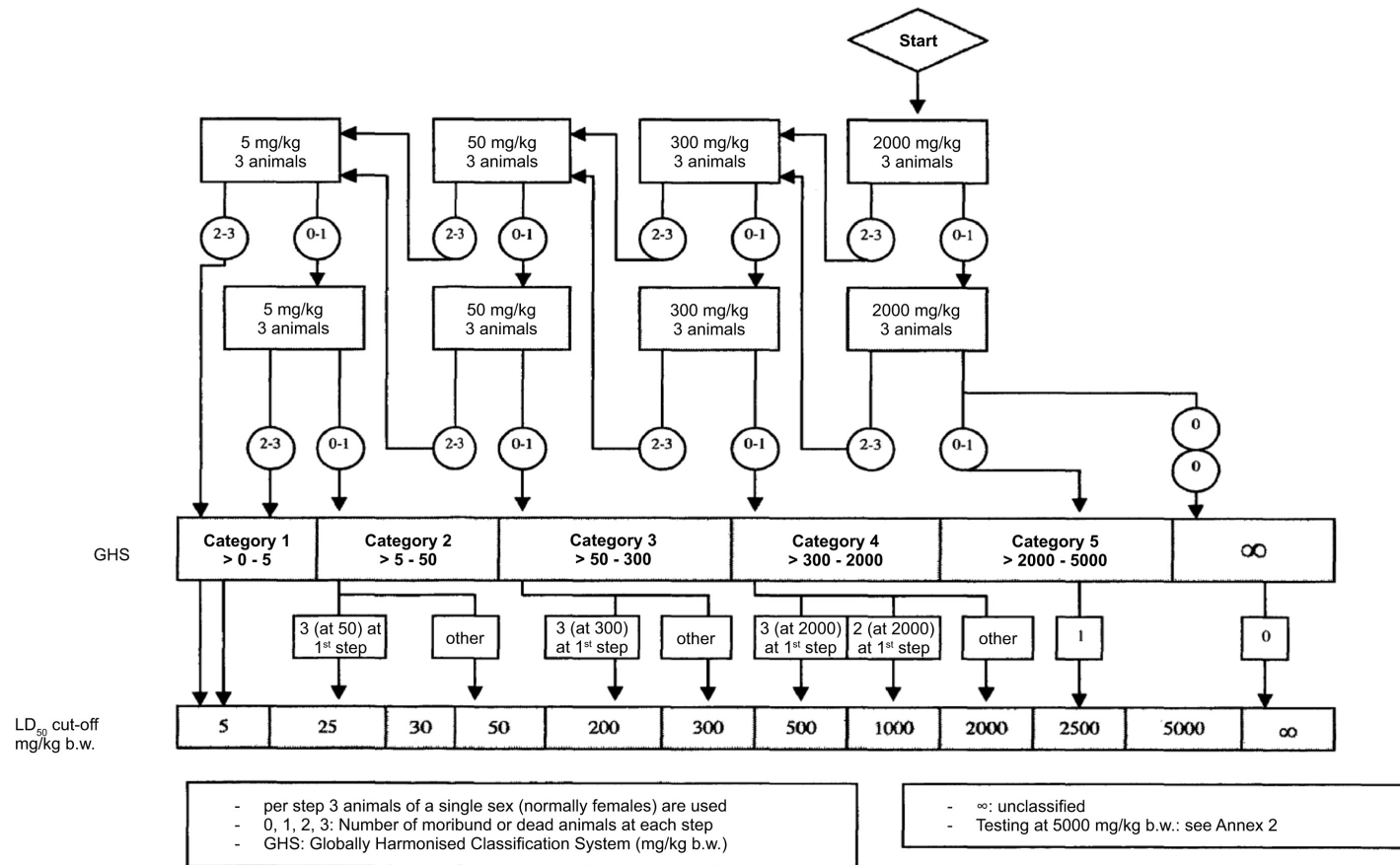
KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 50 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 300 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 2 000 MG/KEHAMASSI KG KORRAL





## 2. LISA

### **KLASSIFITSEERIMISKRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KORRAL, MILLE OODATAVAD LD<sub>50</sub> VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA TESTIDA**

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt väike, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete korral on LD<sub>50</sub> väärtused oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või nahakaudsel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside puhul. Katseaine võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD<sub>50</sub> < 5 000 mg/kg (GHS 5. kategooria), järgmistel juhtudel:

- a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisades 1a–1d toodud katsete tegemise mis tahes katsekava poolt, mis põhineb surmajuhtumitel;
- b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD<sub>50</sub> väärtus asub 5. kategooriale vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;
- c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja

— usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või

— kui täheldatakse suremust suukaudse manustamisega katsetes kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni või

— kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahutus, piloereksioon või hoolitsemata välimus, või

— kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärtete ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

### **KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA**

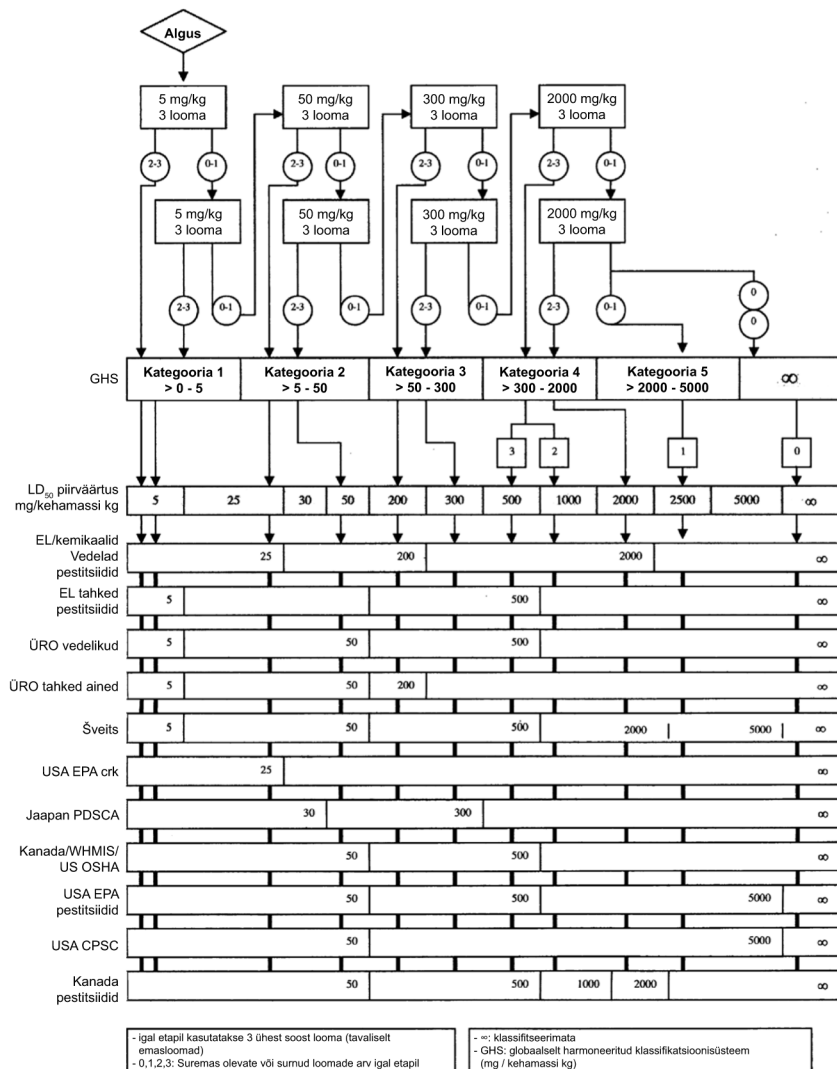
Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta heaks loomkatsete tegemist 5. kategooriale vastavas vahemikus (5 000 mg/kg annustega) ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (10). Lisakatseid kõrgemate annusemääradega ei ole vaja teha.

Kui katse tegemine annusega 5 000 mg/kg on nõutav, vajatakse vaid ühte etappi (st kolme looma). Kui esimese annuse saanud loom sureb, jätkatakse 2 000 mg/kg doosi manustamist vastavalt 1. lisas toodud vooskeemidele. Kui esimene loom jääb ellu, manustatakse doos ka kahele järgmisele loomale. Kui sureb vaid üks kolmest loomast, siis ületab LD<sub>50</sub> väärtus eeldatavalt 5 000 mg/kg. Kui mõlemad loomad surevad, jätkatakse manustamist annusega 2 000 mg/kg.

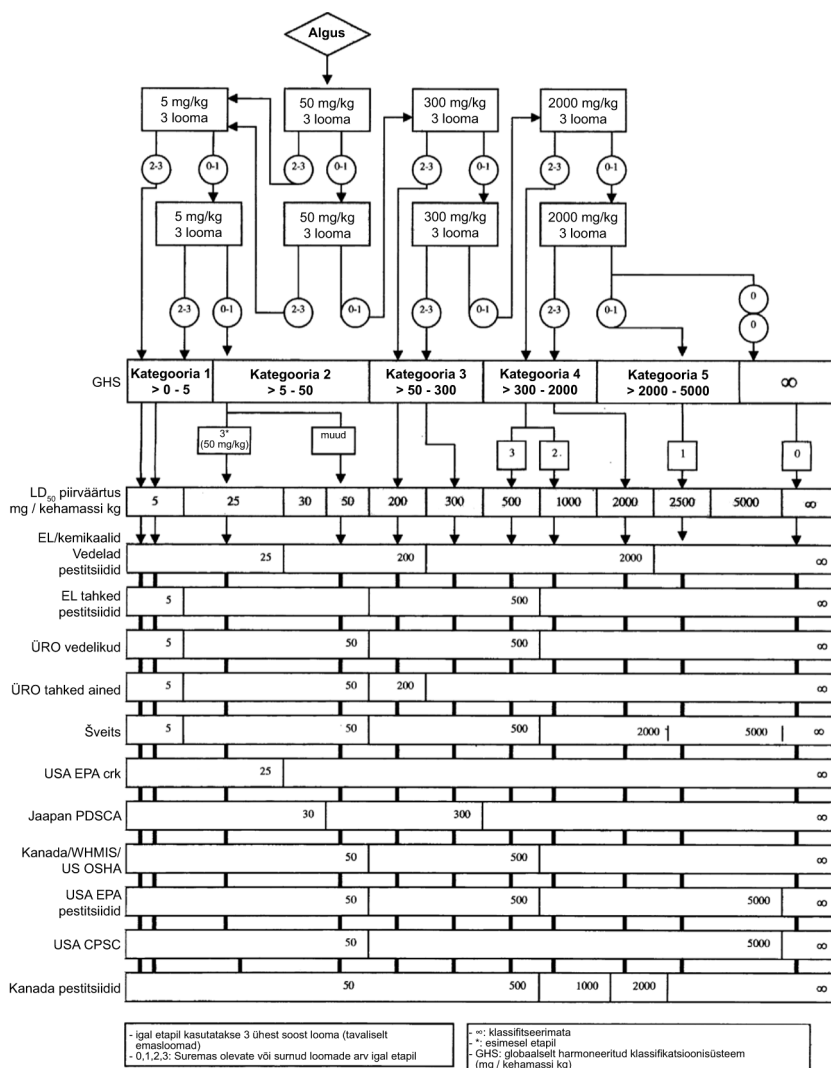


Lisa 3

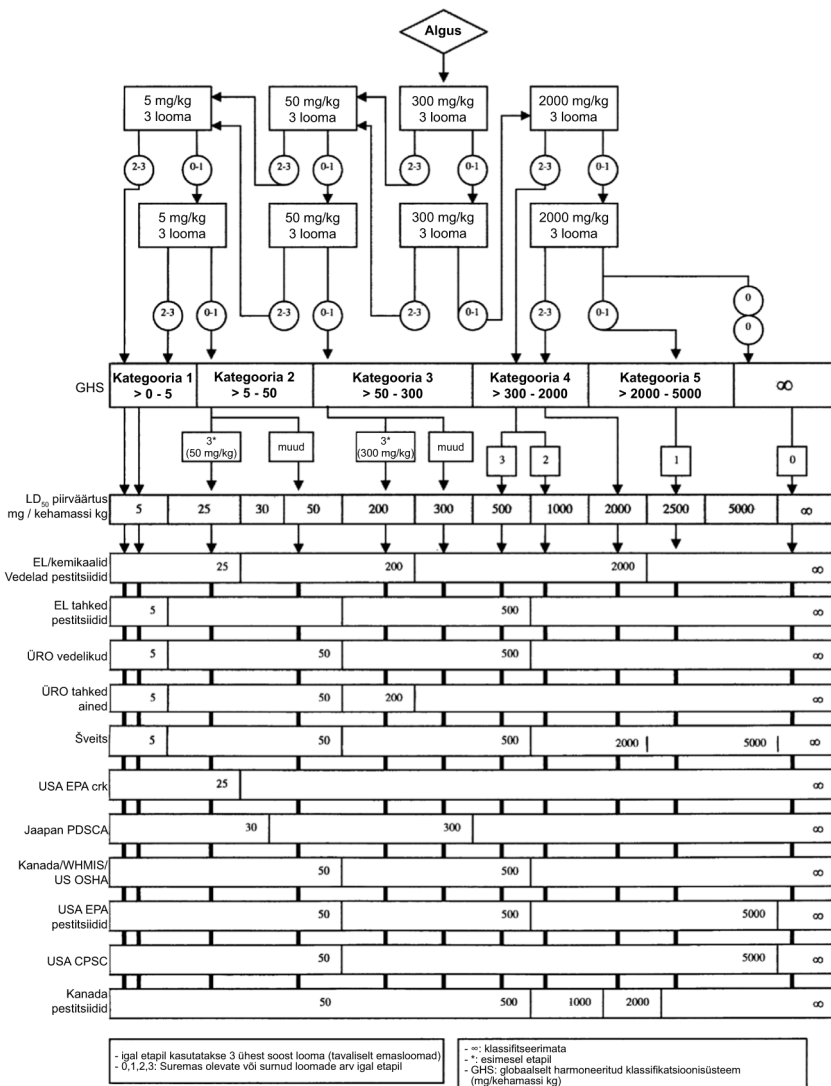
**KATSEMEETOD B.1 b: EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperioodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viite (8) alusel)**



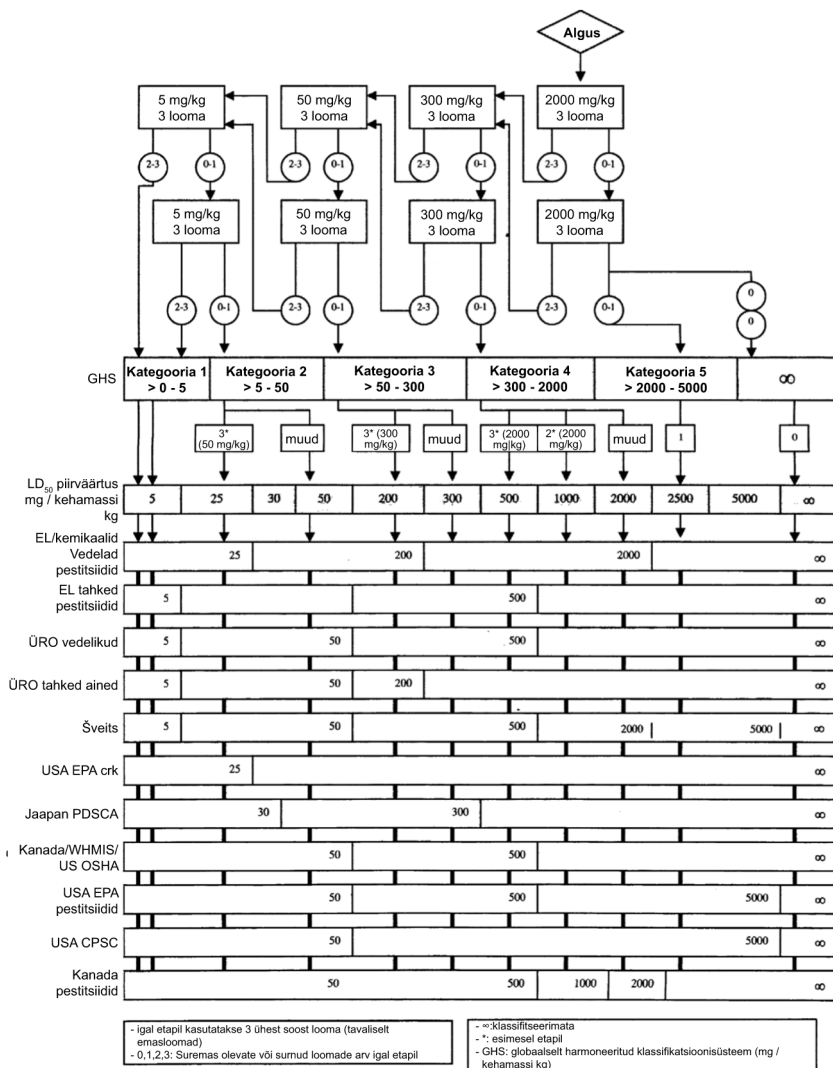
▼B







▼B



## ▼M4

## B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 403 (2009) (1). Esialgne sissehingamisel avalduvat ägedat mürgisust käsitlev katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 403 läbivaadatud versiooniga) on koostatud suurema paindlikkuse tagamiseks, loomade kasutamise vähendamiseks ja regulatiivsete vajaduste täitmiseks. Läbivaadatud katsemeetod hõlmab kahte järgmist uuringu tüüpi: tavaline LC<sub>50</sub> määramise eeskiri ja C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskiri. Käesoleva katsemeetodi peamised omadused on järgmised: meetod võimaldab määrata mõju sõltuvust kontsentratsioonist alates mitteletaalsest kuni letaalse mõjuni, et leida letaalne mediaankontsentratsioon (LC<sub>50</sub>), mitteletaalse kontsentratsiooni läviväärtus (näiteks LC<sub>01</sub>) ja kõvera tõus, ning määrata kindlaks mõju võimalik sõltuvus soost. C × t määramise eeskirja tuleks kasutada konkreetse regulatiivse või teadusliku vajaduse puhul, kui on vaja teha mitmesuguse kestusega loomkatsed, näiteks hädaolukorrale reageerimise kavandamiseks (nt akuutse kokkupuute näidistasemete (*Acute Exposure Guideline Levels*, AEGL) leidmine, hädaolukorras toimimise juhendite (*Emergency Response Planning Guidelines*, ERPG) kavandamine või akuutse kokkupuute läviväärtuste (*Acute Exposure Threshold Levels*, AETL) leidmine) või maakasutuse planeerimiseks.
2. Käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemise ja tõlgendamise juhendid on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katse juhenddokumendis (juhenddokument nr 39) (2).
3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).
4. Käesolev katsemeetod võimaldab iseloomustada uuritavat kemikaali, hinnata kvantitatiivselt riski ning määruse (EÜ) nr 1272/2008 (3) kohaselt järjestada ja klassifitseerida uuritavat kemikaali. Juhenddokumendis nr 39 (2) on esitatud juhendid ägeda mürgisuse uurimiseks sobiva katsemeetodi valimiseks. Kui soovitakse saada ainult klassifitseerimiseks ja märgistamiseks vajalikku teavet, soovitatakse üldiselt kasutada käesoleva lisa peatükis B.52 esitatud meetodit (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)). Käesolev katsemeetod B.2 ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetrilised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

## LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud (näiteks käesoleva lisa peatükk B.52 (4)), mille andmete abil oleks võimalik täiendada katse tegemisest loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta (vt juhenddokument nr 39 (2)).

▼ **M4**

6. Võimaluste piires tuleks vältida söövitava ja/või ärritava kemikaali katsetamist kontsentratsioonil, mis eeldatavasti põhjustab suurt valu ja/või kannatusi. Söövitava/ärritava mõju võimalust tuleks hinnata eksperdihindamise abil, kasutades selliseid tõendeid nagu inimeste kogemused ja varasemad loomkatsete andmed (näiteks korduvdoosi uuringutest, mis on tehtud mitte-söövitava/-ärritava kontsentratsiooniga), olemasolevad *in vitro* andmed (näiteks käesoleva lisa peatükid B.40 (5) ja B.40a (6) või OECD katsejuhend nr 435 (7)), pH-väärtused, teave samalaadsete ainete kohta või iga muu asjakohane teave, et hinnata, kas täiendavast katsetamisest on võimalik loobuda. Konkreetse regulatiivse vajaduse jaoks (näiteks hädaolukorras tegutsemise kava koostamiseks) võidakse käesolevat katsemeetodit kasutada, et viia loomad kokkupuutesse kõnealuste materjalidega, kuna sellega saab uuringu juht või peamine uurija kontrollida sihtkontsentratsioonide valimise õigsust. Sihtkontsentratsioon ei tohiks siiski põhjustada tugevat ärritavat/söövitavat mõju, kuid peaks olema piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt ja seda valikut tuleks põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)).

**KATSE PÕHIMÕTE**

7. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 on koostatud selleks, et saada piisavalt teavet uuritava kemikaali ägeda mürgisuse kohta, et kemikaal klassifitseerida ja saada letaalsuse andmed (näiteks  $LC_{50}$ ,  $LC_{01}$  ja kõvera tõus) ühe või mõlema soo kohta, mida vajatakse riski kvantitatiivseks hindamiseks. Käesolev katsemeetod hõlmab kahte meetodit. Esimene meetod on tavaline määramiseeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse piirkontsentratsiooniga (piirsalduskatse) või astmeliselt mitme eri kontsentratsiooniga eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul, mis tavaliselt on neli tundi. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Teine meetod on  $C \times t$  määramise eeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse ühe (piir)kontsentratsiooniga või mitme eri kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku jooksul.
8. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 19 (8).

**MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

9. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

**Loomade ettevalmistamine**

10. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 20$  % selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

▼ **M4****Pidamistingimused**

11. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema  $22 \pm 3$  °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui kättesaadavad on üldandmed, mille kohaselt kõnealused muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, siis ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötaid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatult koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

**Inhalatsioonikambri**

12. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

**KOKKUPUUTETINGIMUSED****Kontsentratsioonide manustamine**

13. Kokkupuude ainult nina kaudu võib rottidel kesta kuni kuus tundi. Kui hiirtel kasutatakse ainult nina kaudu kokkupuudet, siis ei tohiks kokkupuude tavaliselt ületada nelja tundi. Kui vajatakse pikema kestusega uuringuid, siis tuleks seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kogukehakambri aerosoolidega kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu uuritava kemikaali suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Loomadele võib kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal vett anda.

14. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalise vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

▼ **M4****Osakeste jaotus suuruse järgi**

15. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosooli, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 µm ning geomeetriline standardhälve ( $\sigma_g$ ) on 1,5–3,0 (2, 9, 10). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügrokoopseid materjale (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

**Uuritava kemikaali preparaat kandaines**

16. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, siis tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saa sisse hingata. Materjali hõõrumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitsemisel ei teki sissehingatavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingatavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

**Loomade kontrollrühm**

17. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandainet kui vesi, siis tuleks kandaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringuga mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandaine kontrollrühm vajalik.

**KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE****Kambri õhuvarustus**

18. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambri ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutesüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas meetodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (2, 11). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, siis tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisaldust mõõta.

**▼ M4****Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus**

19. Kambri temperatuuri tuleks hoida  $22 \pm 3$  °C juures. Loomade hingamistsoonis suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni nelja-tunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

**Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon**

20. Kui see on võimalik, siis tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katseüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

**Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon**

21. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambri loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik määrata spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni- või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüsi korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.
22. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsides või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).
23. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljatunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuharustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul

▼ **M4**

võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide üksikud kontsentratsioonid ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui  $\pm 10\%$  gaaside ja aurude puhul või  $\pm 20\%$  vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg ( $t_{95}$ ) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse  $t_{95}$  saavutamiseks vajalikku ajavaheikkku. Juhendid  $t_{95}$  hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

24. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambri erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

**Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus**

25. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada teist seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 15).

**KATSE KÄIK**

26. Allpool on kirjeldatud kahte järgmist uuringutüüpi: tavaline määramiseeskiri ja  $C \times t$  määramise eeskiri. Mõlemad eeskirjad võivad hõlmata eeluuringut, põhiuuringut ja/või piirsalduskatset (tavaline määramiseeskiri) või katsetaimist piirkontsentratsiooni juures ( $C \times t$ ). Kui mõju on teadaolevalt suurem ühele soole, võib uuringu juht otsustada, et uuringus kasutatakse ainult tundlikuma soo isendeid. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliselügi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Enne alustamist tuleks loomade kasutamise minimeerimiseks võtta arvesse kõik kättesaadavad andmed. Näiteks käesoleva lisa peatüki B.52 (4) kohaselt saadud andmed võivad muuta eeluuringu tarbetuks ja näidata, kas mõju sõltub looma soost (vt juhenddokument nr 39 (2)).



**▼M4****TAVALINE MÄÄRAMISEESKIRI****Üldised põhimõtted: tavaline määramiseeskiri**

27. Tavalise uuringu puhul viiakse loomarühmad kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kindla ajavahemiku jooksul (tavaliselt neli tundi) kas ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas või kogukehakambris. Loomad viiakse kokkupuutesse kas piirkontsentratsiooniga (piirsalduskatse) või vähemalt kolme kontsentratsiooniga astmelises protseduuris (põhiuuring). Põhiuuringule võib eelneeda eeluuring, v.a juhul, kui uuritava kemikaali kohta on mingil määral teavet juba olemas, näiteks eelnevalt tehtud uuring B.52 (vt juhenddokument nr 39 (2)).

**Eeluuring: tavaline määramiseeskiri**

28. Eeluuringut kasutatakse uuritava kemikaali mõju prognoosimiseks, mõju sooliste erinevuste kindlaksmääramiseks ning põhiuuringu või piirsalduskatse jaoks kokkupuute kontsentratsioonide valimisel abistamiseks. Eeluuringu kontsentratsioonide valimisel tuleks kasutada kogu kättesaadavat teavet, sh olemasolevaid (kvantitatiivse) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuse ((Q)SAR) andmeid ja andmeid samalaadsete kemikaalide kohta. Iga kontsentratsiooniga ei tohiks puutuda kokku rohkem kui kolm isast ja kolm emast isendit (soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võidakse vajada kolme looma kummagi soo kohta). Eeluuringus võib kasutada ühte kontsentratsiooni, aga vajaduse korral võib kasutada ka rohkem kui ühte kontsentratsiooni. Eeluuringus ei tuleks katsetada nii palju loomi ja kontsentratsioone, et see sarnaneks juba põhiuuringuga. Eeluuringu asemel võib kasutada varem tehtud uuringut B.52 (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)).

**Piirsalduskatse: tavaline määramiseeskiri**

29. Piirsalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Piirsalduskatse viiakse uuritava kemikaaliga piirkontsentratsiooni juures kokkupuutesse üks kolmest isasest ja kolmest emasest koosnev loomarühm. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid kemikaale käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogilisel olulistel koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.
30. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni saavutamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (MMAD 1–4 µm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui on võimalik saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalustel kasutada katse piirkontsentratsiooni ületavat kontsentratsiooni (3). Piirkontsentratsiooni kasutamist tuleks kaaluda ainult siis, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustest võib otseselt sõltuda inimeste tervise kaitse (3), ja seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

▼ **M4**

31. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, siis võib piirsalduskatse tulemusi kasutada eeluuringuna muudel kontsentratsioonidel edasiseks katsetamiseks (vt põhiuuring). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, siis tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suremuse, siis ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, siis tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja täiendavad andmed. Kui auruga saavutatav suurim kontsentratsioon ei ole mürgine, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

**Põhiuuring: tavaline määramiseeskiri**

32. Põhiuuring tehakse tavaliselt vähemalt kolme kontsentratsiooniga, kasutades viit isas- ja viit emaslooma (või kui on teada, kummast soost isendid on tundlikumad, siis viit sellest soost looma) igal kontsentratsioonil. Usaldusväärse statistilise analüüsi tagamiseks tuleks kasutada piisavalt suuri kontsentratsioone. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katses kasutatud loomade ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. See võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuuterühma sihtkontsentratsiooni. Kuna katses kasutatakse keerukat tehnoloogiat, ei pruugi see inhalatsiooniuuringute puhul alati olla praktiline. Sellisel juhul peaks loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga põhinema varasemal kogemusel ja teaduslikul hinnangul. Segu katsetamisel tuleks tugineda juhenddokumendile nr 39 (2).

**C × T (KONTSENTRATSIOON × AEG) MÄÄRAMISE EESKIRI****Üldised põhimõtted: C × t määramise eeskiri**

33. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võidakse tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t määramise eeskirja (12, 13, 14). Selle lähenemisviisi puhul võivad loomad puutuda uuritava kemikaaliga kokku mitmel kontsentratsioonil ja mitme ajavahemiku vältel. Kõik katsed tehakse ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas kambris (kogukehakambrid ei ole selle määramiseeskirja jaoks praktilised). Seda eeskirja on kirjeldatud 1. liite toimimiskeemiga. Simulatsioonianalüüsiga on näidatud, et tavaline määramiseeskiri ja C × t määramise eeskiri võivad mõlemad anda kindlaid LC<sub>50</sub> väärtusi, kuid C × t määramise eeskiri annab tavaliselt kindlaid LC<sub>01</sub> ja LC<sub>10</sub> väärtusi (15).
34. Simulatsioonianalüüs on näidanud, et C × t intervalli kohta kahe looma kasutamine (üks loom kummastki soost mõlema soo kasutamise korral või kaks looma sellest soost, kummale on suurem mõju) võib tavaliselt olla piisav põhiuuringus nelja kontsentratsiooni ja viie kokkupuute ajavahemiku katsetamise korral. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada kasutada kummagi soo puhul kahte rotti C × t intervalli kohta (15). Kummastki soost kahe looma kasutamine kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta võib vähendada andmete kallutatust ja hinnangute hajumist, suurendada ennustuste täpsust ja hälvete kirjeldatavust usaldusvahemikuga. Kui andmete kooskõla ei ole hindamiseks piisav (kui kasutatakse ühte looma kummastki soost või kahte looma soost, millele on suurem mõju), siis võib piisata viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamisest. Täiendavad juhendid C × t uuringus kasutatavate loomade arvu ja kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

▼ **M4****Eeluring:  $C \times t$  määramise eeskiri**

35. Uuritava kemikaali mõju hindamiseks ja põhiuuringu kokkupuutekontsentratsioonide valimiseks kasutatakse eeluringut. Vajalik võib olla eeluring, milles kasutatakse kuni kolme looma soo ja kontsentratsiooni kohta (vt lähemalt juhenddokumendi nr 39 (2) III liide), et valida põhiuuringu jaoks sobiv algkontsentratsioon ja minimeerida kasutatavate loomade arvu. Soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võib olla vajalik kasutada kolme looma soo kohta. Need loomad peaksid puutuma ainega kokku katse ühe ajavahemiku jooksul, tavaliselt 240 minutit. Asjakohaste katsekeskkondade loomise võimalikkust tuleks hinnata ilma loomadeta tehtavate tehniliste proovikatsete ajal. Eeluringu tegemine ei ole tavaliselt vajalik, kui suuremuse andmed on kättesaadavad B.52 kohasest uuringust (4). B.2 kohase uuringu lähtesihtkontsentratsiooni valides peaks uuringu juht arvesse võtma kõiki olemasolevaid B.52 kohastes uuringutes (4) mõlema soo ja kõigi katsetatud kontsentratsioonide kohta saadud suuremuse andmeid (vt juhenddokument nr 39 (2)).

**Lähtekontsentratsioon:  $C \times t$  määramise eeskiri**

36. Lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluringu alusel valitud kontsentratsioon. Kahest loomast (üks kummagi soo kohta) koosnevad rühmad viiakse kokkupuutesse kõnealuse kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku vältel (näiteks 15, 30, 60, 120 või 240 minutit), mis teeb kokku kümme looma (I kokkupuude) (1. liide).
37. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaaside, aurude ja aerosoolide piirkontsentratsioonid vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni tekitamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks eesmärk olema saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (st MMAD 1–4  $\mu\text{m}$ ) piirkontsentratsioonil 2 mg/l. See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalutlustel piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooniga katsetamist (3). Piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooni katsetamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustel on otsene mõju inimeste tervise kaitsele (3), ja katseprotokollis tuleks seda põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade ebavajaliku kasutamise vältimiseks tuleks enne katset lähtekontsentratsiooniga teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada kõnealuse kontsentratsiooni jaoks vajalike kambritingimuste saavutatavus.
38. Kui lähtekontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, võib kõnealuse kontsentratsiooniga saadud tulemusi kasutada lähtepunktina edasiseks katsetamiseks muude kontsentratsioonidega (vt põhiuuringu). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suuremuse, ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja seda toetavad andmed. Kui auru suurim saavutatav kontsentratsioon ei ole mürgine, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

▼ **M4****Põhiuuring:  $C \times t$  määramise eeskiri**

39. Põhiuuringus katsetatav lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluuringu alusel valitud kontsentratsioon. Kui I kokkupuute ajal või selle järel täheldatakse loomade suremist, võetakse suremist põhjustav minimaalne kokkupuude ( $C \times t$ ) aluseks II kokkupuute kontsentratsiooni ja ajavahemike kindlaksmääramisel. Iga edasine kokkupuude oleneb eelnevast kokkupuutest (vt 1. liide).
40. Paljude uuritavate kemikaalide puhul on lähtekontsentratsiooniga saadud tulemused koos kolme lühema täiendava kokkupuutega (kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille järjestikuste ajavahemike erinevus näitab progressiooni kordaja, tavaliselt  $\sqrt{2}$ ) piisav  $C \times t$  suremuse suhte kindlaksmääramiseks (15), kuid otstarbekas võib olla viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamine (vt 1. liide ja juhenddokument nr 39 (2)).  $C \times t$  protokoll tulemuste matemaatiline käsitlus on esitatud 1. liites.

**VAATLUSED**

41. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Mürgistuse kliiniliste nähtude vaatluste tegemisel tuleks olla hoolikas, et mitte pidada kokkupuutekatset põhjustatud esialgset kehva välimust ja ajutisi hingamismuutusi uuritava kemikaaliga seotud mürgistuseks, mis nõuaks loomade enneaegset surmamist. Tuleks võtta arvesse humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (nr 19) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmataks humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.
42. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu väринate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

**Kehamass**

43. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt  $\geq 20\%$  võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmataks humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

**▼ M4****Patoloogia**

44. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.
45. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võidakse kaaluda kavandis eelnevalt ette nähtud täiendavaid uuringuid, näiteks ellujäänud rottide kopsude massi mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise alusel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamisteede mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügrokoopse kemikaali kohta.

**ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

46. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud.

**Katseprotokoll**

47. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

*Katseloomad ja pidamistingimused*

- Puuringimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.
- Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.
- Loomade arv, vanus ja sugu.
- Randomiseerimismeetod.
- Sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/päritolu, vee päritolu).
- Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

▼ **M4***Uuritav kemikaal*

- Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).
- Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

*Kandeaine*

- Kandeaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).
- Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

*Inhalatsioonikamber*

- Inhalatsioonikambri, sh selle mõõtmete ja mahu kirjeldus.
- Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.
- Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.
- Õhuallikas ja kambri suunatud / kambri välja lastud õhu töötlemine ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.
- Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.
- Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).
- Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.
- Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambri.
- Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuuteportide kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.
- Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg ( $t_{95}$ ).
- Kogu kambri oleva õhu vahetuste arv tunnis.
- Mõõteseadmed (vajaduse korral).

*Andmed kokkupuute kohta*

- Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.
- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambri suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.

**▼M4**

- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (näiteks mg/l, mg/m<sup>3</sup> jne); sulgudes võib lisada ka ruumalaühikud (näiteks ppm, ppb jne).
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve ( $\sigma_g$ ) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

*Katsetingimused*

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Andmed kasutatud keemilise analüüsi meetodi kohta ja meetodi valideerimise kohta (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsil).
- Katsekonsentratsioonide valiku põhjendus.

*Tulemused*

- Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja  $\sigma_g$  arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja mõju kestus).
- Uuringul registreeritud konkreetse looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöördumus konkreetse looma puhul.
- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.
- Suremuse hinnangud (näiteks LC<sub>50</sub>, LD<sub>01</sub>), sh 95 % usalduspiirid ja kõvera tõus (kui see hindamismeetodi alusel esitatakse).
- Statistiline seos, sh eksponendi n hinnang ( $C \times t$  määramise eeskiri). Tuleks esitada kasutatud statistikatarkvara nimetus.

▼ **M4***Tulemuste arutelu ja tõlgendamine*

- Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda osakeste sissehingamiseks sobivat suurus, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (8) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.
- Kui katsetamine käesoleva lisa peatüki B.52 (4) alusel katkestati käesoleva katsemeetodi B.2 rakendamiseks, siis tuleks seda põhjendada.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

*KIRJANDUS*

- 1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 3) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).
- 4) Käesoleva lisa peatükk B.52 „Äge mürgisus sissehingamisel – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod”.
- 5) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanselelektritakistuse (TER) mõõtmine”.
- 6) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.
- 7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.
- 10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.



**▼ M4**

- 11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
- 12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278–290.
- 13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105–117.
- 14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65–71.
- 15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and  $C \times t$  Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 16) Finney DJ (1977). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

**MÕISTE**

**Uuritav kemikaal:** iga aine või segu, mida uuritakse/uuriti käesoleva katsemetodi abil.

▼ **M4***1. liide***C × t määramise eeskiri**

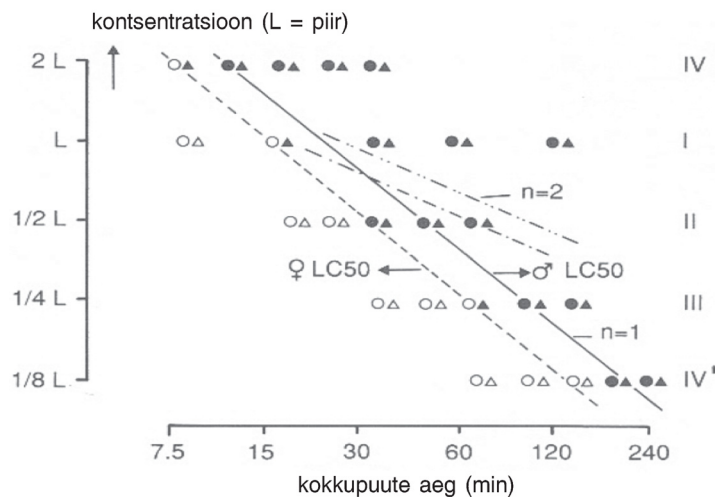
1. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võib tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskirja (12, 13, 14). Seda tuleks kasutada eelistatavalt juhul, kui konkreetne regulatiivne või teaduslik vajadus nõuab loomade katsetamist mitme ajavahemiku vältel, näiteks hädaolukorrale reageerimise või maakasutuse kavandamiseks. Sel juhul alustatakse tavaliselt piirkontsentratsioonil katsetamisest (I kokkupuude), mille puhul loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga viie ajavahemiku jooksul (näiteks 15, 30, 60, 120 ja 240 min), nii et ühe kokkupuute ajal püütakse saada andmed mitme ajavahemiku kohta (vt joonis 1). Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Neid tasemeid võib ületada ainult juhul, kui kõnealustel tasemetel katsetamiseks on regulatiivne või teaduslik vajadus (vt B.2 põhiteksti punkt 37).
2. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta on vähe teavet või seda ei ole üldse, tuleks teha eeluring, mille vältel loomarühmad, milles on kuni kolm looma kummastki soost, viiakse tavaliselt 240 minuti vältel kokkupuutesse uuringu juhi valitud sihtkontsentratsiooniga.
3. Kui I kokkupuute ajal katsetatakse piirkontsentratsiooni ja täheldatakse suremust alla 50 %, ei ole täiendav katsetamine vajalik. Kui on regulatiivne või teaduslik vajadus määrata kontsentratsiooni/aja/mõju vaheline seos piirkontsentratsioonist suuremal kontsentratsioonil, tuleks järgmine kokkupuude teha kõrgema tasemega, näiteks piirkontsentratsioonist kaks korda suurema kontsentratsiooniga (s.o 2L joonisel 1).
4. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse mürgisust, on vaja teha täiendav uuring (põhiuuring). Kõnealused täiendavad kokkupuuted tehakse kas väiksema kontsentratsiooniga (joonisel 1: II, III või IV' kokkupuude) või suurema kontsentratsiooniga, kasutades lühemaid ajavahemikke (joonisel 1: IV kokkupuude), mis on kohandatud ja mille vahed ei ole nii suured.
5. Katse (esialgne kontsentratsioon ja täiendavad kontsentratsioonid) tehakse, kasutades iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kas ühte looma kummastki soost või kahte looma sellest soost, kumb on tundlikum. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada, et iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kasutatakse kahte rotti kummastki soost (või nelja looma tundlikumast soost) (15). Kui kirjeldatud määramiseeskirja puhul kasutatakse iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kahte looma kummastki soost, väheneb tavaliselt andmete kallutatus ja hinnangute muutlikkus, suureneb hinnangute täpsus ja paraneb hälvete kirjeldatavus usaldusvahemikuga. Täpsemad üksikasjad on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).
6. Ideaaljuhul tehakse iga kokkupuude ühel päeval. See võimaldab viivitada järgmise kokkupuutega, kuni võib olla mõistlikult kindel, et loomad jäävad ellu, ja see võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuute jaoks sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikku. Iga kokkupuudet soovitatakse alustada rühmaga, kelle kokkupuute kestus on kõige pikem, näiteks 240-minutilise kokkupuutega rühm, seejärel 120-minutilise kokkupuutega rühm jne. Kui näiteks loomad 240 minuti rühmas 90 minuti möödudes surevad või neil täheldatakse raske mürgistuse nähte (näiteks hingamisrütmi äärmuslikud muutused, nagu raske hingamine), ei ole mõistlik rühmale 120 minuti pikkust kokkupuudet korraldada, kuna suremus oleks tõenäoliselt 100 %. Seega peaks uuringu juht valima kõnealuse kontsentratsiooni jaoks lühemad kokkupuute ajavahemikud (näiteks 90, 65, 45, 33 ja 25 minutit).

▼ **M4**

7. Kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta sageli, et määrata kindlaks ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon kokkupuute iga ajavahemiku kohta. Alati kui on võimalik, tuleks statistilise analüüsi jaoks kasutada iga looma surmaaega (kokkupuute kestuse asemel).
8. Esimese nelja kokkupuute tulemusi tuleks uurida, et määrata kindlaks kontsentratsiooni ja aja kõvera andmelüngad (vt joonis 1). Kui kooskõla ei ole piisav, võib korraldada täiendava kokkupuute (5. kontsentratsioon). 5. kokkupuutekontsentratsioon ja ajavahemikud tuleks valida nii, et kõrvaldatakse kõnealune andmelünk.
9. Kõiki kokkupuuteid (sh esimest kokkupuudet) kasutatakse statistilise analüüsi alusel kontsentratsiooni, aja ja mõju vahelise seose arvutamiseks (16). Kui see on iga  $C \times t$  intervalli puhul võimalik, siis tuleks kasutada ajaga kaalutud keskmist kontsentratsiooni ja kokkupuute kestust surmani (kui loom sureb kokkupuute ajal).

Joonis 1

Hüpooteetiline joonis kontsentratsiooni, aja ja suremuse vahelise seose kohta rottidel



Valged sümbolid = ellujäänud; mustad sümbolid = surnud loomad

Kolmnurgad = emased; ringid = isased

Katkematu joon =  $LC_{50}$  väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi  $n = 1$  isaste puhul

Katkendjoon =  $LC_{50}$  väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi  $n = 1$  emaste puhul

Punktiirjooned = hüpooteetilised  $LC_{50}$  väärtused isaste ja emaste puhul, kui  $n$  oleks olnud 2 (12).

Mõisted

kontsentratsioon

kokkupuute aeg

piir

▼ **M4**

10. Allpool on esitatud astmelise toimimiskäigu näide.

**I kokkupuude. Katse piirkontsentratsioonil (vt joonis 1)**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma<sup>(a)</sup>
- Sihtkontsentratsioon<sup>(b)</sup> = piirkontsentratsioon.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kõnealusel sihtkontsentratsioonil vastavalt 15, 30, 60, 120 ja 240 minutiks.



**II kokkupuude<sup>(c)</sup>. Põhiuuring**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil<sup>(d)</sup> (1/2L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on  $\sqrt{2}$ ; vt joonis 1).



**III kokkupuude. Põhiuuring**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil<sup>(d)</sup> (1/4L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on  $\sqrt{2}$ ; vt joonis 1).



**IV' kokkupuude. Põhiuuring**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil<sup>(d)</sup> (1/8L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on  $\sqrt{2}$ ; vt joonis 1).



<sup>(a)</sup> Kui soost sõltuva tundlikkuse andmeid ei ole, kasutatakse kummastki soost rotte, st üks loom kummastki soost iga kontsentratsiooni kohta. Olemasoleva teabe alusel või kui kõnealuse kokkupuute vältel selgub, et üks sugu on tundlikum, kasutatakse edasistes katsetes iga kontsentratsiooni kohta 10 tundlikumast soost looma (kaks looma iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta).

<sup>(b)</sup> Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, siis on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Kui eeldatakse mürgisust või kui mürgisus on tuvastatud eeluuringu, tuleks valida väiksem lähtekontsentratsioon. Regulaatiivse või teadusliku vajaduse korral võib kasutada suuremat kontsentratsiooni.

<sup>(c)</sup> Ideaaljuhul tuleks loomade kokkupuude järgmisel kontsentratsioonil edasi lükata seni, kuni eelnevalt töödeldud loomade ellujäämises on mõistlikkuse piires veendunud. See võimaldab uuringu juhul kohandada järgmise kokkupuute sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikke.

<sup>(d)</sup> Minimaalne doos (kontsentratsioon × aeg), mis põhjustas esialgsel kontsentratsioonil katsetamise ajal surma (esimene kokkupuude), võetakse aluseks kontsentratsiooni ja kokkupuute ajavahemiku järgmise kombinatsiooni kindlaksmääramisel. Tavaliselt vähendatakse kontsentratsiooni kaks korda (1/2L) ja loomade kokkupuude kemikaalidega toimub uute väiksemate vahedega ajavahemike vältel. Kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 ( $\sqrt{2}$ ; vt viide 11) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne doos (aeg × kontsentratsioon). Kõnealusel joonisel (joonis 1) täheldati surma I kokkupuute vältel esmakordselt 15 minuti möödumisel; II kokkupuute ajavahemike keskel on seega 30 minutit ja ajavahemikud on 15, 21, 30, 42 ja 60 min. Pärast esimest kahte kokkupuudet on väga soovitatav koostada andmete alusel eespool näidatuga samalaadne joonis ning kontrollida, kas kontsentratsiooni ja aja sõltuvuse tõus on 45 kraadi (n = 1) või on kontsentratsiooni, aja ning mõju vaheline sõltuvus laugem (näiteks n = 2) või järsem (näiteks n = 0,8). Viimasel juhul on väga soovitatav edasiste kokkupuudete kontsentratsioone ja ajavahemikke selle alusel kohandada.

▼ **M4****IV kokkupuude. Põhiuuring**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga suuremal kontsentratsioonil <sup>(e)</sup> (2L) mõnevõrra lühemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on  $\sqrt{2}$ ; vt joonis 1).

**C × t määramise eeskirja tulemuste matemaatiline tõlgendamine**

11. Nelja või viie kokkupuutekontsentratsiooniga ja viie ajavahemikuga C × t määramise eeskiri annab tulemuseks vastavalt 20 või 25 andmepunkti. Kõnealuste andmepunktide põhjal on võimalik arvutada C × t seos statistilise analüüsi abil (16).

*Võrrand 1:*

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

kus C = kontsentratsioon; t = kokkupuute kestus, või

*võrrand 2:*

$$\text{toime} = f(C^n t)$$

kus n = b<sub>1</sub>/b<sub>2</sub>.

Võrrandi 1 abil on võimalik arvutada LC<sub>50</sub> väärtus konkreetse ajavahemiku jaoks (näiteks 4 tundi, 1 tund, 30 minutit või muu ajavahemik katsetatud ajavahemike piires), kasutades väärtust P = 5 (50 % vastus). Pange tähele, et Haberi seadus on kohaldatav ainult juhul, kui n = 1. LC<sub>01</sub> saab arvutada P = 2,67 alusel.

<sup>(e)</sup> Mõnikord võib olla vajalik suurendada kontsentratsiooni (2L) ja kasutada uusi veelgi väiksemate vahedega ajavahemikke; ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 ( $\sqrt{2}$ ) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne kontsentratsioon. Kokkupuute minimaalne kestus peaks eelistatavalt olema pikem kui 5 minutit; kokkupuute kestus ei tohiks ületada 8 tundi.

**▼ B**

**B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼M8

## B.4. ÄGE NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404 (2015). Kemikaalidega katsete tegemist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse korrapäraselt läbi eesmärgiga tagada, et need kajastaksid parimaid olemasolevaid teadusandmeid. OECD katsejuhendi nr 404 läbivaatamisel on pööratud erilist tähelepanu võimalikele muudatustele seoses loomade heaolu parandamisega ja uuritavat kemikaali käsitleva kogu olemasoleva teabe hindamisele, et ära hoida tarbetute katsete tegemist laboriloomadega. OECD katsejuhendi nr 404 (algselt vastu võetud 1981. aastal ning muudetud aastatel 1992, 2002 ja 2015) ajakohastatud versioon sisaldab viidet juhenddokumendile nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (1); nimetatud dokumendis pakutakse välja modulaarne lähenemisviis nahaärrituse ja nahasöövituse hindamiseks. Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviis juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (1). Peale selle soovitatakse kõnealuses katsejuhendis kasutada algses *in vivo* katses katseloomal vajaduse korral kolme katselappi mitte üheaegselt, vaid üksteise järel.
2. Nahaärrituse ja nahasöövituse määratlus on esitatud käesoleva katsemeetodi liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED

3. Nii usaldusväärsete teadustulemuste kui ka loomade heaolu huvides ei tohiks *in vivo* uuringuid ette võtta enne, kui kõiki kättesaadavaid andmeid uuritava kemikaali võimaliku nahka söövitava/ärritava toime kohta on hinnatud tõendite kaalukusel põhineva analüüsi teel, nagu on kirjeldatud juhenddokumendis nahaärrituse/-söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta, st selle juhenddokumendi kolme osa ja neile vastavate moodulite kohaselt (1). Lühidalt kirjeldatuna vaadeldakse olemasolevaid andmeid 1. osas seitsme mooduli alusel, mis hõlmavad andmeid inimese kohta, *in vivo* andmeid, *in vitro* andmeid, füüsikalise-keemilisi omadusi (nt pH, eelkõige tugev happelisus või aluselisus) ja katsetel mitte-põhinevaid meetodeid. Teises osas viiakse läbi tõendite kaalukusel põhinev analüüs. Kui selle analüüsi tulemused on ebaselged, tuleks teha 3. osa kohased täiendavad katsed, alguses *in vitro* meetoditega ning viimase võimalusena *in vivo* katsed. Seega peaks kõnealune analüüs vähendama vajadust teha *in vivo* katseid selliste uuritavate kemikaalidega, mille puhul on muudest uuringutest saadud juba piisavalt tõendeid nende nahka söövitava/ärritava toime kohta.

## IN VIVO KATSE PÕHIMÕTE

4. Uuritav kemikaal kantakse ühes annuses katselooma nahale; katselooma töötlemata nahapiirkondi kasutatakse negatiivse kontrollina. Ärrituse/söövituse ulatus registreeritakse ja seda hinnatakse kindlate ajavahemike järel ning mõju täielikuks hindamiseks lisatakse selle täiendav kirjeldus. Uuringu kestus peaks olema piisav, et hinnata täheldatud mõju pöördumust või pöördumatust.

**▼M8**

5. Loomad, kellel täheldatakse mis tahes katsetapis pideva tugeva stressi ja/või valu tunnuseid, tuleks humaanselt surmata ning uuritava kemikaali hindamisel tuleks seda arvesse võtta. Otsustamiskriteeriumid surmaeelses seisundis või raskelt kannatavate loomade humaanseks surmamiseks on esitatud eraldi juhenddokumendis (2).

**IN VIVO KATSE ETTEVALMISTAMINE****Loomaliigi valimine**

6. Eelistatud laboriloom on albiinoküülik; kasutatakse noori terveid täiskasvanud küülikuid. Muude liikide kasutamisel tuleks esitada vastav põhjendus.

**Loomade ettevalmistamine**

7. Umbes 24 tundi enne katsed tuleks loomade seljaosa karvad võimalikult lühikeseks lõigata. Tuleks vältida naha marrastamist ning kasutada tuleks üksnes terveid, terve nahaga loomi.
8. Mõnel küülikuliinil esineb tiheda karvastikuga laike, mis on teatavatel aasta-aegadel silmatorkavamad. Selliseid tiheda karvastikuga piirkondi ei tohiks katses kasutada.

**Pidamis- ja söötmingimused**

9. Loomi tuleks pidada ühekaupa. Katseloomade ruumi temperatuur peaks küülikute puhul olema 20 °C ( $\pm$  3 °C). Ehkki suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatus koguses joogivett.

**KATSE KÄIK****Uuritava kemikaali kasutamine**

10. Uuritav kemikaal tuleks kanda väikesele (umbes 6 cm<sup>2</sup> suurusele) nahapinnale ning katta see marlilapiga, mida hoiab paigal nahka mitteärritav teip. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik otse nahale kanda (nt vedelikud ja mõned pastad), kantakse see esmalt marlilapile, mis seejärel asetatakse nahale. Lappi hoitakse kogu kokkupuuteperioodi vältel sobiva poolläbilaskva sideme abil õrnalt vastu nahka. Kui uuritav kemikaal kantakse lapile, tuleks lapp asetada nahale nii, et kemikaal puutuks nahaga korralikult kokku ja oleks nahal ühtlaselt jaotunud. Tuleks takistada looma ligipääsu lapile ning uuritava kemikaali allaneelamist ja sissehingamist.
11. Vedelaid uuritavaid kemikaale kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Kui katses kasutatakse tahket ainet (selle võib vajaduse korral pulbristada), tuleks uuritavat kemikaali niisutada võimalikult väikese koguse veega (või vajaduse korral muu sobiva kandainega), et tagada hea kokkupuude nahaga. Kui kasutatakse muud kandainet kui vett, peaks kandaine võimalik mõju uuritava kemikaali põhjustatud nahaärritusele olema minimaalne või puuduma.
12. Kokkupuuteperioodi lõppedes ehk tavaliselt nelja tunni möödudes tuleks uuritava kemikaali jäägid võimaluse korral vee või sobiva lahusti abil eemaldada, muutmata seejuures marrasknaha terviklikkust ega selles tekkinud reaktsiooni.



**▼M8****Annustamine**

13. Katses kasutatavale pinnale kantakse 0,5 ml vedelikku või 0,5 g tahket ainet või pastat.

**Algkatse (ühe loomaga *in vivo* katse nahaärrituse/-söövituse hindamiseks)**

14. Kui tõendite kaalukusel põhinevast analüüsist või varasematest *in vitro* katsetest nähtub, et uuritav kemikaal on söövitav või ärritav või klassifitseerimata, ei ole täiendavate *in vivo* katsete tegemine tavaliselt vajalik. Kui aga lisaandmete kogumine osutub vajalikuks, viiakse *in vivo* katse esmalt läbi ühe loomaga ja seejuures kasutatakse järgmist lähenemisviisi. Loomale pannakse üksteise järel kuni kolm katselappi. Esimene lapp eemaldatakse kolme minuti pärast. Kui tõsist nahareaktsiooni ei täheldata, pannakse loomale teine lapp ja eemaldatakse see tunni aja pärast. Kui selles etapis tehtud vaatlustest ilmneb, et kokkupuudet võib humaanselt pikendada nelja tunnini, pannakse loomale kolmas lapp, eemaldatakse see nelja tunni pärast ja hinnatakse tekkinud reaktsiooni.
15. Kui kolmest kõnealusest järjestikusest kokkupuuteperioodist ükskõik millise järel täheldatakse söövitavat toimet, lõpetatakse katse kohe. Kui pärast viimase lapi eemaldamist ei täheldata söövitavat toimet, jälgitakse looma 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui söövitatus ilmneb varem.
16. Kui uuritav kemikaal ei põhjusta eeldatavalt söövitust, kuid võib olla ärritav, tuleks ühele loomale panna üks lapp neljaks tunniks.

**Kinnitav katse (täiendavate loomadega *in vivo* katse nahaärrituse hindamiseks)**

17. Kui algkatses ei täheldata söövitavat toimet, tuleks ärritava toime olemasolu või puudumise kinnitamiseks kasutada veel kuni kahte looma ja iga looma puhul ühte lappi kokkupuuteperioodiga neli tundi. Kui algkatses täheldatakse ärritavat toimet, võib kinnitavas katses kasutada järjestikust hindamist või kanda kemikaali üheaegselt kahele lisaloomale. Kui erandjuhul ei ole algkatses tehtud, võib kahele või kolmele loomale asetada ühe lapi, mis eemaldatakse nelja tunni pärast. Kui kasutatakse kahte looma ja mõlemal täheldatakse sama reaktsiooni, ei ole vaja enam lisakatseid teha. Muul juhul tehakse katse ka kolmanda loomaga. Ebaselgete tulemuste hindamiseks võib olla vaja kasutada veel loomi.

**Vaatlusperiood**

18. Vaatlusperiood peaks olema piisavalt pikk, et võimaldada täielikult hinnata täheldatud toime pöörduvust. Siiski tuleks katse kohe lõpetada, kui loomal täheldatakse pideva tugeva valu või stressi tunnuseid. Toime pöörduvuse kindlakstegemiseks tuleks loomi jälgida kuni 14 päeva vältel pärast lapi eemaldamist. Kui pöörduvust täheldatakse enne 14 päeva möödumist, tuleks katse sel hetkel lõpetada.

**Kliinilised vaatlused ja nahareaktsioonide hindamine**

19. Kõikidel loomadest uuritakse nahapunetuse ja turse esinemist ning reaktsioone hinnatakse lapi eemaldamisest 60 minuti ning seejärel 24, 48 ja 72 tunni möödumisel. Ühe loomaga tehtavas algkatses vaadeldakse kokkupuutes olnud nahapinda ka vahetult pärast lapi eemaldamist. Nahareaktsioonide hindamiseks ja registreerimiseks kasutatakse allpool tabelis esitatud hindeid. Kui nahal esineb 72 tunni järel kahjustus, mis ei ole käsitatav ärrituse ega söövitusega, võib olla vaja teha vaatlusi kuni 14. päevani, et teha kindlaks toime pöörduvus. Peale ärrituse jälgimise tuleks täielikult kirjeldada kõiki

**▼M8**

paikseid mürgisuse ilminguid, näiteks naha rasvkoe kadumist, ja mis tahes süsteemseid kahjulikke toimeid (nt kliinilisi mürgisuse nähte ja mõju kehamaSSile) ning need registreerida. Ebaselgete tulemuste puhul tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

20. Nahareaktsioonide hindamine on paratamatult subjektiivne. Nahareaktsioonide hindamise ühtlustamiseks ning nii katseid läbi viivate laborite kui ka vaatlusi tegevate ja vaatlustulemusi tõlgendavate isikute abistamiseks on vaja vaatluste läbiviijad kasutatava hindamissüsteemiga (vt tabelit allpool) piisavalt kurssi viia. Seejuures võib olla abi illustreeritud juhendist nahaärrituse ja muude kahjustuste hindamiseks (3).

**ANDMED JA ARUANDLUS**

21. Uuringutulemused tuleks esitada lõplikus katseprotokollis tabeli kujul ja need peaksid hõlmama kõiki punktis 24 loetletud üksikasju.

**Tulemuste hindamine**

22. Nahaärrituse hindamisel tuleks ühtlasi arvesse võtta kahjustuse laadi ja raskustaset ning selle pöördumist või pöördumatust. Üksikud hinded ei väljenda eraldivõetuna aine ärritava toime absoluuttasest, kuna samaaegselt hinnatakse ka uuritava aine muud toimet. Selle asemel tuleks üksikuid hindeid käsitada võrdlusväärtsena, mida tuleb hinnata koos kõikide muude uuringu käigus saadud vaatlustulemustega.
23. Ärritusreaktsioonide hindamisel tuleks arvesse võtta nahakahjustuste pöördumist. Kui sellised reaktsioonid nagu alopeetsia (piiratud alal), hüperkeratoos, hüperplaasia ja kestendamine püsivad 14-päevase vaatlusperioodi lõpuni, tuleks uuritavat kemikaali käsitada ärritava kemikaalina.

**Katseprotokoll**

24. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*In vivo uuringu tegemise põhjendus:*

- olemasolevatest katseandmetest, sealhulgas järjekuse hindamise strateegia rakendamisel saadud tulemustest lähtuv tõendite kaalukusel põhinev analüüs;
- varasematest katsetest saadud asjakohaste andmete kirjeldus;
- igas katsestrateegia kohases etapis saadud andmed;
- tehtud *in vitro* katsete kirjeldus, sealhulgas katsete üksikasjalik käik ning uuritavate ja võrdlusainetega saadud tulemused;
- *in vivo* uuringu tegemist toetav tõendite kaalukusel põhinev analüüs.

*Uuritav kemikaal:*

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identifitseerimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

**▼M8**

- mitmest koostisosast koosnev aine, segu või tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB): võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalis-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katsed (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

*Kandeaine:*

- identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;
- kandeaine valimise põhjendus.

*Katseloom(ad):*

- kasutatud loomaliik/-liin, muu(de) looma(de) kui albiinoküüliku kasutamise korral sellekohane põhjendus;
- kummastki soost loomade arv;
- iga looma kaal katse alguses ja lõpus;
- vanus katse alguses;
- looma(de) päritolu, pidamistingimused, toitumisandmed jms.

*Katsetingimused:*

- lapi asetuskoha ettevalmistamise meetod;
- kasutatud lapimaterjalide ja lapi asetamise meetodi üksikasjad;
- uuritava kemikaali ettevalmistamise, pealekandmise ja eemaldamise üksikasjad.

*Tulemused:*

- ärritus-/söövitusnähtude hindamise tulemused iga looma kohta igal mõtiskorral tabeli kujul;
- kõikide täheldatud kahjustuste kirjeldus;
- täheldatud ärrituse või söövituse laadi ja astme jutustav kirjeldus ja võimalikud histopatoloogilised leiud;
- nahaärritusele ja -söövitusele lisanduvate muude kahjulike paiksete (nt naha rasvkoet kadumine) ja süsteemsete toimete kirjeldus.

**▼M8**

*Tulemuste arutelu*

*Järeldused*

**KIRJANDUS**

- (1) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. Heaks kiidetud kemikaalikomitee ja kemikaalide töörühma 28. ühiskoo-solekul novembris 1998.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼ **M8***Tabel***Nahareaktsioonide Hindamine****Nahapunetuse ja raia tekkimine**

Nahapunetust ei .....	esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus .....		1
Selgesti nähtav nahapunetus .....		2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus .....		3
Tugev nahapunetus (lihapunane) kuni punetuse hindamist takistava raia esinemine .....		4

Suurim võimalik punktide arv: 4

**Turse tekkimine**

Turset ei esine .....		0
Väga kerge (vaevumärgatav) turse .....		1
Kerge turse (ala servad on selgesti nähtavalt kõrgemal) .....		2
Mõõdukas turse (ala on ligikaudu 1 mm kõrgemal) .....		3
Tugev turse (ala on üle 1 mm kõrgemal ja levinud kokkupuutealast väljapoole) .....		4

Suurim võimalik punktide arv: 4

Ebaselgete tulemuste puhul võib teha histopatoloogilise analüüsi.

**▼ M8**

## Liide

## MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Nahasöövitus – pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatava nähtava nekroosi tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

Nahaärritus – pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaali kuni neljaks tunniks pealekandmise tagajärjel.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemetodi abil.

▼ M7

**B.5. SILMADE ÄGE ÄRRITUS/SÖÖVITUS**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ B

#### B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.



## ▼M4

**B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 407 (2008). Esialgne TG 407 võeti vastu 1981. aastal. 1995. aastal võeti vastu läbivaadatud versioon, et saada uuringus kasutatud katseloomalt lisa-teavet, eelkõige neurotoksilisuse ja immuuntoksilisuse kohta.
2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (8). Selle tegevuse üks osa on olemasoleva OECD juhendi „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel” (TG 407) ajakohastamine selliste näitajate lisamiseks, millega saab määrata uuritavate kemikaalide sisesekretsioonisüsteemi kahjustavat toimet. Ajakohastamiseks viidi ellu laialdane rahvusvaheline programm, et katsetada täiendavate näitajate asjakohasust ja kasutatavust, osutatud näitajate sobivust kemikaalide puhul, millel on (anti)östrogeenne, (anti)androgeenne ja (anti)türoidne toime, laborisest ja laboritevahelist korratavust ning uute näitajate ja varasema TG 407 kohaselt nõutud näitajate vastastikust mõju. Niimoodi saadud suur hulk andmeid on kokku võetud põhjalikus OECD aruandes (9), milles andmeid on ka üksikasjalikult hinnatud. Käesolev ajakohastatud katsejuhend B.7 (mis on samaväärne katsejuhendiga TG 407) on välja töötatud rahvusvahelise uurimisprogrammi käigus saadud tulemuste ja kogemuste alusel. Käesolev katsemeetod võimaldab seada teatavad endokriinsüsteemi kaudu põhjustavad toimed muude toksikoloogiliste mõjude konteksti.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha suukaudse mürgisuse katseid kordusdoosidega pärast seda, kui on saadud esialgne teave mürgisuse kohta ägeda mürgisuse katsetest. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on uurida mürgisust, mille põhjuseks on väga mitmesuguste võimalikele mürgisuse sihtsüsteemidele avaldatav toime. Sellega saadakse teavet võimalike terviseohtude kohta, mis võivad tekkida korduval kokkupuutel suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul ja mis hõlmavad mõju närvisüsteemile, immuunsüsteemile ja sisesekretsioonisüsteemile. Seoses nende konkreetsete eesmärkidega peaks käesoleva meetodiga olema võimalik kindlaks teha võimalikke neurotoksilisi kemikaale, mida tuleb sellest aspektist edaspidi veel süvendatult uurida, ja kemikaale, mis mõjutavad kilpnäärme talitlust. Meetodiga võib saada andmeid ka kemikaalide kohta, mis mõjutavad mees- ja/või naissuguelundeid noortel täiskasvanud loomadel, samuti nende kemikaalide immunoloogilise toime kohta.
4. Käesoleva katsemeetodiga B.7 saadud tulemusi tuleks kasutada ohtude kindlakstegemiseks ja riskide hindamiseks. Sisesekretsioonisüsteemi iseloomustavate näitajate kaudu saadud tulemuste käsitlemisel tuleks arvestada „OECD kontseptuaalset raamistikku sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks” (11). Meetod kujutab endast põhilist kordusdoosi toksilisuse uurimise meetodit, mida võib kasutada kemikaalide korral, mille puhul 90-päevane uuring ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismahd ei ületa teatavat piiri), või pikaajalist katset ettevalmistava uuringuna. Kokkupuute ajavahemik peaks olema 28 päeva.

**▼M4**

5. Nagu näitas rahvusvaheline programm, mis viidi ellu selliste parameetrite valideerimiseks, mis kõlbaksid uuritava kemikaali võimaliku sisesekreetsioonisüsteemi häiriva mõju kindlakstegemiseks, sõltub käesoleva katsemeetodi B.7 tulemuste kvaliteet tugevasti sellest, kui kogenud on uurimislabor. See kehtib eriti emaslooma suguorganite tsükliliste muutuste histopatoloogilise määramise kohta ning selliste väikeste hormoonsõltuvate organite massi määramise kohta, mida on lahkamisel raske eraldada. On välja töötatud histopatoloogiaalane juhend (19). Juhend on kättesaadav OECD katsejuhendeid käsitleva avaliku veebisaidi kaudu. Juhendi eesmärk on aidata patoloogidel teha vaatlusi ja aidata suurendada katse tundlikkust. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud toksilisuse kohta saab andmeid mitmesuguste näitajate kaudu, mida määratakse käesoleva katsemeetodiga. Näitajaid, mille kasulikuse tõendamiseks ei olnud piisavalt andmeid või mille kohta valideerimisel selgus, et nende võime leida sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavaid kemikaale on vähe tõendatud, pakutakse vabal valikul kasutatavate näitajatena (vt 2. liide).
6. Valideerimise käigus saadud andmete põhjal tuleb rõhutada, et käesoleva katse tundlikkus ei ole piisav selleks, et teha kindlaks kõik ained, millel on (anti)östrogeenne või (anti)androgeenne toime (9). Käesolevat meetodit ei kasutata eluetapil, mis on sisesekreetsioonisüsteemi mõjutamise suhtes kõige tundlikum. Valideerimisel võimaldas käesolev meetod siiski kindlaks teha aineid, mis nõrgalt või tugevasti mõjutavad kilpnäärme funktsiooni, ning tugeva ja mõõduka endokriinse toimega aineid, mis toimivad östrogeeni või androgeeni retseptorite kaudu, kuid enamikul juhtudest ei võimaldanud meetod kindlaks teha selliseid endokriinse aktiivsusega aineid, mis mõjutavad östrogeeni või androgeeni retseptoreid nõrgalt. Seepärast ei saa seda meetodit pidada endokriinse aktiivsuse leidmise sõeluuringu meetodiks.
7. Järelikult ei saa sellise toimeviisiga seotud mõju puudumist pidada tõendiks, et aine ei mõjuta sisesekreetsioonisüsteemi. Sisesekreetsioonisüsteemi kaudu avalduva mõju puhul ei tohiks aine iseloomustamisel toetuda üksnes käesolevale meetodile, vaid seda meetodit tuleks kasutada tõendite kaalumise lähenemisviisi raames ja aine võimaliku endokriinse aktiivsuse iseloomustamiseks võtta arvesse kõik kemikaali kohta olemas olevad andmed. Seepärast peaks õigusloomealaste otsuste tegemine endokriinse toime kohta (aine iseloomustamine) olema põhjendatud laiaulatuslikul alusel, mitte üksnes käesoleva katsemeetodi abil saadud andmetega.
8. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; siin esitatud hoolduse ja kohtlemise kirjeldused on katse tegemise miinimumnõuded ning kui kohalikud eeskirjad on rangemad, tuleb lähtuda kohalikest eeskirjadest. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (14).
9. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

**KATSE PÕHIMÕTE**

10. Uuritav kemikaal manustatakse katseloomade eri rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suurenevate doosidena selliselt, et üks rühm saaks 28 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või humaansel viisil surmatud loomad lahatakse ning katse lõppemisel surmatakse humaansel viisil ja lahatakse ka ellujäänud loomad. 28-päevane katse annab teavet korduva suukaudse kokkupuute mõjude kohta ja

**▼ M4**

katsest võib selguda, et on vaja korraldada pikemaid uuringuid. Samuti võib katse anda teavet pikemas katsemeetodis kasutatavate kontsentratsioonide valimise kohta. Käesoleva katsemeetodiga saadud andmed peaksid võimaldama kirjeldada uuritava kemikaali mürgisust, koostada mõju doosist sõltuvuse ja määrata katseloomadele täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsiooni (*No-Observed Adverse Effect Level*, NOAEL).

**MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

11. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka muid närilisi. Kui käesolevas katsemeetodis B.7 kirjeldatud näitajaid uuritakse mõne muu närilise-liigiga, tuleb seda üksikasjalikult põhjendada. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et muu liik peaks mürgisele kemikaalile reageerima sarnaselt rotiga, võib väiksemate loomade kasutamisel suureneda tulemuste hajuvus, kuna väikseid organeid on tehniliselt keerukam eraldada. Sisesekreetsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis kasutati ainsa liigina rotte. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Doseerimisega tuleks alustada võimalikult kohe pärast võõrutamist ja igal juhul enne loomade üheksanädalaseks saamist. Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ületada  $\pm 20$  % kummaski soost loomade keskmisest kehamassist. Kui suukaudse kordusdoosi uuringule järgneb pikaajaline uuring, tuleks mõlemas uuringus kasutada eelistatult samast aretusliinist ja sama päritoluga loomi.

**Pidamis- ja söötmingimused**

12. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 °C ( $\pm 3$  °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavalist labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleks pidada puurides väikeste samast soost isendite rühmadena; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada ka üksikpuurides. Rühmaviisilisel pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma.
13. Sööta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Sööda proov tuleb alles hoida kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni.

**Loomade ettevalmistamine**

14. Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad märgistatakse individuaalseks eristamiseks ning enne katse alustamist hoitakse neid vähemalt viis päeva puurides, et nad jõuaksid laboritingimustega kohaneda.

**Dooside ettevalmistamine**

15. Uuritav kemikaal manustatakse sundsöötmisega või koos sööda või joogiveega. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest ja toksiko-kineetilistest omadustest.

▼ **M4**

16. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-suspensiooni (nt maisiõlis) kasutamist ja siis lahustamist mõnes muus võimalikus kandeaines. Kui kandeainena kasutatakse muud ainet peale vee, tuleb teada kandeaine toksilisusega seotud omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines.

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

17. Igal doositasemel tuleks kasutada vähemalt kümnet looma (viis emas- ja viis isaslooma). Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist. Tuleb kaaluda täiendava kümnest loomast (viis kummaski soost) koosneva lisarühma (edaspidi: „satelliitrühm”) kasutamist kontrollina ja suurima doosi rühmas, et jälgida mürgise toime pöörduvust, püsivust või mürgisuse avaldumist hilinemisega vähemalt 14 päeva jooksul pärast doseerimise lõppu.

**Doseerimine**

18. Üldiselt tuleks kasutada vähemalt kolme doosi- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamise põhjal ei eeldata ühtegi mõju korduva doosiga 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, võib teha piirsalduskatse. Kui sobivaid andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (kasutades sama liini ja päritoluga loomi). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb võrdlusrühmale manustada kandeainet suurimas kasutatud mahus.
19. Doositaseme valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellelaadsete kemikaalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeim doositase tuleks valida nii, et see kutsuks esile toksilise toime, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed, et näidata doosi ja toime vahelist seost ning kahjuliku toime puudumist madalaimal doositasemel ehk täheldatava kahjuliku toimeta doositasemel (NOAEL). Alanevate kontsentratsioonide valimisel on sageli parim viis kasutada kahe- kuni neljakordseid vahemikke ja väga suurte kontsentratsioonivahemike (nt üle kümnekordne tegur) kasutamise asemel on parem lisada neljas katserühm.
20. Täheldatava üldise toksilisuse puhul (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muude muutuste puhul, mille põhjuseks ei tarvitse olla toksiline toime (näiteks isu halvendumine, maksa suurenemine), tuleks jälgitavaid mõjusid immuunsüsteemi, närvisüsteemi või sisesekretsioonisüsteemi näitajatele tõlgendada suure ettevaatusega.

**Piirsalduskatse**

21. Kui käesolevas uuringus kirjeldatud meetodiga ei tuvastata katses päevadoosil vähemalt 1 000 mg/kg kehamassi kohta või uuritava kemikaali protsentuaalselt sama suurel määral (määratud kehamassi alusel) sööda või joogivee kaudu manustamisel märkimisväärset toksilist mõju ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga kemikaalide kohta saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta täielikku kolme doositasemega uuringut vajalikuks. Võib teha piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

**▼ M4****Dooside manustamine**

22. Loomadele doseeritakse uuritavat kemikaali seitsmel päeval nädalas 28 päeva jooksul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada mahtu 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katsekoguse varieeruvust tuleks vähendada ja reguleerida kontsentratsioone nii, et doosi kogumaht oleks kõikide dooside korral sama; seda ei saa teha ärritavate või söövitavate kemikaalide puhul, mille mõju suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevneb.
23. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; tuleb täpsustada, millist võimalust kasutatakse. Kui kemikaali manustatakse sundsöötmisega, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et säiliks püsiv doositase looma kehamassi suhtes. Kui pärast kordusdoosi uuringut tehakse pikaajaline uuring, tuleks mõlema uuringu puhul kasutada samasugust sööta.

**Vaatlused**

24. Jälgimise ajavahemik peaks olema 28 päeva. Satelliitrühma kuuluvaid loomi, keda vaadeldakse pikema aja jooksul, et teha kindlaks uuritava kemikaali toksilise toime hilinenud ilmnemist, toime püsimist või toimest toibumist, tuleks pidada veel vähemalt 14 päeva ilma uuritavat kemikaali manustamata.
25. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitatavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse kõige tõenäolisemat aega pärast doseerimist, mille jooksul oodatud mõju peaks olema kõige tugevam. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.
26. Kõikide loomade puhul tuleks üksikasjalik kliiniline vaatlus teha enne seda, kui loomale esimest korda uuritavat kemikaali manustatakse (selleks, et loomi oleks võimalik omavahel võrrelda), ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, selleks ette nähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal kellaajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral uurimislabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja eelistatult ei tohiks vaatljad olla teadlikud uuritava kemikaali manustamisest. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäämisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (2).
27. Neljandal kokkupuutenädalal tuleks hinnata sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (2) (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (3, 4, 5), samuti haardetugevust (6) ja mootorset tegevust (7). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidatud dokumentides. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

**▼ M4**

28. Neljanda kokkupuutenädala funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta juhul, kui uuring tehakse subkroonilise toksilisuse 90-päevase uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks funktsionaalsed vaatlused teha kõnealuse järeluuringu käigus. Teiselt poolt võivad kordusdoosi uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgneva subkroonilise uuringu jaoks doositasemete valimist.
29. Erandkorras võib funktsionaalsed vaatlused ära jätta ka rühmade puhul, kellel esineb toksilisuse märke niisugusel määral, et see oluliselt takistab funktsionaalsete katsete tegemist.
30. Lahkamisel võiks tupeäiete abil määrata kõikide emasloomade innatsükli (valikuline). Sellistest andmetest saadakse teavet innatsükli järgu kohta looma surmamise ajal ja see aitab histoloogiliselt hinnata östrogeenitundlikke kudesid (vt histopatoloogia juhendid (19)).

**Kehamass ja sööda/vee tarbimine**

31. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist samuti mõõta vähemalt kord nädalas.

**Hematoloogia**

32. Katseperioodi lõpus tuleks teha järgmised hematoloogilised uuringud: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri leukotsüüdi populatsioonide arvud, verelehtakute arv ja vere hüübimisaja/hüübimisvõime mõõtmine. Kui uuritav kemikaal või selle oletatavad metaboliidid on või võivad olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha veel muid määramisi, sealhulgas määrata methemoglobiini kontsentratsioon ja Heini kehakesed.
33. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Enne surmamist tuleks loomi hoida üks öö söömata<sup>(1)</sup>.

**Kliiniline biokeemia**

34. Kliinilised biokeemilised analüüsid peamiste toksiliste mõjude uurimiseks kudedes ja eelkõige toime uurimisel neerudele ja maksale tuleks teha vereproovidega, mis on võetud loomadelt vahetult enne surmamist või selle ajal (välja arvatud loomad, kes leiti suremas ja/või surmati katse ajal). Plasma- või seerumiuringud peavad hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, üldkolesterooli, karbamiidi, kreatiniini, üldvalgu ja albumiini, vähemalt kahe hepatotsellulaarsele toimele osutava ensüümi (näiteksalaniinaminotransferaas, aspartaaminotransferaas, leeliseline fosfataas,  $\gamma$ -glutamüültranspeptidaas, ja glutamaatdehüdrogenaas) ja sapphapete määramist. Muude ensüümide (maksa- või muud ensüümid) ja bilirubiini mõõtmised võivad teataval tingimustel anda kasulikku teavet.
35. Uuringu viimasel nädalal on loomadelt teatava aja jooksul teatava mahuga uriiniproovide kogumise teel võimalik teha järgmisi uriinianalüüse: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valk, glükoos ja veri/vererakud.

<sup>(1)</sup> Mitmete seerumi ja plasma, eelkõige glükoosi mõõtmiste korral oleks eelistatav loomadele eelneva öö jooksul süüa anda. Selle peamine põhjendus on see, et söötmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Teisest küljest võib öö läbi söömata hoidmine aga häirida loomade tavalist üldist ainevahetust ja eelkõige söödaga manustamise uuringute puhul võib see häirida igapäevast kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kui loomadele ei anta öö jooksul süüa, tuleks uuringu neljandal nädalal tehtud funktsionaalsete vaatluste järel teha kliinilis-biokeemilised määramised.

▼ **M4**

36. Lisaks sellele tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate plasma- või seerumimarkerite uurimist. Muud määramised, mis tuleks teha juhul, kui uuritava kemikaali teadaolevad omadused võivad mõjutada või mõjutavad eeldatavasti sellega seotud metaboliseerimise profiili, hõlmavad kaltsiumi, fosfaadi, triglütseriidide, teatavate hormoonide ja koliinesteraasi määramist. Need on vaja määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.
37. Kuigi sisesekretsioonisüsteemi näitajate rahvusvahelise evalueerimisega ei õnnestunud näidata kilpnäärmehormoonide (T3, T4) ja TSH määramise selgeid eelseid, võib siiski olla kasulik hoida alles plasma- ja seerumi-proovid, et määrata T3, T4 ja (soovi korral) TSH, kui on andmeid, et võib esineda mõju ajuripatsi-kilpnäärme süsteemile. Neid proove võib säilitada külmutatult  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures. Hormoonide määramisel võivad hajuvust ja absoluutseid kontsentratsioone mõjutada järgmised tegurid:

- surmamise aeg, kuna hormoonide kontsentratsioonil on ööpäevane muutumise rütm;
- surmamisviis – tuleb vältida loomade tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsioone;
- hormoonide määramise testikomplektid, mille standardkõverad võivad olla erinevad.

Usaldusväärsemalt kui hormoonide taseme määramisega saab kilpnääret mõjutavaid kemikaale teha kindlaks histopatoloogilise analüüsiga.

38. Hormoonide määramiseks ette nähtud plasmaproovid tuleb saada enam-vähem ühel kellaaajal. T3, T4 ja TSH määramist soovitatakse kaaluda siis, kui kilpnäärmes leitakse histopatoloogilise uuringuga muutusi. Müügilolevate eri testikomplektidega saadakse erinevad hormoonikontsentratsioonide arvvaartused. Järelikult ei tarvitse olla võimalik esitada kvaliteedinõudeid, mis põhineksid ühesugustel varasematel andmetel. Teise võimalusena peaksid laborid püüdma hoida hajuvuskoeffitsiendid T3 ja T4 puhul allpool 25 ning TSH puhul allpool 35. Kõik kontsentratsioonid esitatakse ühikutes ng/ml.
39. Kui varasemad andmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne doseerimise algust või määrata need loomadel, keda ei kasutata katsesuhdades.

## PATOLOOGIA

### Täielik lahkamine

40. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevana ja/või surmatakse uuringu ajal) maks, neerud, neerupealised, munandid, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tervikuna, harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass määratakse kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist. Eesnäärme-kompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekestest vigastamist. Teise võimalusena võib seemnepõiekesed ja eesnäärme eraldada ja kaaluda pärast fikseerimist.

▼ **M4**

41. Lisaks tuleks vajaduse korral ja kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist kaaluda veel kaks kude: munasarjade paar (märgmass) ja emakas, kaasa arvatud emakakael (juhendid emakakudede eemaldamiseks ja kaalumiseks ettevalmistamiseks on esitatud dokumendis OECD TG 440 (18)).
42. Kilpnäärme massi võib (soovi korral) määrata pärast fikseerimist. Ka siin tuleks väljalõikamine teha väga hoolikalt ja alles pärast fikseerimist, et vältida koe kahjustamist. Koe kahjustamine võib histopatoloogilise analüüsi nurjata.
43. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 47) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju, ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealsed, põrn, süda, harknääre, kilpnääre, hingetoru ja kopsud (kopsud pumbatakse fiksaatorit täis ja pannakse fiksaatorisse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähedasema lümfisõlme tuleks võtta teine lümfiõlm vastavalt labori oskustele (15)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv), mis on eelistatult lihase lähedal, skeletilihased ning luu koos luuüdiga (saadud lõikamisega või alternatiivselt värskest imetud luuüdi). Munandid soovitatakse fikseerida sukeldamisega Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse (16, 17). *Tunica albuginea* tuleb elundi mõlemast otsast ettevaatlikult ja mitte sügavalt nõelaga läbi torgata, et fikseerimislahus saaks kiiresti sisse tungida. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid.
44. Sisesekretsiooniga seotud mõjude kohta võib väärtuslikke osundusi saada järgmiste kudede uurimisega: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanääre, harknääre ja neerupealsed. Muutusi isaslooma rinnanäärmetes ei ole piisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega kemikaalide suhtes. Soovi korral võib uurida ka organeid või kudesid, mida ei ole punktis 43 loetletud (vt 2. liide).
45. Histopatoloogia juhendis (19) on üksikasjaliselt esitatud lisateavet lahkamise, fikseerimise, väljalõikamise ja sisesekretsioonikudede histopatoloogia kohta.
46. Rahvusvahelise katsetusprogrammiga saadi mõningaid tõendeid, et suguhormoonide homeostaasi vähe mõjutavate kemikaalide nõrka endokriinset toimet võib kindlaks teha pigem mitmesuguste kudede ja östruse tsükli vahelise sünkronisatsiooni häirumise kaudu, mitte aga emassuguelundite selgete histopatoloogiliste muutuste kaudu. Kuigi sellise mõju kohta selgeid tõendeid ei saadud, soovitatakse tõendeid östruse tsükli võimaliku asünkroonsuse kohta võtta arvesse munasarjade (folliikulrakkude, teekarakkude ja granulosa-rakkude), emaka, emakakaela ja tupe histopatoloogiliste muutuste tõlgendamisel. Kui tupeäietega määratakse ka tsükli faasi, võiks saadud tulemust selles võrdluses samuti arvestada.



▼ **M4****Histopatoloogia**

47. Kõikide võrdlusrühma ja suure doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. Histopatoloogilised uuringud tuleks teha ka muude doosirühmade loomade puhul, kui suure doosi rühmas leitakse manustamisega seotud muudatusi.
48. Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.
49. Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks teha selliste kudede ja organite histopatoloogiline uuring, milles katserühma loomadel tehti kindlaks mõju.

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

50. Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles iga katserühma kohta märgitakse loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, iga surma või surmamise aeg, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgistusnähtude ilmnemise aeg, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik, raskusaste ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel neid esines.
51. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Mõju võrdlemisel manustatud doosidega tuleks vältida mitme t-testi kasutamist. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.
52. Kvaliteedikontrolliks soovitatakse koguda varasemaid kontrollkatsete andmeid ja arvutada arvandmete hajuvuskoeffitsiendid, eriti näitajate puhul, mis on seotud sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlaksteegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlemiseks, kui hinnatakse parajasti tehtavaid uuringuid.

**Katseprotokoll**

53. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalise-keemilised omadused;
- tunnusandmed.

*Kandeaine (vajaduse korral):*

- kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine on muu kui vesi.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- kui kasutatakse muud katselooma kui rott, siis liigi valimise põhjendus.

*Katsetingimused:*

- doositaseme valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali koostise / söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

**▼ M4**

- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral söödas/joogivees oleva uuritava kemikaali määra (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

*Uuritud valikulised näitajad:*

- uuritud valikuliste näitajate loetelu.

*Tulemused:*

- kehamass/kehamassi muutused;
- sööda tarbimine ja vajaduse korral vee tarbimine;
- toksilise mõju andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas mürgistusnähud;
- kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas nähud on pöörduvad või mitte);
- sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamine;
- hematoloogilised näitajad ja vastavad normaalväärtused;
- kliinilise biokeemia näitajad ja vastavad normaalväärtused;
- kehamass surmamise ajal ja organite mass;
- lahkamise tulemused;
- kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- võimaluse korral andmed imendumise kohta;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

*Tulemuste arutelu.**Järeldused.*

**▼ M4***1. liide***MÕISTED**

**Androgeensus** – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik meessuguhormoon (st testosteroon).

**Antiandrogeensus** – kemikaali võime alla suruda loodusliku meessuguhormooni (st testosterooni) mõju imetaja organismile.

**Antiöstrogeensus** – kemikaali võime alla suruda loodusliku östrogeense hormooni (st östradiool 17β) mõju imetaja organismile.

**Antitüroidne aktiivsus** – kemikaali võime alla suruda loodusliku kilpnäärme-hormooni (st hormoon T<sub>3</sub>) mõju imetaja organismile.

**Doseerimine** – üldmõiste, mis hõlmab doosi, doseerimise sagedust ja kestust.

**Doos** – manustatav uuritava kemikaali kogus. Doos väljendatakse uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg / kehamassi kg / päev) või söödas oleva püsiva kontsentratsioonina.

**Ilmne toksilisus** – üldmõiste, mis osutab selgetele mürgistusnähtudele pärast uuritava kemikaali manustamist. Kõnealused nähud peaksid olema piisavad ohu hindamiseks ja peaksid olema sellised, et manustatava doosi suurendamise tõenäoliseks tulemuseks on tugev toksilisus ning tõenäoliselt ka surm.

**NOAEL** – lühend, millega tähistatakse doositaset, mis ei põhjusta ilmseid mürgistusnähte. See on kõrgeim doositase, kus doseerimine ei põhjusta manustamisega seotud leide.

**Östrogeensus** – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik östrogeenne hormoon (st östradiool 17β).

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Türoidne aktiivsus** – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik kilpnäärme-hormoon (st hormoon T<sub>3</sub>).

**Valideerimine** – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

▼ **M4**

## 2. liide

**Käesolevas katsemeetodis B.7 sisesekreetsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemiseks soovitatavad näitajad**

Kohustuslikud näitajad	Vabalt valitavad näitajad
Mass	
— munandid	— munasarjad
— munandimanused	— emakas koos emakakaelaga
— neerupealised	— kilpnääre
— eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega	
Histopatoloogia	
— sugunäärmed:	— tupeäiged
— munandid ja	— isaslooma rinnanäärmed
— munasarjad	— ajuripats
— suguelundid:	
— munandimanused	
— eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega	
— emakas koos emakakaelaga	
— neerupealised	
— kilpnääre	
— tupp	
Hormoonide määramine	
	— T3 ja T4 tase vereringes
	— TSH tase vereringes

**KIRJANDUS**

- 1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- 2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60
- 3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
- 4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691–704.
- 5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- 6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.

▼ **M4**

- 7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- 8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 9) OECD (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.
- 10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- 11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. [http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr\\_2649\\_37407\\_2348794\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html)
- 12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- 13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- 14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 33: 404–407.
- 16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52–85.
- 17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- 18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- 19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼ **M4**

**B.8. SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE  
UURING**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼B****B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Testainet kantakse 28 päeva jooksul iga päev astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmnemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

**1.5. KVALITEEDINÕUDED**

Puuduvad.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Kasutada võib ka raseerimist, seda tuleks teha 24 tundi enne katset. Korduspügamist või -raseerimist on tavaliselt vaja ligikaudu nädalaste vahedega. Karvkate pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapiinast. Vabastatava ala ja katte mõõtmete valikul tuleks arvesse võtta looma massi. Tahkete, vajaduse korral peenestatud ainete puhul tuleks testaine nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Testainet kantakse nahale kord päevas, 5–7 päeval nädalas.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutada võib täiskasvanud rott, küülikut või merisiga. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada.

**▼B**

Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  vastavast keskmisest.

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga uuritavat annusemäära katsetakse vähemalt kümnel terve nahaga loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima annusega mõjutada 28 päeva jooksul üht kümne loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitühma ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöördumist, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht kümne kontrollloomaga (viis looma kummastki soost) satelliitühma.

1.6.2.3. *Annused*

Kasutatakse vähemalt kolme annusemäära ja kontrolli või kandja kasutamisel kandja kontrolli. Kokkupuuteperioodi kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas. Testainet tuleks peale kanda iga päev sarnastel kellaaegadel ja annuseid järk-järgult (üks või kaks korda nädalas) reguleerida, et annus jääks looma kehamassi suhtes konstantseks. Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollühma loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, tuleks kandja kontrollühmale manustada kandjat analoogselt katserühmaga ja nad peaksid saama sama koguse kandjat nagu kõrgeima annusemääraga rühm. Kõrgeim annus peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Väikseima doosi puhul ei tohiks mürgisust ilmneda. Kasutuskõlbliku hinnangulise inimkokkupuute annuse olemasolul peaks madalaim annus olema sellest kõrgem. Ideaaljuhul peaks keskmine annusemäär põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rohkem kui ühe vahepealse annuse kasutamisel peaks annusemäärad jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemääradega ning kontrollühmades olema madal.

Kui testaine nahale kandmine toob kaasa tugeva nahaärrituse, tuleks kontsentratsioone vähendada; selle tulemuseks võib olla muude mürgistusnähtude vähenemine või puudumine kõrgeima annusemääraga kasutamisel. Lisaks võib tõsiste nahakahjustuste ilmnemisel olla vaja uuring lõpetada ja teha madalamatel kontsentratsioonidel uus uuring.

1.6.2.4. *Piirsisalduskatse*

Kui eelkatse annusemääraga 1 000 mg/kg või kõrgema, võimaliku teadaoleva inimkokkupuute kontsentratsiooniga seotud annusemääraga ei kutsu esile mürgistusnähte, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Kõigil katseloomadel tuleb iga päev jälgida mürgistusnähtude ilmnemist. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ning tuleks registreerida.



**▼B****1.6.3. Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testainet kantakse loomade nahale 28 päeva jooksul, ideaaljuhul 7 päeval nädalas. Mis tahes satelliitühma loomadele, kellega planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust. Kokkupuute kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas.

Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapinnast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks kokkupuuteperioodi jooksul hoida poorse marlisideme ja mitteärritava kleepilindi abil naha vastas. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata. Kasutada võib ka kaitsekraed.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimaluse korral veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähtud ja nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Loomi tuleks iga nädal kaaluda. Soovitav on iga nädal mõõta ka toidu tarbimist. Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piires vältida loomade kadu sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotsimine nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

- 1) hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;
- 2) kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter:alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaatpüruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaatoksaloatsetaadi transaminaasina, kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinäidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on järgmised: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin ja koluni esteeraasi aktiivsus.

**▼B**

Vajaduse korral võib vaadeldava toime põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

1.6.4. **Üldlahang**

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neerupealised ja munandid tuleks kohe pärast lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed, st normaalne ja töödeldud nahk, maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja muud sihtelundid (see tähendab makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku hilisema histopatoloogilise uuringu jaoks.

1.6.5. **Histopatoloogiline uuring**

Kõrgeima annusega rühma ja kontrollrühma loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavaid kahjustusi sisaldavaid elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigil madalama annusega rühmadel. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nendele elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtlikus tabelis, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— katseloomade kohta käivaid andmeid (liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne);

— katsetingimusi (sealhulgas sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side);

— annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga) ja kontsentratsioone;

— võimaluse korral toimeta annust;

— mürgistusnähtude andmeid soo ja annuse järgi;

— surmahetke katse ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu;

— mürgistus- või muid nähte;

— iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu;

— sööda ja kehakaalu andmeid;

— kasutatud hematoloogilisi analüüse ja nende tulemusi;

**▼B**

- kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja nende tulemusi;
- lahkamistulemusi;
- kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust;
- võimaluse korral tulemuste statistilist käsitlust;
- tulemuste analüüsi;
- tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

▼ **M7****B.10. IN VITRO KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJA-  
RAKKUDEGA****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 473 (2016). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

*In vitro* kromosoomaberratsioonkatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes (2–4). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatidaberratsioonid. *In vitro* kromosoomaberratsioonkatsetes võib esineda polüploidisust (sealhulgas endoreduplikatsiooni). Kuigi aneugeenid võivad põhjustada polüploidisust, ei tõenda polüploidisus üksi aneugeenset potentsiaali ja võib lihtsalt viidata rakutsükli häirumisele või tsütotoksilisusele (5). Käesolev katse ei ole ette nähtud aneuploidisuse mõõtmiseks. Aneuploidisuse määramiseks on soovitatav kasutada mikrotuumade tekke *in vitro* katset (6).

*In vitro* kromosoomaberratsioonkatsetes võib kasutada inimrakkude või näriliste rakkude püsirakuline või primaarseid rakukultuure. Kasutatavad rakud valitakse rakukultuuris kasvamise võime, karüotüübi (sh kromosoomiarvu) stabiilsuse ja spontaansete kromosoomaberratsioonide sageduse alusel (7). Praegu olemasolevad andmed ei võimalda anda kindlaid soovitusi, kuid nende alusel võib eeldada, et keemiliste ohutegurite hindamisel on oluline võtta arvesse katseks valitud rakkude *p53* staatust, geneetilist (karüotüübi) stabiilsust, DNA reparatsiooni võimet ja päritolu (näriliste või inimpäritolu rakud). Seega soovitatakse käesoleva katsemeetodi kasutajatel indutseeritud kromosoomaberratsioonide tekke määramiseks võtta arvesse neid ja – valdkonna teadmiste lisandumisel – muid rakuliini toimimist mõjutavaid rakulisi näitajaid.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

**LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD**

*In vitro* katsete puhul tuleb üldjuhul kasutada eksogeenset metaboolse aktivatsiooni allikat, välja arvatud juhul, kui rakud metaboliseerivad uuritavaid kemikaale. Eksogeenne metaboolse aktivatsiooni süsteem ei ole täielikult samastatav *in vivo* tingimustega. Hoolikalt tuleb vältida tingimusi, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, st neid kromosoomikahjustusi, mida ei põhjusta uuritavate kemikaalide ja kromosoomide vaheline vahetu interaktsioon; sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi (8–10), söötmekoostisosadega reageerimist (11, 12) või liiga suurt tsütotoksilisust (13–16).

Käesolevat katsemeetodit kasutatakse selliste kromosoomaberratsioonide määramiseks, mida võivad põhjustada klastogeensed protsessid. Kromosoomaberratsioonide teket tuleb analüüsida metafasi rakkudes. Seega on oluline, et nii kemikaaliga töödeldud kui ka töötlemata rakkude puhul oleksid rakud jõudnud mitoosi. Käesoleva katsemeetodi kohandamiseks tehislise nanomaterjalide uurimiseks võib vaja minna erimeetmeid, kuid neid ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

▼ **M7****KATSE PÕHIMÕTE**

Inimrakkude või muud päritolu imetajarakkude kultuurid lastakse uuritava kemikaaliga kokku puutada nii metaboolse aktivatsiooni eksogeense allika juuresolekul kui ka ilma selleta, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piisava metaboli-seerimisvõimega rakke (vt punkt 13). Asjakohaste ettenähtud ajavahemike järel pärast rakkude kokkupuudet uuritava kemikaaliga töödeldakse neid rakutsükli metafaasis peatava kemikaaliga (nt koltsemiid või kolhitsiin), rakud kogutakse, värvitakse ning metafaasis rakke analüüsitakse mikroskoopiliselt kromatiid- või kromosoomaberratsioonide esinemise suhtes.

**MEETODI KIRJELDUS****Ettevalmistus***Rakud*

On võimalik kasutada mitmeid rakuliine (nt hiina hamstri munasarjarakuliin (CHO), hiina hamstri kopsurakuliin V79, hiina hamstri kopsurakuliin (CHL/IU), rakuliin TK6) või primaarkultuuri, sh inimese või teiste imetajate perifeerse vere lümfotsüüte (7). Rakuliinide valikut tuleb teaduslikult põhjendada. Kui kasutatakse primaarseid rakke, tuleb loomade heaolu huvides kaaluda inimpäritolu rakukultuuride kasutamist kõigil juhtudel, kui rakkude kättesaadavus on probleemitu ja proovivõtt on kooskõlas inimuuringute eetika põhimõtete ja nõuetega. Inimese perifeerse vere lümfotsüüte tuleks võtta noortelt (umbes 18–35aastastelt) mittesuitsetavatelt isikutelt, kellel ei ole teadaolevaid haigusi ning kes ei ole hiljuti kokku puutunud genotoksiliste teguritega (nt kemikaalid, ioniseeriv kiirgus) koguses, mis võiks suurendada kromosoomaberratsioonide esinemist katse foonis. See tagaks, et kromosoomaberratsioonide esinemissagedus foonis on väike ja püsiv. Kromosoomaberratsioonide esinemissageduse lähtetase suureneb vanusega ja see trend on rohkem väljendunud naistel kui meestel (17, 18). Kui eri doonoritelt kogutud rakud ühendatakse üheks prooviks, tuleb esitada doonorite arv. On vaja tõendada, et rakud on pärast uuritava kemikaaliga töötlemise alustamist kuni proovi võtmiseni jagunenud. Rakukultuure hoitakse eksponentsiaalse kasvu faasis (rakuliinid) või stimuleeritakse rakkude jagunemist (lümfotsüütide primaarkultuurid), et saada rakke rakutsükli eri faasidest, sest eri faasides olevate rakkude tundlikkus uuritava kemikaali suhtes võib olla teadmata. Primaarsed rakud, mida tuleb jagunemiseks stimuleerida mitogeenidega, ei ole uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal tavaliselt enam sünkroniseeritud (nt inimese lümfotsüüdid pärast 48tunnist stimulatsiooni mitogeeniga). Kemikaaliga töötamise ajal ei soovitata sünkroniseeritud rakkude kasutamist, kuid see võib olla aktsepteeritav, kui see on põhjendatud.

*Söötmed ja kultiveerimistingimused*

Rakukultuuride jaoks tuleb kasutada asjakohast söödet ja asjakohaseid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, sobiva õhuniiskuse juures 5 % CO<sub>2</sub> atmosfääris (kui asjakohane), inkubeerimistemperatuur 37 °C). Rakuliine tuleb tavapraktika korras kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasmaga saastumise puudumise suhtes (7, 19); saastunud rakke või rakke, mille modaalne kromosoomiarv on muutunud, ei kasutata. Katselaboris kasutatavate rakuliinide ja primaarkultuuride puhul tuleb teha kindlaks normaalne rakutsükliks kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele (20).

*Rakukultuuride ettevalmistamine*

Rakuliinid: rakke kasvatatakse tüvikultuurist, külvates neid söötmesse sellise tihedusega, et rakud jätkaksid nii suspensioonis kui ka monokihina eksponentsiaalset kasvamist kuni nende kogumiseni (nt monokihina kasvavate rakkude puhul tuleb konfluentsust vältida).

▼ **M7**

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisverest eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse (nt 48 tundi inimese lümfotsüütide puhul) mitogeeni juuresolekul (nt fütöhemaglutiniin (PHA) inimese lümfotsüütide puhul), et indutseerida rakkude jagunemist enne nende töötlemist uuritava kemikaaliga.

*Metaboolne aktivatsioon*

Eksogeenseid metaboliseerivaid süsteeme tuleb kasutada juhul, kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriiliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriine fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (21–23) või fenobarbitaali ja  $\beta$ -naftoflavooni kombinatsiooniga (24–29). Viimane ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*) (30) ning on mitme funktsiooniga oksüdaaside induktorina osutunud sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (24–28). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid kontsentratsiooni võib suurendada 10 %-ni (mahuprotsent) katse lõplikus söötmes. Tooteid, mis vähendavad mitoosiindeksit, eriti kaltsiumiga komplekse moodustavaid tooteid (31) tuleb vältida töötlemise ajal. Uuritavate kemikaalide klass võib mõjutada kasutatava eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi või ensüümi induktori tüüpi ja kontsentratsiooni valikut.

*Uuritava kemikaali preparaadi valmistamine*

Enne rakkude töötlemist tuleb tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral lahjendada (vt punkt 23). Uuritavat kemikaali, mis on vedelik, võib lisada katsesüsteemile vahetult ja/või lahjendada enne katsesüsteemile lisamist. Gaasi või lenduva kemikaali kasutamiseks katsetes tuleb katse-eeskirja asjakohaselt muuta, näiteks teha kemikaaliga töötlemine suletud anumaskes (32–34). Uuritava kemikaali preparaadid tuleb valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui nende stabiilsuse andmetest nähtub, et neid võib säilitada.

**Katsetingimused***Lahustid*

Lahusti tuleb valida nii, et uuritavate kemikaalide lahustuvust saaks parandada, ilma et see moonutaks katse käiku (nt muudaks rakkude kasvukiirust, muudaks uuritavat kemikaali, reageeriks rakkude kasvunõuga, kahjustaks metaboolse aktivatsiooni süsteemi). Kui see on vähegi võimalik, on esimese võimalusena soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks töötlustapis kasutatavas lõppsöötmes orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent) ja vesilahustuva lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ei tohiks ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb esitada andmed, millest nähtuks nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatud kontsentratsioonis. Nende tugiandmete puudumisel on oluline lisada lahustiga töötlemata kontrollid (vt 1. liide), et tõendada valitud lahustil kahjuliku või klastogeense toime puudumist.

*Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning uuritava kemikaali kontsentratsioonide valimine*

Uuritava kemikaali suurimat kontsentratsiooni määramisel tuleb vältida kontsentratsioone, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, nagu kontsentratsioonid, millel avaldub liiga suur tsütotoksilisus (vt punkt 22), söötmes sadestumine (vt punkt 23) või oluline pH või osmolaalsuse muutus (vt punkt 5). Kui kemikaal

▼ **M7**

muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH-d reguleerida töötlustapis kasutatavat lõppsöödet puhverdades, et vältida valepositiivseid tulemusi ja säilitada asjakohased rakkude kasvutingimused.

Mõõdetakse rakkude paljunemist, et veenduda selles, et piisav arv töödeldud rakke on katse ajal jõudnud mitoosi ja et töötlustused tehakse asjakohasel tsütotoksilisuse tasemel (vt punktid 18 ja 22). Tsütotoksilisust tuleb põhikatses määrata nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta, kasutades asjakohaseid meetodeid raku surma ja kasvu tuvastamiseks. Kuigi tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib osutada kasulikuks, et paremini määrata põhikatses kasutatavad kontsentratsioonid, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Kui tsütotoksilisust hinnatakse eelkatses, ei asenda need tulemused tsütotoksilisuse mõõtmist põhikatses.

Asjakohased meetodid tsütotoksilisuse hindamiseks tsütogeneetilistes katsetes on rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*relative population doubling*, RPD) või rakkude arvu suhteline suurenemine (*relative increase in cell count*, RICC) (13, 15, 35, 36, 55) (vt arvutusvalemid, 2. liide). Pikaajalise töötluste korral ja juhul, kui proovide võtmise aeg pärast kemikaaliga töötlemise algust ületab 1,5 korda rakutsükli kestust (st on pikem kui 3 rakutsüklit kokku), võib RPD kaudu tsütotoksilisust alahinnata (37). Neil tingimustel võib RICC olla parem mõõtmisvahend; RPD abil saaks tsütotoksilisuse kasuliku hinnang pärast 1,5 normaalse rakutsükli pikkusele vastava aja möödumist.

Lümfotsüütide primaarkultuuri puhul on tsütotoksilise/tsütostaatilise toime mõõduks mitoosiindeks (MI), kuigi seda mõjutavad kemikaaliga töötluste järel mõõdunud aeg, kasutatud mitogeen ja rakutsükli võimalik katkestus. Mitoosiindeks on sellele vaatamata aktsepteeritav, sest muud tsütotoksilisuse mõõtmised võivad osutada töömahukateks ja ebapraktiliseks ning neid ei saa kohaldada PHA-stimulatsiooni tagajärjel kasvavale lümfotsüütide populatsioonile.

Kuigi rakuliinide puhul on RICC ning RPD ja primaarse rakukultuuri puhul mitoosiindeks soovitatavad tsütotoksilisuse näitajad, võib kasulikku lisateavet saada ka muude näitajate (nt rakkude terviklikkus, apoptoos, nekroos, rakutsükkel) põhjal.

Lahusti kontrolli ja positiivset kontrolli kaasa arvamata tuleb hinnata vähemalt kolme katsekontsentratsiooni, mis vastavad nõuetekohasuse kriteeriumidele (asjakohane tsütotoksilisus, rakkude arv jne). Sõltumata rakuliigist (rakuliinid või lümfotsüütide primaarkultuur) võib iga kontsentratsiooniga töödelda kas paralleelselt mitut või ainult ühte rakukultuuri. Kuigi soovitatav on kasutada paralleelkultuure, võib ka üksikkultuuride kasutamist aktsepteerida eeldusel, et nii ühe kui ka paralleelkultuuride puhul hinnatakse kokku ühesugune arv rakke. Üksikkultuuride kasutamine on eriti asjakohane, kui hinnatakse rohkem kui 3 kontsentratsiooni (vt punkt 31). Konkreetse kontsentratsiooniga sõltumatutest paralleelkultuuridest saadud tulemused võib andmeanalüüsiks kokku arvestada (38). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, on tavaliselt sobivad kahe- kuni kolmekordsed kontsentratsiooniintervallid. Tsütotoksilisuse avaldumise korral peavad katseks valitud kontsentratsioonid katma

▼ M7

vahemiku alates kontsentratsioonist, mille avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 22), ja hõlmama kontsentratsioonid, mille esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-toime sõltuvuse kõver järsu tõusuga ja selleks, et saada andmeid vähese või mõõduka tsütotoksilisuse kohta või et uurida doosi-toime seost üksikasjalikult, tuleb kasutada väiksema intervalliga kontsentratsioone ja/või enam kui kolme kontsentratsiooni (üks kultuur või mitu paralleelkultuuri), eriti olukorras, kui vajatakse korduskatset (vt punkt 47).

Kui maksimumkontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, on suurima kontsentratsiooni puhul eesmärk saavutada  $55 \pm 5\%$  tsütotoksilisust, soovitatavate tsütotoksilisuse näitajate (st RICC ja RPD vähenemine rakuliinide puhul ning mitoosiindeksi vähenemine lümfotsüütide primaarkultuurides kuni  $45 \pm 5\%$  võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga) põhjal. Hoolikas tuleb olla nende positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mis esinevad ainult selle  $55 \pm 5\%$  tsütotoksilisuse vahemiku ülemises osas (13).

Halvasti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui kõige väiksem kontsentratsioon, millel kemikaal ei lahustu, peab suurim analüüsiv kontsentratsioon kemikaaliga töötamise lõpus alati tekitama hägususe või silma või invertmikroskoobiga nähtava sademe. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, millel kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, millel tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Sademe moodustumise kontsentratsioonil tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse tegemist (nt värvimist või hindamist). Kasulikuks võib osutada kemikaali lahustuvuse määramine söötmes enne katsega alustamist.

Kui ei sadet ega piiravat tsütotoksilisust ei täheldata, peab suurim kontsentratsioon katses vastama vähimale kontsentratsioonile järgmistest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (39-41). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, nt tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogiline materjal (UVCB) (42), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks olla vajalik kasutada suuremat maksimaalset kontsentratsiooni (nt 5 mg/ml), kui sellega ei kaasne olulist tsütotoksilisust. Tuleb siiski märkida, et inimravimite suhtes võivad need nõuded olla teistsugused (43).

*Kontrollid*

Iga kogumise kohta tuleb ette näha ka samaaegsed negatiivsed kontrollid (vt punkt 15), milles kemikaaliga töötamiseks kasutatavale söötmele lisatakse vaid lahusti ja mille rakke käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.

Samaaegseid positiivseid kontrole on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsete meetodika tingimustel tuvastada klastogeene ning (vajaduse korral) eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib kasutada alternatiivseid positiivseid kontrolli kemikaale. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud, võib positiivsete kontrollide osas piirduda metaboolset aktivatsiooni vajava klastogeeni kasutamisega. Eeldusel, et kontroll tehakse samaaegselt aktiveerimata katsega, kasutades töötamiseks sama kestust, nähtub sellest ainsast reaktsioonist positiivsele kontrollile nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi aktiivsus kui ka katsesüsteemi tundlikkus. Pikaajalise töötamise jaoks (ilma S9-fraaktsioonita) peab siiski olema oma positiivne kontroll, sest töötamise kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Iga positiivse kontrolli kemikaali tuleb kasutada ühel või enamal kontsentratsioonil, mis eelduse kohaselt põhjustab fooniga võrreldes korratava ja määratava suurenemise, et näidata katsesüsteemi tundlikkust (st toime on selge, kuid ei paljasta hindajale kohe, millise proovi või kontrolliga on kodeeritud kromosoomipreparaatide puhul tegemist), ning vastusreaktsiooni ei tohi moonutada tsütotoksilisus, mis ületab selles katsemeetodis ettenähtud piire.



▼ **M7**

Tabel 1.

**Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valikuks soovitatavad võrdluskemikaalid**

Kategooria	Kemikaal	CASi nr
1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin- <i>N</i> -oksiid	56-57-5
	Tsütosiinarabinoosiid	147-94-4
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid		
	Benso[a]püreen	50-32-8
	Tsüklofosfamiid	50-18-0

**KATSE KÄIK****Uuritava kemikaaliga töötlemine**

Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta.

**Rakkude kogumise aeg**

Negatiivse tulemuse kohta järelduse tegemiseks võib vaja minna põhjalikku hindamist, milleks tuleb katsed läbi viia, kasutades kõiki kolme eri katsetingimustega olukorda: lühiajaline töötlemine kemikaaliga koos metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta ning pikaajaline töötlemine kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita (vt punktid 43–45).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (18).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga metaboolse aktivatsiooni tingimustes ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (18).

— Rakud tuleb viia kemikaaliga pidevasse kokkupuutesse ilma metaboolse aktivatsioonita kuni proovi kogumise ajani, mis vastab umbes 1,5 normaalsele rakutsükli kestusele. Teatavate kemikaalide (nt nukleosiidi analoogid) toimet võib olla lihtsam määrata, kui töötlus/proovivõtuaeg on pikem kui 1,5 normaalset rakutsükli kestust (24).

Juhul kui üks eespool esitatud katsetingimustest andis positiivse tulemuse, võib muude katsetingimuste kasutamine osutada ebavajalikuks.

**Kromosoomipreparaatide valmistamine**

Rakukultuure töödeldakse koltsemiidi või kolhitsiiniga tavaliselt 1–3 tunni jooksul enne kogumist. Iga rakukultuur kogutakse ja töödeldakse kromosoomipreparaatide tegemiseks eraldi. Kromosoomipreparaatide valmistamiseks töödeldakse rakud hüpotoonilise lahusega, fikseeritakse ja värvitakse. Monokihtides võib 3–6 tundi kestnud töötlemise lõpus olla mitootilisi rakke (tuvastatavad selle järgi, et on ümmargused ja irduvad kasvunõu pinnalt). Kuna mitootilised

**▼ M7**

rakud irduvad kergesti, võib neid uuritavat kemikaali sisaldava söötme eemaldamisel kaotsi minna. Kui on tõendeid, et mitootiliste rakkude arv on kontrolliga võrreldes oluliselt suurem, mis viitab rakutsükli tõenäolisele peatumisele mitoosifaasis, tuleb rakud koguda tsentrifugimisega ja külvata tagasi rakukultuuri, et vältida kogumise ajal kromosoomaberratsiooni tekke riskiga mitoosis olevate rakkude kaotamist.

**Analüüs**

Kõik mikroskoobipreparaadid, sealhulgas need, millel on positiivsed ja negatiivsed kontrollid, tuleb sõltumatult kodeerida enne kromosoomaberratsioonide esinemise mikroskoopilist analüüsi. Fikseerimine põhjustab sageli osal metafasis rakkudest kromosoomide kadu, seetõttu tuleb hinnata vaid rakke, milles olevate tsentromeeride arv vastab modaalsele kromosoomiarvule  $\pm 2$ .

Iga kontsentratsiooni ja kontrolli kohta tuleb hinnata vähemalt 300 hästi eristuvat metafasi, et käsitada uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena (vt punkt 45). Kui kasutatakse paralleelkultuure, peavad 300 rakku olema paralleelide vahel võrdselt jagatud. Kui kontsentratsiooni kohta kasutatakse üht rakukultuuri (vt punkt 21), tuleb selles ühes kultuuris loendada vähemalt 300 hästi eristuvat metafasi. 300 raku loendamise eelis on, et see lisab katsele statistilist võimsust ja lisaks on tulemuseks harva nullväärtus (eeldatavasti vaid 5 %) (44). Hinnatavate metafasi arvu vähendatakse, kui tuvastatakse suur arv kromosoomaberratsioonidega rakke ja uuritavat kemikaali käsitatakse selgelt positiivsena.

Tuleb hinnata struktuursete kromosoomaberratsioonidega, sh tühikutega ja ilma, rakke. Kromosoomikatked ja tühikud määratletakse 1. liites kooskõlas kirjandusviidetega (45, 46). Kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid tuleb eraldi dokumenteerida ja klassifitseerida alatüüpide alusel (katked, vahetused). Labori eeskirjadega peab olema tagatud, et kromosoomaberratsioonianalüüsi teevad selleks koolitatud hindajad ning vajaduse korral kasutatakse vastastikust hindamist.

Kuigi katse eesmärk on tuvastada struktuursete kromosoomaberratsioonid, on tähtis registreerida ka polüploidisuse ja endoreduplikatsiooni sagedus juhul, kui neid täheldatakse. (Vt punkt 2.)

**Labori pädevus**

Katsemeetodiga piisava kogemuse saamiseks enne selle rutiinset kasutamist peab labor olema teinud katsesarju positiivse kontrolli kemikaalidega, mis toimivad teistsuguste mehhanismide kaudu, ja mitmesuguste negatiivse kontrolli kemikaalidega (kasutades erinevaid lahusteid/vehiikuleid). Nende positiivse ja negatiivse kontrolli kemikaalidega saadud reaktsioonid peavad olema kooskõlas teaduskirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata asjakohase kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktis 37.

Positiivseks kontrolliks valitud kemikaale (vt tabel 1, punkt 26) tuleb uurida lühija- ja pikaajalise töötusega ilma metaboolse aktivatsioonita ning ka lühiajalise töötusega metaboolse aktivatsiooni juuresolekul, et tõendada klastogeensete kemikaalide tuvastamiseks ja metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhususe määramiseks vajalikku pädevust. Valitud kemikaalide puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise vahemiku tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada foonist suuremaid ning korratavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid väärtusi.

**▼ M7****Varasemad kontrolli andmed**

Labor peab määrama:

- varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse,
- varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli (töötlemata proov, lahusti) tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui esmakordselt hangitakse andmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui need on olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (44, 47). Labori varasemate negatiivsete kontrollide andmebaasi koostamisel tuleb alguses kasutada vähemalt 10 katse andmeid, kuid eelistatavalt peaks andmebaas sisaldama vähemalt 20 võrreldavatel tingimustel tehtud katse andmeid. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (48)), et määrata, kui suures ulatuses positiivse ja negatiivse kontrolli andmed varieeruvad, ja tõendada, et meetodika on laboris „kontrolli all“ (44). Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st tulemuste varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (47).

Katse-eeskirja muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad andmete vastavust neile andmetele, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Oluliste mittevastavuste korral tuleb koostada uus varasemate kontrolli andmete andmebaas.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid hõlmama kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemust ühes rakukultuuris või nende summat paralleelkultuuridest, nagu on kirjeldatud punktis 21. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli andmete jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (44, 47). Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli andmete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 37) ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****TULEMUSTE ESITAMINE**

Struktuurse(te) kromosoomaberratsiooni(de)ga rakkude osakaalu hinnatakse protsentides. Alatüüpideks klassifitseeritud kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid (murrud, vahetused) loetletakse eraldi, esitades nende arvu ja sageduse uuritava kemikaali ja kontrolli kultuuride puhul. Tühikud registreeritakse ja nende andmed esitatakse eraldi, kuid neid ei võeta arvesse aberratsioonide üldsageduses. Polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude (kui neid täheldatakse) osakaal esitatakse protsentides.

Aberratsiooni põhikatses/-katsetes tuleb registreerida kõikide uuritava kemikaaliga töödeldud, negatiivse ja positiivse kontrolli kultuuride tsütotoksilisuse paralleelmõõtmiste tulemused.

Andmed tuleb esitada iga kultuuri kohta eraldi. Lisaks tuleb tabelina esitada kõikide andmete kokkuvõte.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

Katse nõuetekohasus põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktis 39;

**▼ M7**

- paralleelsed positiivsed kontrollid (vt punkt 26) peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad nendega, mis on olemas varasemate positiivse kontrolli tulemuste andmebaasis, ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;
- lahustiga kontrollis peab olema täidetud rakkude paljunemise kriteerium (punktid 17 ja 18);
- katsed on tehtud kõigis kolme olukorra katsetingimustes, välja arvatud juhul, kui ühes neist on saadud positiivsed tulemused (vt punkt 28);
- rakkude arv on piisav ja kontsentratsioonid on analüüsitavad (punktid 31 ja 21);
- suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 22–24.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui mis tahes uuritud katsetingimustes (vt punkt 28):

- a) vähemalt ühel uuritud kontsentratsioonil esineb statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- b) asjakohase trenditestiga hinnates nähtub, et see suurenemine sõltub annusest;
- c) ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotust (nt väljaspool Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 39).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, järeldatakse, et kemikaal põhjustab selles katsesüsteemis kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (49–51).

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punkt 28):

- a) mitte ühelgi uuritaval kontsentratsioonil ei esine statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- b) asjakohase trenditesti meetodiga hinnates ei esine annusest sõltuvat suurenemist;
- c) kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %; vt punkt 39).

Sel juhul järeldatakse, et kemikaal ei saa selles katsesüsteemis põhjustada kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes.

Selget positiivset või selget negatiivset reaktsiooni ei ole vaja kinnitada.

Juhul, kui reaktsioon ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne, nagu eespool kirjeldatud, või selleks, et teha kindlaks tulemuse bioloogiline olulisus, hinnatakse andmeid eksperdi hinnangu ja/või täiendavate uuringute abil. Kasulikuks võib osutada lisarakkude hindamine (kui see on asjakohane) või korduskatse tegemine, võimaluse korral muudetud tingimustes (nt kontsentratsioonivahemik, teistsugused metaboolse aktivatsiooni tingimused (nt S9-fraktsiooni kontsentratsioon või S9 päritolu).

Harvadel juhtudel võivad andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid olla positiivse või negatiivse tulemuse suhtes järeltulemuste tegemist välistavad ning seetõttu järeldatakse, et uuritava kemikaali toime on ebaselge.

**▼M7**

Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal võib inhibeerida mitoosi protsesse ja põhjustada kromosoomide arvu muutusi (52). Endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal võib inhibeerida rakutsükli edenemist (53, 54) (vt punkt 2). Seepärast tuleb polüploidsete rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakud eraldi registreerida.

**Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.
- uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis, kui teada;
- lisatud uuritava kemikaaliga rakusöötme pH mõõtmine, söötme osmolaalsus ja sademe teke selles.

*Ühe koostisosaga aine:*

- välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemilised nimetused vastavalt vajadusele ja praktilisele teostatavusele jne.

*Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:*

- iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest.

*Lahusti:*

- lahusti valiku põhjendus;
- samuti tuleb esitada lahusti protsendiline sisaldus lõppsöötmes.

*Rakud:*

- rakkude tüüp ja päritolu;
- karüotüübi omadused ja kasutatava rakutüübi sobivus;
- rakuliinide puhul: mükoplasma puudumine;
- rakuliinide puhul: teave rakutsükli kestuse, rakupopulatsiooni kahekordistumise aja või proliferatsiooniindeksi kohta;
- veredoonorite sugu, vanus ja muu asjakohane teave doonori, täisvere või eraldatud lümfotsüütide kohta, kasutatud mitogeen;
- rakuliinide puhul: passaažide arv, kui see on kättesaadav;
- rakuliinide puhul: rakukultuuride säilitamise meetodid;
- rakuliinide puhul: modaalne kromosoomiarv.

▼ **M7***Katsetingimused:*

- metafaasi peatava kemikaali nimetus, kontsentratsioon ja rakkudega kokkupuute kestus;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg või mg/ml või mM söötmes);
- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhjendus, sealhulgas nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud;
- söötme koostis; CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, kui asjakohane, niiskusesisaldus;
- söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);
- inkubatsioonitemperatuur;
- inkubatsiooniaeg;
- uuritava kemikaaliga töötlemise kestus;
- pärast töötlemist rakkude kogumise aeg;
- rakkude külvitihedus, vajaduse korral;
- metaboolse aktivatsiooni süsteemi tüüp ja koostis (S9-fraktsiooni allikas, S9-fraktsiooni segu valmistamise meetod, S9-fraktsiooni segu ja S9-fraktsiooni kontsentratsioon ja ruumala lõppsöötmes, S9-fraktsiooni kvaliteedikontrollid);
- positiivseks ja negatiivseks kontrolliks kasutatud kemikaalid, nende lõppkontsentratsioonid iga töötamise tingimuste puhul;
- mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;
- katsete nõuetekohasuse kriteeriumid;
- aberratsioonide hindamise kriteeriumid;
- analüüsitud metafaaside arv;
- tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;
- muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uuringutulemust käsitatakse positiivse, negatiivse või ebaselgena;
- pH, osmolaalsuse ja sadenemise määramiseks kasutatud meetodid.

*Tulemused:*

- töödeldud rakkude arv ja kogutud rakkude arv iga rakukultuuri kohta, kui kasutatakse rakuliine;
- tsütotoksilisuse mõõtmise tulemused, nt RPD, RICC, MI või muud vaatlusandmed, kui on olemas;
- rakutsükli kestuse, rakupopulatsiooni kahekordistumise aja või proliferatsiooniindeksi andmed rakuliinide puhul;
- sademe tekke tunnused ja määramise aeg;

▼ M7

- aberratsioonide, sh tühikute määratlemine;
- loendatud rakkude arv, kromosoomaberratsioonidega rakkude arv ning kromosoomaberratsioonide arv tüübiti eraldi iga töödeldud või kontrolli kultuuri kohta, tühikuid arvestades või välja jättes;
- ploidsuse muutused (polüploidised rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakud esitada eraldi), kui neid täheldati;
- kontsentratsiooni-toime vaheline seos, kui võimalik;
- paralleelse negatiivse (lahusti) ja positiivse kontrolli andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskväär-tused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti selliste andmete arv;
- statistiline analüüs; p-väärtused, kui olemas.

*Tulemuste arutelu.*

*Järeldused.*

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York ja London, pp. 1–29.
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“, in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-NewYork-Oxford, pp. 427–432.
- (4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), „Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, kd 10/suppl. 10, pp. 1–175.
- (5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318–327.
- (6) Käesoleva lisa peatükk B.49, „Mikrotoomade tekke *in vitro* katse imetajarakkudega“.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, „Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing“.
- (8) Scott, D. *et al.* (1991), „Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 257/2, pp. 147–204.
- (9) Morita, T. *et al.* (1992), „Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297–305.
- (10) Brusick, D. (1986), „Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789–886.

## ▼ M7

- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), „Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1–2, pp. 177–183.
- (12) Nesslany, F. *et al.* (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrotri-acetic Acid“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439–452.
- (13) Galloway, S. (2000), „Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191–201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), „Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, kd 584/1–2, pp. 1–256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), „Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), „Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), „Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex“, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305–309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), „The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting“, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95–106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261–287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), „Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies“, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp. 163–167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), „Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347–363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3–4, pp. 173–215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), „Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes“, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83–90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), „Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277–290.
- (25) Ong, T.-M. *et al.* (1980), „Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver“, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55–65.
- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175–177.



## ▼ M7

- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994), „Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241–261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), „Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, kd 28/1, pp. 51–59.
- (30) UNEP (2001), *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP)* (Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholm konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP)). Kättesaadav aadressil: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), „Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225–8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, väljaandes *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91–103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), „Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795–801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), „An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay“, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122–130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), „Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1–2, pp. 1–3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), „Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus)“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77–83.
- (37) Honma, M. (2011), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1–2, pp. 86–87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays“, *In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.
- (39) OECD (2014), „Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)“, ENV/JM/TG(2014)17. Nõude esitamisel kättesaadav.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), „Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1–2, pp. 32–56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36–43.

▼ M7

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), *Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances*, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), *International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use*. Kättesaadav aadressil: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 198*, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62–86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control Data“, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), „Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1–175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), „A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens“, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29–46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), „Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest“, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403–413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), „Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells“, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362–1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139–149.

▼ M7

## 1. liide

## MÕISTED

**Aneuploidsus** – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

**Apoptoos** – programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida etappe, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosiga või osakeste raku membraanilt koorumise teel (*shedding*).

**Endoreduplikatsioon** – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi ei käivitu rakutuumas mitoos, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, ... kromatiidi.

**Genoommutatsioon** – kasutatud rakkude normaalse kromosoomiarvu muutus.

**Genotoksiline** – üldtermin, mis hõlmab kõiki DNA või kromosoomi kahjustuse tüüpe, sealhulgas murde, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberpaigutusi, geenimutatsioone, kromosoomaberratsioone ja aneuploidsust. Mitte kõik genotoksiliste toimete tüübid ei põhjusta mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Klastogeen** – iga kemikaal, mis tekitab rakkude või eukariootsete organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomaberratsioone.

**Kontsentratsioonid** – tähendavad uuritava kemikaali lõppkontsentratsioone söötmes.

**Kromatiidaberratsioon** – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidide katkemisena või kromatiidide katkemise ja nendevahelise taasühinemisena.

**Kromatiidi tühik** – üksikkromatiidi värvumata (akromaatileine) piirkond, mille puhul kromatiidi lineaarses struktuuris tekkinud nihe on minimaalne.

**Kromatiidimurd** – üksikkromatiidi terviklikkuse selline katkemine, millega kaasneb ühe kromatiidi lineaarses struktuuris selge nihe.

**Kromosoomaberratsioon** – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemisena või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

**Lahusti kontroll** – üldtermin, millega tähistatakse kontrollikultuure, millele lisatakse ainult uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahusti.

**Maksa S9-fraatsioon** – maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifugimist 9000g juures, st maksa toorekstrakt.

**Mitoos** – rakutuuma jagunemine, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafasaiks, anafaasiks ja telofaasiks.

**Mitoosiindeks (MI)** – suhtarv, mis saadakse, kui vaatlusaluse rakupopulatsiooni metafasis olevate rakkude arv jagatakse rakkude koguarvuga; on selle rakupopulatsiooni proliferatsioonitaseme näitaja.

**▼ M7**

**Mutageenne** – tekitab päriliku muutuse geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomaberratsioonid).

**p53 staatus** – p53 on valk, mis on seotud rakutsükli, apoptoosi ja DNA reparatsiooni reguleerimisega. Teoreetiliselt peaksid geenimutatsioonid või kromosoomaberratsioonid kergemini tekkima rakkudes, milles puudub funktsionaalne p53-valk ja mis seetõttu ei ole võimelised rakutsükli peatama või kõrvaldama kahjustunud rakke apoptoosi või muude mehhanismide, nt DNA reparatsiooni indutseerimise kaudu, mille käivitab DNA kahjustus ja mis on seotud p53 funktsioonidega.

**Polüploidus** – rakkude või organismi selline genoommutatsioon, mis hõlmab terveid kromosoomistikke, erinevalt aneuploidisusest, mille puhul on muutunud üksikute kromosoomide arv.

**Rakkude arvu suhteline suurenemine (*Relative Increase in Cell Count, RICC*)** – kemikaaliga kokku puutunud rakukultuuris rakkude arvu suurenemine, võrreldes töötlemata kultuuriga; suhtarv väljendatakse protsentides.

**Rakkude paljunemine** – rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

**Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*Relative Population Doubling, RPD*)** – kemikaaliga kokku puutunud rakukultuuris rakupopulatsiooni kahekordistumise kordade suurenemine, võrreldes töötlemata kultuuriga; suhtarv väljendatakse protsentides.

**S9-fraktsiooni segu** – S9-fraktsiooni ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse jaoks vajalike kofaktorite segu.

**Struktuurne aberratsioon** – raku jagunemise metafaasi etapis mikroskoopiliselt tuvastatav kromosoomi struktuuri muutus, mida nähakse deletsioonide ja fragmentidena, inversioonide või kromosoomivaheliste translokatsioonidena.

**Tsütotoksilisus** – käesoleva katsemeetodi kohaselt rakuliinidega tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus rakupopulatsiooni suhtelise kahekordistumise (RPD) või rakkude arvu suhtelise suurenemise (RICC) vähenemisena töödeldud rakkudes negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 17 ja 2. liide). Käesoleva katsemeetodi kohaselt lümfotsüütide primaarkultuuridega tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus töödeldud rakkude mitoosiindeksi vähenemisena negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 18 ja 2. liide).

**Töötlemata kontroll** – paralleelsed rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M7

## 2. liide

## TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISE VALEMID

**Mitoosiindeks (MI) –**

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Mitoosis olevate rakkude arv}}{\text{Loendatud rakkude üldarv}} \times 100$$

Soovitatakse kasutada rakkude arvu suhtelist suurenemist (*Relative Increase in Cell Count*, RICC) või rakupopulatsiooni suhtelist kahekordistumist (*Relative Population Doubling*, RPD), sest mõlema puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Rakkude arvu suurendamine töödeldud kultuurides}(\text{lõpparv} - \text{algusarv}))}{(\text{Rakkude arvu suurendamine kontrollkultuurides}(\text{lõpparv} - \text{algusarv}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{Populatsiooni kahekordistumiste arv kontrollkultuurides})} \times 100$$

kus:

**populatsiooni kahekordistumine** =  $[\log(\text{rakkude arv pärast töötlust} \div \text{rakkude algarv})] \div \log 2$

Näiteks tähendab RICC või RPD 53 %, et tsütotoksilisus/tsütostaatilisus on 47 %, ning MI kaudu määratud tsütotoksilisus/tsütostaatilisus 55 %, et tegelik MI on kontrolli väärtusest 45 %.

Igal juhul tuleb määrata rakkude arv enne töötlust ja see peab olema sama kui rakkude arv töödeldud ja negatiivse kontrolli kultuurides.

Kuigi varem on tsütotoksilisuse näitajana kasutatud RCC-d (st rakkude arv töödeldud kultuuris / rakkude arv kontrollkultuuris), ei ole see enam soovitatav, sest sellega võib tsütotoksilisust alahinnata.

Negatiivse kontrolli kultuurides peab rakupopulatsiooni kahekordistumine olema vastavuses nõudega koguda rakud pärast töötlust ajal, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele, ja mitoosiindeks peab olema piisavalt palju suurem, et mitoosis olevate rakkude arv oleks piisav 50 % vähenemise usaldusväärseks arvutamiseks.

▼ **M7****B.11. KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIGA****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 475 (2014). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

*In vivo* kromosoomaberratsioonkatse imetajate luuüdiga on genotoksilisuse hindamiseks eriti oluline, sest kuigi metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooniprotsesside *in vivo* tegurid võivad liigiti erineda, on need aktiivsed ja annavad oma panuse organismi reageerimisse. Samuti võib *in vivo* katse olla kasulik *in vitro* süsteemis kindlaks tehtud genotoksilisuse täiendavaks uurimiseks.

*In vivo* kromosoomaberratsioonkatset imetajarakkudega kasutatakse uuritava kemikaali põhjustatud struktuursete kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks imetajate (tavaliselt näriliste) luuüdirakkudes (2–5). Struktuursete kromosoomaberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatidaberratsioonid. Kuigi enamik genotoksiliste kemikaalide põhjustatud aberratsioone on kromatidaberratsioonid, esineb ka kromosoomaberratsioone. Kromosoomikahjustused ja nende tagajärjed põhjustavad mitmeid inimeste geneetilisi haigusi ning on olulisi tõendeid selle kohta, et need kahjustused ja nende tagajärjed põhjustavad muutusi onkogeenides ja tuumorsuppressorgeenides ning on seotud vähktõve tekkega inimestel ja katsesüsteemides. Kromosoomaberratsiooni katsetes *in vivo* võib esineda polüploidisust (sealhulgas endoreduplikatsiooni). Polüploidisuse suuremine ei viita siiski iseenesest aneugeensele potentsiaalile ja võib lihtsalt viidata rakutsükli häirumisele või tsütotoksilisusele. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud aneuploidisuse mõõtmiseks. Mikrotuumade tekke *in vivo* katse imetajate erütrotsüütidega (käesoleva lisa peatükk B.12) või mikrotuumade tekke *in vitro* katse imetajarakkudega (käesoleva lisa peatükk B.49) oleksid vastavalt *in vivo* ja *in vitro* katsed, mis on soovitatavad aneuploidisuse määramiseks.

Kasutatud terminitega seotud mõisted on esitatud 1. liites.

**LÄHTEKAALUTLUSED**

Kõnealusel katse kasutatakse tavaliselt närilisi, kuid mõnel juhul võib asjakohane olla teiste liikide kasutamine, kui see on põhjendatud. Selle katse sihtkude on luuüdi, sest see on väga veresoonte rikas kude, milles on populatsioon kiire rakutsükliga rakke, mida on kerge eraldada ja käidelda. Katseprotokollis tuleb esitada teaduslik põhjendus, miks kasutatakse muud loomaliiki kui rott või hiir. Kui kasutatakse muud loomaliiki kui närilisi, on soovitatav, et luuüdi kromosoomaberratsioonide mõõtmine oleks integreeritud muusse asjakohasesse toksilisuse katsesse.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua sihtkoeni, võib käesoleva katse kasutamine olla asjakohatu.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

▼ **M7****KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Loomade viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, kasutades asjakohast kokkupuuteviisi, ning loomad hukatakse pärast kemikaaliga töötlemist humaanselt ja õigel ajal. Enne hukkamist manustatakse loomadele mitoosi metafaasis peatavat ainet (nt kolhiitsiini või koltsemiidi). Seejärel tehakse luuüdirakkudest kromosoomipreparaadid, need värvitakse ja analüüsitakse metafaasis olevate rakkude kromosoomaberratsioone.

**LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE****Pädevuse tõendamise katsed**

Kinnitamaks, et laboril on enne katse rutiinset kasutamist katse tegemise piisav kogemus, peab labor olema tõendanud, et ta suudab korrata avaldatud tööde (nt (6)) põhjal eeldatavaid tulemusi kromosoomaberratsioonide sageduse määramisel vähemalt kahe positiivse kontrolli kemikaaliga (kaasa arvatud positiivse kontrolli kemikaalide väikeste annustega põhjustatud nõrgad reaktsioonid), vt tabel 1, ja vastava vehiikuli/lahusti kontrolliga (vt punkt 22). Nendes katsetes tuleks kasutada annuseid, mis põhjustavad reprodutseeritavaid ja annusest sõltuvaid suurenemisi ning tõendavad katsesüsteemi tundlikkust huvipakkuva koe (luuüdi) puhul, mõõtmispiirkonna ja laboris kasutatava hindamismeetodi sobivust. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega labori puhul, see tähendab, kui laboril on varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktides 10–14.

**Varasemad kontrolli andmed**

Pädevuse tõendamise ajal peab labor kindlaks tegema:

— varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse ning

— varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui esmakordselt hangitakse andmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui need on olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaas peaks olema statistiliselt usaldusväärne, et laboril oleks võimalik hinnata oma negatiivse kontrolli andmete jaotust. Kirjanduse põhjal läheb vaja vähemalt kümnet katset, kuid parem oleks, kui andmebaasis oleksid vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse tulemused. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (7)), et määrata, kui suures ulatuses andmed varieeruvad, ja tõendada, et meetodika on laboris „kontrolli all“. Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse vastuvõetavuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (8).

Kui labor ei tee piisavat arvu katseid, et saada statistiliselt usaldusväärne negatiivse kontrolli jaotus (vt punkt 11) pädevuskontrolli katsete käigus (kirjeldatud punktis 9), siis on lubatud selle jaotuse kindlakstegemine esimeste rutiinsete katsetega. Sellise lähenemisviisi kasutamisel tuleks järgida kirjanduses (8) esitatud soovitusi ja nendes katsetes saadud negatiivse kontrolli tulemused peaksid olema kooskõlas negatiivse kontrolli kohta avaldatud andmetega.

▼ **M7**

Katse-eeskirja kõigi muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad saadavate andmete kooskõla andmetega, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Ainult väga vastuoluliste andmete puhul tuleks koostada uus varasemate kontrolli tulemuste andmebaas, kui eksperdihinnangu alusel tuvastatakse, et uus jaotus erineb varasemast jaotusest (vt punkt 11). Uue andmebaasi koostamise ajal ei ole konkreetse katse tegemise lubamiseks negatiivsete kontrollide täielikku andmebaasi vaja, kui labor suudab tõendada, et nende paralleelse negatiivse kontrolli väärtused on kooskõlas nende varasema andmebaasiga või vastavate avaldatud andmetega.

Negatiivse kontrolli andmetes peab iga looma kohta esitama kromosoomaberratsioonide (välja arvatud tühikute) esinemissageduse. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli tulemuste jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku väärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 11) ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

**MEETODI KIRJELDUS****Ettevalmistused***Loomaliigi valimine*

Kasutada tuleb tavapärastest laboriliinidest pärit terveid noori täiskasvanud isendeid. Tavaliselt kasutatakse rotte, kuigi ka hiired võivad katseks sobida. Ka mis tahes muid katseks sobivaid loomaliike võib kasutada, kui selle kohta esitatakse katseprotokollis teaduslik põhjendus.

*Loomade pidamis- ja söötmingimused*

Näriliste puhul peab loomade pidamisruumi temperatuur olema 22 °C ( $\pm 3$  °C). Kuigi suhteline niiskus peaks ideaaltingimustes olema 50–60 %, peab see olema vähemalt 40 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada labori tavapärast söödavalikut koos piiramatuse koguses joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades (kuni viis looma puuris), igas puuris on samast soost ja sama katserühma loomad, kui ei eeldata agressiivset käitumist; eelistatud on kõva põrandaga ja asjakohaselt mitmekesistatud keskkonnaga puurid. Loomi võib tühekaupa pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

*Loomade ettevalmistamine*

Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud loomi (näriliste puhul ideaaljuhul katse alguses 6–10nädalased loomad, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad), kes jagatakse juhuvaliku alusel katse- ja kontrollirühmadesse. Iga loom saab kordumatu identimismärgistuse, mille tegemiseks kasutatakse humaanset võimalikult vähe invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokii-pimine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine või varba kõndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõju on võimalikult väike. Tuleb vältida ristasaastumist positiivse kontrolli ja uuritava kemikaaliga. Katse alguses peavad loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte erinema üle  $\pm 20$  % kummagi soo keskmisest massist.

*Annuste valmistamine*

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või vehiikulis ja segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist.



▼ **M7**

Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsilis-keemilistest omadustest. Kasutada tuleks uuritava kemikaali värsked preparaate, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

*Lahusti/vehiikul*

Kasutatavates annustes ei tohi lahusti/vehiikul avaldada toksilist toimet ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse muid kui kirjeldatud omadustega lahusteid/vehiikuleid, peab võrdlusandmetest nähtuma nende sobivus. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/vehiikulid on näiteks vesi, füsioloogiline keedusoolalahus, metüülselluloosi lahus, karboksümetüülselluloosi naatriumsoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Kui puuduvad varasemad või avaldatud kontrolli andmed, millest nähtub, et valitud ebatüüpiline lahusti/vehiikul ei põhjusta kromosoomaberratsioonide teket ega muid kahjulikke tagajärgi, tuleb kõigepealt teha eelkatse, et tõendada lahusti/vehiikuli kontrolliks kasutamise sobivust.

**Kontrollid***Positiivsed kontrollid*

Igasse katsesse peab tavaliselt kavandama positiivse kontrolli kemikaaliga kokku puutuva loomade rühma. Sellest võib loobuda juhul, kui katselabor on tõendanud kõnealuse katse läbiviimise pädevust ja on kindlaks teinud varasemate katsete positiivse kontrolli vahemiku. Kui paralleelset positiivse kontrolli rühma ei kasutata, tuleb igas katses teha hindamise kontrolle (fikseeritud ja värvimata mikro-preparaadid). Neid saadakse, kui katse hindamisel lisatakse asjakohased võrdlustandardid, mis on saadud ja säilitatud eraldi tehtud positiivse kontrolli katsest, mida tehakse uuringukatset läbiviivas laboris korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu tagant), näiteks tasemekatsete käigus ja seejärel korrapäraselt vastavalt vajadusele.

Positiivse kontrolli kemikaalid peavad usaldusväärset põhjustama struktuursete kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemissageduse määratava suurenemise, võrreldes spontaanse esinemissagedusega. Positiivse kontrolli annused valitakse nii, et nende toime on selge, kuid see ei paljasta hindajale kohe kodeeritud proovide identiteeti. Positiivse kontrolli kemikaali manustamiseks võib kasutada ka muud manustamisteed kui uuritava kemikaali puhul, muu manustamiskeemi kasutamine ja proovide võtmine võib toimuda ka ainult ühel ajahetkel. Kui see on asjakohane, võib lisaks kaaluda selliste positiivse kontrolli kemikaalide kasutamist, mis kuuluvad uuritava kemikaaliga samasse kemikaalide rühma. Tabelis 1 on esitatud mõned positiivse kontrolli kemikaalide näited.

Tabel 1

**Positiivse kontrolli kemikaalide näited**

Kemikaal	CASi nr
Etüülmetaansulfonaat	62-50-0
Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
<i>N</i> -etüül- <i>N</i> -nitrosokarbamiid	759-73-9
Mitomütsiin C	50-07-7
Tsüklofosfamiid (monohüdraat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietüleenmelamiin	51-18-3

▼ **M7***Negatiivsed kontrollid*

Igal proovivõtukorral tuleb võtta proovid ka negatiivse kontrolli rühma loomadelt, keda muidu tuleb käidelda samamoodi nagu katserühma loomi, selle erinevusega, et neile ei manustata uuritavat kemikaali. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse lahustit/vehiikulist, tuleb kontrollrühmale manustada sedasama lahustit/vehiikulist. Kui igal proovivõtu korral on saadud negatiivse kontrolli andmed kromosoomaberratsioonidega rakkude esinemissageduse kohta olnud kooskõlas katselabori varasemates katsetes saadud negatiivse kontrolli andmetega, arvestades loomadevahelist varieeruvust, võib negatiivse kontrolli jaoks vaja minna ainult ühte proovivõttu. Kui negatiivse kontrolli puhul kasutatakse ainult ühte proovivõttu, tuleb see teha uuringu esimese proovivõtu ajal.

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

Üldjuhul on mikrotoimade tekke reaktsioon isas- ja emasloomadel ühesugune (9) ning eeldatakse, et see kehtib ka kromosoomaberratsioonide kohta; seepärast võib enamiku katseid teha ükskõik kummast soost loomadega. Andmed, millest nähtuks isas- ja emasloomade vaheline erinevus (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biosaadavuse, luuüdi suhtes avalduva toksilisuse jne erinevus, sealhulgas nt annusevahemiku uuringu sellekohased andmed), toetaksid kummastki soost loomade kasutamist. Sel juhul võib olla asjakohane teha uuring kummastki soost loomadega, näiteks osana korduvannuse toksilisuse uuringust. Kui kasutatakse kummastki soost loomi, võib olla asjakohane kasutada mitme faktori määramist võimaldavat katseplaani. Üksikasjad, kuidas sellise katseplaani puhul andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Uuringu alguses tuleb määrata rühmade suurused, nii et rühmas oleks vähemalt viis analüüsitavaid samast või kummastki soost looma (kui kasutatakse mõlemast soost loomi). Kui inimese kokkupuude kemikaalidega võib olla soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Kahe proovivõtuajaga luuüdiuuringuks, milles on kolm eri annusega katserühma, paralleelne negatiivse kontrolli rühm ning positiivse kontrolli rühm (igas rühmas on viis samasoolist looma), on vastavalt maksimaalsele tüüpvajadusele vaja 45 looma.

**Annused**

Kui tehakse annusevahemiku eeluuring, sest puuduvad sobivad andmed annusevahemiku valimiseks, tuleb see teha samas laboris ning kasutada sama loomaliiki, -liini, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus (10). Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis on suurim annus, mida loomad uuringuperioodil taluvad, ilma et neil avalduks uuringut piirava toksilisuse nähte (näiteks väheneb neil kehamass või avaldub tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes, kuid see ei kutsu esile surmajuhte ega sellist valu, piinlemist või kannatusi, mis nõuaksid loomade humaanset hukkamist (11)).

Suurimat annust võib määratleda ka doosina, mille korral esineb teatavaid luuüdi suhtes avalduva toksilisusega seotud nähte.

Kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mille tõttu kokkupuude võib väheneda pärast nende pikaajalist manustamist, võivad olla doosi määramise kriteeriumide seisukohast erandlikud ning iga üksikuhtumit tuleks hinnata eraldi.

Teabe saamiseks annuse ja toime seose kohta peab täielikus uuringus olema negatiivne kontrollrühm ja vähemalt kolm eri annust, mis tavaliselt erinevad üksteisest kaks korda, kuid mitte enam kui neli korda. Kui kemikaal ei ole doosivahemiku eelkatse või olemasolevate andmete põhjal toksiline, on suurim ühekordselt manustatav annus 2 000 mg kehamassi kg kohta. Kui uuritav kemikaal siiski on toksiline, peab suurim manustatav annus olema maksimaalne talutav doos (MTD) ning muud kasutatavad annused peaksid eelistatavalt olema vahemikus sellest maksimaalselt talutavast doosist kuni vähetoksilise või

▼ **M7**

üldse mitte toksilise annuseni. Kui toksilisust sihtkoe (luuüdi) suhtes täheldatakse kõigi katses kasutatud annuste puhul, on soovitatav teha katse ka mittetoksilise annusega. Uuringutes, milles tahetakse täielikult iseloomustada kvantitatiivset annuse ja toime seost, võib vaja minna täiendavaid annuserühmi. Teatavat tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimite) puhul, millele kohaldatakse erinõudeid, võivad need piirmäärad olla teistsugused.

**Piirsalduskatse**

Kui annusevahemiku leidmise katsetest või lähedasi loomaliine käsitlevatest andmetest on saadud tõendeid, et piirannuse manustamise katses (kirjeldatud allpool) ei ole uuritaval kemikaalil sedastatavat toksilist toimet (sealhulgas luuüdirakkude paljunemise vähenemist ega muid tõendeid tsütotoksilisusest sihtkoes), ja kui genotoksilisust ei ole alust eeldada *in vitro* genotoksilisuse uuringute või sarnase struktuuriga kemikaalide andmete põhjal, võib täielikku kolme annusetasemega uuringut käsitada ebavajalikuna, kui on tõendatud, et uuritav kemikaal jõuab / uuritavad kemikaalid jõuavad sihtkoele (luuüdisse). Sellistel juhtudel võib olla piisav teha katse ühe annusega, mis on piirannus. Kui manustamisperiood on rohkem kui 14 päeva, on piirannus 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on 14 päeva või vähem, on piirannus 2 000 mg kehamassi kg kohta päevas.

**Annuste manustamine**

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seega võib valida selliste kokkupuuteviiside seast, nagu manustamine sööda või joogiveega, paikselt naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implantatsiooniga, kui see on põhjendatud. Igal juhul tuleb kokkupuuteviisi valikuga tagada kemikaali adekvaatne kokkupuude sihtkoega/-kudedega. Tavaliselt ei soovitata intraperitoneaalset süstimist, sest see ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuuteviis, ning seda võib kasutada ainult konkreetse teadusliku põhjenduse alusel. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda sisse või joogivette, eriti ühekordse annuse manustamise korral, tuleb jälgida, et ajavahemik sööda ja vee tarbimise ning proovide võtmise vahel oleks piisav, et võimaldada toime tuvastamist (vt punktid 33–34). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstimisel ühe korraga manustada, sõltub katselooma suurusel. Tavaliselt ei tohi kogus ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada kogust 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Kui jätta välja ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille toime on suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevam, tuleb katses vedelikukoguse varieeruvust minimeerida ja reguleerida kontsentratsioone nii, et kõiki annuseid manustataks kehamassi suhtes ühesuguse lahusekogusega.

**Manustamiskava**

Tavaliselt manustatakse uuritavaid kemikaale ühekordse annusena, kuid neid võib manustada ka jagatud annustena (näiteks kaks manustamist ühel päeval mitte rohkem kui 2–3tunnise vahega), et kergendada suure lahusekoguse manustamist. Selles olukorras või kui uuritavat kemikaali manustatakse inhalatsiooniga, tuleb proovide võtmise aeg kavandada viimase manustamise või kokkupuute lõppemise aja põhjal.

Korduvannuse eeskirja kasutamise kohta seoses käesoleva katsega on vähe andmeid. Olukorras, kui on siiski soovitatav ühendada see katse korduvannuse toksilisuse katsega, tuleb jälgida, et välditaks kromosoomikahjustustega mitoosirakkude kadu, mis võib tekkida toksiliste annuste juures. Selline katsete ühendamine on vastuvõetav ainult siis, kui suurim annus on suurem piirannusest (vt

**▼ M7**

punkt 29) või sellega võrdne ja annuserühmale manustatakse piirannust kogu töötlemise perioodi ajal. Mikrotuumade tekke katset (katsemeetod B.12) tuleb käsitleda valikmeetodina kromosoomaberratsioonkatteks *in vivo*, kui seda soovitakse ühendada teiste uuringutega.

Luuüdiproovid tuleb võtta kahel korral pärast ühekordset manustamist. Näriliste puhul peab esimene proovivõtuvahemik võrduma ajaliselt 1,5 normaalse rakutsükli läbimiseks kuluva ajaga (tavaliselt 12–18 tundi pärast manustamist). Kuna uuritava kemikaali / uuritavate kemikaalide omastamiseks ja metabolismiks vajalik aeg ja ka kemikaali toime rakutsükli kineetikale võivad mõjutada optimaalset aega kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks, on soovitatav võtta teine proov 24 tundi pärast esimese proovi võtmist. Esimese proovivõtu ajal peab uuritav kemikaal olema manustatud kõigile annuserühmadele ning kõigilt rühmadel kogutakse proovid analüüsimiseks; järgmistel proovivõtukordadel tuleb manustada üksnes suurimat annust. Kui teadusliku põhjenduse alusel kasutatakse üle ühe päeva pikkust annustusskeemi, kasutatakse pärast lõppannuse manustamist ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestuse möödumise järel tavaliselt ühte proovivõtu korda.

Pärast manustamist ja enne proovi võtmist süstitakse loomadele intraperitoneaalselt asjakohases annuses rakke metafaasis peatavat ainet (nt koltsemiidi või kolhitsiini) ning proovid võetakse pärast asjakohase ajavahemiku möödumist. Hiirte puhul on see ajavahemik ligikaudu 3–5 tundi enne proovi võtmist ja rottide puhul 2–5 tundi. Luuüdi rakud kogutakse, töödeldakse nende pundumiseks, fikseeritakse ja värvitakse ning neis analüüsitakse kromosoomaberratsioonid (12).

**Vaatlus**

Vähemalt üks kord päevas, eelistatult igal päeval samal ajal ning võttes arvesse ajavahemikku, kui eeldatav toime avaldub pärast annuse manustamist kõige intensiivsemalt, tuleb teha katseloomade üldine kliiniline vaatlus ja registreerida kõik kliinilised sümptomid. Haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda päevas üle vaadata. Kõik loomad tuleb kaaluda uuringu alguses, korduvannuse uuringute ajal vähemalt kord nädalas ja pärast eutanaasiat. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleb vähemalt kord nädalas mõõta tarbitud sööda kogust. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad äärmusliku, kuigi mitte letaalse toksilisuse rasked nähud, tuleb enne katse lõppu humaanselt hukata (11).

**Sihtkoe kokkupuude**

Kui muid andmeid uuritava kemikaali ja luuüdi kokkupuute tõendamiseks ei ole, tuleb asjakohasel ajal (asjakohastel aegadel) võtta vereproov(id) ja analüüsida neist kemikaali sisaldust plasmas, et selle kaudu tõendada luuüdi ja kemikaali kokkupuute toimumist (vt punkt 44).

**Luuüdi- ja kromosoomipreparaadid**

Kohe pärast humaanset eutanaasiat eraldatakse luuüdi rakud loomade reie- või sääreluust, pannakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse. Seejärel tehakse metafaasis olevatest rakkudest äigepreparaat ning värvitakse see kindlaks määratud meetoditel (vt 3, 12).

**▼ M7****Analüüs**

Kõik mikroskoobipreparaadid, sh positiivse ja negatiivse kontrolliga, tuleb enne analüüsi sõltumatult kodeerida ja randomiseerida, nii et hindaja ei teaks, millise rühma loomalt proov on saadud.

Kõikide katseloomade (sh positiivse kontrolli loomade) ning kemikaaliga mitte kokku puutunud või vehiikuli/lahustiga kokku puutunud negatiivse kontrolli rühma loomade puhul tuleb tsütotoksilisuse mõõtmiseks määrata mitoosiindeks, kasutades vähemalt 1 000 rakku iga looma kohta.

Iga looma kohta tuleb analüüsida 200 metafaasis rakku struktuursete kromosoomaberratsioonide (nii koos tühikutega kui ka ilma tühikuid arvestamata) esinemise suhtes (6). Kui varasemate katsete negatiivse kontrolli andmebaasi alusel nähtub, et struktuursete kromosoomaberratsioonide keskmine esinemissagedus katselaboris on < 1 %, tuleb kaaluda täiendavate rakkude hindamist. Kromatiid- ja kromosoomaberratsioonid tuleb eraldi registreerida ja klassifitseerida alatüüpide alusel (murrud, vahetused). Labori eeskirjad peavad tagama, et kromosoomaberratsioonianalüüsi teevad pädevad hindajad ning vajaduse korral kasutatakse vastastikust hindamist. Arvestades, et mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid põhjustavad sageli osa metafaasis olevate rakkude purunemise, mille tõttu kaotatakse kromosome, peab hinnatavates rakkudes tsentromeeride arv olema mitte väiksem kui  $2n \pm 2$ , kus  $n$  on liigiomane haploidne kromosoomiarv.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete töötlemine**

Iga looma andmed esitatakse tabelina. Iga looma kohta tuleb esitada mitoosiindeks, hinnatud metafaasirakkude arv, kromosoomaberratsioonide arv metafaasis raku kohta ja kromosoomaberratsioonidega rakkude osakaal (protsent). Eri tüüpi struktuursete kromosoomaberratsioonid tuleb esitada koos nende esinemise absoluutarvu ja sagedusega katse- ja kontrollirühmades. Tühikud, nagu ka polüploidised rakud ja endoreduplitseeritud kromosoomid registreeritakse eraldi. Tühikute sagedus esitatakse, kuid üldjuhul ei arvestata seda struktuursete aberratsioonide üldsageduse analüüsis. Kui reaktsiooni puhul puudub tõendus sugudevahelise erinevuse kohta, võib andmed statistilise analüüsi jaoks ühendada. Samuti tuleb esitada andmed loomadel avaldunud toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

- a) paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate tulemuste andmebaasi (vt punktid 11–14);
- b) paralleelsed positiivsed kontrollid või hindamise kontrollid peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad nendega, mis on saadud varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaasist, ning positiivse kontrolli kemikaal peab põhjustama statistiliselt olulise suurenemise negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punktid 20–21);
- c) analüüsitud on asjakohane arv annuseid ja rakke;
- d) suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mida on kirjeldatud punktides 25–28.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui:

▼ M7

- a) vähemalt ühes annuserühmas esineb struktuursete kromosoomaberratsioonidega (välja arvatud tühikud) rakkude esinemissageduse statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- b) see suurenemine on vähemalt ühel proovivõtu ajal annusest sõltuv, kui seda hinnatakse asjakohase trenditestiga, ning
- c) ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %).

Kui teataval proovivõtu ajal uuritakse üksnes suurimat annust, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga tuvastatakse statistiliselt oluline suurenemine ja tulemused on väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %). Soovitusi asjakohaste statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (13). Annuse-reaktsiooni analüüsi korral tuleb analüüsida vähemalt kolme annuse katserühma. Statistiliste testide puhul tuleb ühte looma lugeda katseühikuks. Kromosoomaberratsioonikatses saadud positiivsed tulemused tähendavad, et uuritav kemikaal põhjustab kromosoomaberratsioone katses kasutatud loomaliigi lüüdis.

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes:

- a) mitte üheski annuserühmas ei esine struktuursete kromosoomaberratsioonidega (välja arvatud tühikud) rakkude esinemissageduse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- b) ühelgi proovivõtu ajal ei esine annusest sõltuvat suurenemist, kui seda hinnatakse asjakohase trenditestiga;
- c) kõik tulemused on labori varasemate katsete negatiivse kontrolli jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %), ning
- d) lüüdi kokkupuude uuritava kemikaaliga on toimunud.

Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab kirjandusest (13). Uuritava kemikaali lüüdigiga kokkupuute tõendus võib olla mitoosiindeksi vähenemine või uuritava kemikaali / uuritavate kemikaalide kontsentratsiooni mõõtmine plasmas või täisveres. Intravenoosse manustamise puhul ei ole kokkupuudet vaja tõendada. Teise võimalusena võib lüüdi kokkupuute tõendamiseks kasutada uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise (ADME) andmeid, mis on saadud sõltumatu uuringuga, milles on kasutatud sama manustamisviisi ja loomaliiki. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et kemikaal ei põhjusta nendel katsetingimustel kromosoomaberratsioone kasutatud loomaliigi lüüdis.

Selget positiivset või selget negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Juhul kui vastus ei ole selgelt negatiivne ega positiivne ning selleks, et aidata mõista tulemuse (nt väikse või piiripealse suurenemise) bioloogilist olulisust, tuleb andmetele anda eksperdi hinnang ja/või täiendavalt uurida olemasolevaid lõpetatud katseid. Mõnel juhul võib kasulikuks osutatud suurema arvu rakkude analüüsimine või muudetud katsetingimustega korduskatse.

**▼ M7**

Harvadel juhtudel ei võimalda isegi täiendavate uuringute tulemused teha järeldust, kas uuritava kemikaaliga saadud tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse uuringu tulemus ebaselgeks.

Polüploidisuse ja endoreduplikatsiooniga metafaaside arv tuleb registreerida eraldi metafaaside koguarvust. Polüploidsete/endoreduplikatsiooniga rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritaval kemikaalil on võime inhibeerida mitoosi protsesse või rakutsükli edenemist (vt punkt 3).

**Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

*Kokkuvõte**Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.

*Ühe koostisosaga aine:*

- välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite nimetused vastavalt vajadusele ja praktilisele teostatavusele jne.

*Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:*

- iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes koostisosade keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

*Uuritava kemikaali preparaat:*

- vehiikuli valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/vehiikulis, kui teada;
- sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva preparaadi valmistamine;
- preparaadi analüüsi andmed (nt stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid), kui neid on määratud.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- meetod loomade üheseks identifitseerimiseks;
- lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimine. Iga rühma kohta tuleb esitada kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve.

▼ **M7***Katsetingimused:*

- positiivsed ja negatiivsed (vehiikul/lahusti) kontrollid;
- annusevahemiku määramise katse tulemused, kui tehtud;
- annuse valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamisviisi põhjendus ja manustamise kestus;
- meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis (uuritavad kemikaalid jõudsid) üldvereringesse või luuüdini;
- tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja selles oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi, kui asjakohane;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- eutanaasiameetod;
- analgeesiameetod (kui kasutati);
- manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus ja nende valiku põhjendus;
- mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- rakutsükli metafaasis peatava kemikaali identifitseerimisandmed, kontsentratsioon, annus ja manustamise aeg enne proovivõttu;
- proovide eraldamise ja säilitamise kord;
- aberratsioonide hindamise kriteeriumid;
- looma kohta analüüsitud metafaasis rakkude arv ja mitoosiindeksi määramiseks analüüsitud rakkude arv;
- katse nõuetekohasuse kriteeriumid;
- kriteeriumid, mille alusel uuringud klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

*Tulemused:*

- loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas toksilisuse sümptomid;
- mitoosiindeks iga looma kohta;
- aberratsioonide tüüp ning arv ja aberratsioonidega rakkude arv iga looma kohta;
- aberratsioonide üldarv rühma kohta ning keskvärtused ja standardhälbed;
- aberratsioonidega rakkude arv rühma kohta ning keskvärtused ja standardhälbed;
- tuvastatud ploidsuse muutused, kaasa arvatud polüploidsete ja/või endoreduplikatsiooniga rakkude esinemissagedus;



▼ M7

- annuse-reaktsiooni seos, kui võimalik;
- kohaldatud statistilised analüüsid ja meetodid;
- andmed, mis kinnitavad luuüdi kokkupuudet uuritava kemikaaliga;
- paralleelsed negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemikud, keskväärtsused ja standardhälbed;
- varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskväärtsused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti hõlmatud ajavahemik ja vaatluste arv;
- positiivsuse või negatiivsuse täidetud kriteeriumid.

*Tulemuste arutelu.*

*Järeldused.*

*Viited.*

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals“, väljaandes *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275–306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), „Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells“, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157–165.
- (4) Richold, M. *jt* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, väljaandes *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115–141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), „Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test“, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305–312.
- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), „Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19–30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87–90.
- (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), „*In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293–304.
- (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313–319.

**▼ M7**

- (11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), „Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147–163.
- (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

▼ M7

## 1. liide

## MÕISTED

**Aneuploidsus** – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve kromosoomistiku / tervete kromosoomistike võrra (polüploidus).

**Endoreduplikatsioon** – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi ei käivitu rakutuumas mitoos, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16,..., kromatiidi.

**Genoommutatsioon** – kasutatud rakkude normaalse kromosoomiarvu muutus (aneuploidsus).

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kromatiidaberratsioon** – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidide katkemisena või kromatiidide katkemise ja nende vahelise taasühinemisena.

**Kromosoomaberratsioon** – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemise või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

**Mitoosiindeks** – rakupopulatsiooni mitoosis olevate rakkude arvu ja rakkude koguarvu suhe; selle näitaja järgi hinnatakse vaadeldava rakupopulatsiooni paljunemist.

**Polüploidus** – kromosoomiarvu muutus, mille puhul erinevalt kromosoomistiku üksikkromosoomide arvu muutusest (aneuploidsus) muutub kromosoomiarv terve kromosoomistiku / tervete kromosoomistike võrra.

**Struktuurne aberratsioon** – raku jagunemise metafaasi etapis mikroskoopiliselt tuvastatav kromosoomi struktuuri muutus, mida nähakse deletsioonide ja fragmentidena, inversioonide või kromosoomivaheliste translokatsioonidena.

**Tsentromeer** – kromosoomi ala(d), mille külge kinnituvad kääviniiidid raku jagunemise ajal ja võimaldavad tütarkromosoomide korrapärasest liikumist tütarrakkude poolustele.

**Tühik** – akromaatileine kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja mille puhul kromatiidi lineaarse struktuuri muutusega kaasnev nihe on minimaalne.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M7**

## 2. liide

**MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN  
SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS IN  
VIVO KROMOSOOMABERRATSIOONIKATSES****Mitme faktori määramist võimaldav katseplaani ja selle analüüs**

Selle katseplaani korral tehakse katse vähemalt viie isas- ja viie emasloomaga igal kontsentratsioonitasemel, milleks on vaja vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, lisaks veel asjakohased positiivse kontrolli katsed).

Sellise katseplaani analüüs, mis on üks lihtsamaid mitme teguri määramise analüüse, on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised tegurid on sugu ja kontsentratsiooni väärtus. Andmete analüüsimiseks võib kasutada mitmeid statistikatarkvara standardpakette, nagu SPSS, SAS, STATA, Genstat, samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud, kontsentratsiooniga seotud ning soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga seotud dispersiooniks. Igaühte nendest komponentidest võrreldakse dispersiooni hinnanguga, mis iseloomustab sama katserühma loomade (samast soost loomad ja sama kontsentratsiooni väärtus) kohta saadud tulemusi. Aluseks oleva meetodika üksikasjalik kirjeldus on esitatud standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapaketide *help*-funktsiooni juhendites.

Edasi analüüsitakse kahe faktori (sugu  $\times$  kontsentratsioon) interaktsiooni ANOVA tabelis<sup>(1)</sup>. Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral tagavad eri sugude või eri kontsentratsioonide koondväärtused valiidsed statistilised testid ANOVA rühmasisesse dispersiooni liikmel põhinevate väärtuste vahel.

Edasiseks analüüsiks jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab kontrollida reaktsioonide lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõikidel kontsentratsioonitasemetel. Kui esineb muutujate (sugu  $\times$  kontsentratsioon) oluline interaktsioon, saab ka selle liikme jaotada interaktsiooni kontrastideks (lineaarne kontrast  $\times$  sugu ja ruutkontrast  $\times$  sugu). Need muutujad võimaldavad teha kindlaks, kas eri sugude puhul on reaktsioonid kemikaalile võrreldavad või erinev.

Rühmasisesse dispersiooni hinnangut võib kasutada keskvaartuste erinevuste paariviisilisel võrdlemisel. Neid võrdlusi võib teha kahe soo keskvaartuste vahel ja eri kontsentratsiooniväärtuste keskvaartuste vahel, näiteks võrrelda neid negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samast soost loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskvaartusi või eri sugudest loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskvaartusi.

**Viited**

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemeetodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaane, meetodikat, analüüsi ja tõlgendamist. Järgmiseks on esitatud mitteäielik loetelu. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate mudelite praktilisi näiteid, mõnel juhul koos koodiga, mis võimaldab analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

<sup>(1)</sup> Statistikut, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad analüüsiks kasutada erinevat, ent võrreldavat lähenemiseviisi, kuid ei pruugi tingimata tuletada tavalist ANOVA tabelit, mis põhineb arvutielese ajastu statistiliste näitajate arvutamiseks kasutatud algoritmidel.

**▼M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. ja Hunter, J.S. (1978), *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York, John Wiley & Sons.

Box G.E.P. and Draper, N.R. (1987), *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. and Davey, A.J.H. (2007), *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990), *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997), *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971), *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009), *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

▼ **M7****B.12. MIKROTUUMADE TEKKE KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDEGA****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 474 (2014). See kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

Mikrotuumade tekke *in vivo* katse imetajarakkudega on genotoksilisuse hindamiseks eriti oluline, sest kuigi *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessid võivad erineda liigiti, on need aktiivsed ja annavad oma panuse reaktsioonidesse. *In vivo* katse on kasulik ka täiendavateks uuringuteks, kui genotoksilisus on tuvastatud *in vitro* süsteemiga.

Mikrotuumade tekke *in vivo* katset imetajarakkudega kasutatakse, et teha kindlaks erütroblastide kromosoomide või mitoosiaparaadi kahjustus, mille on põhjustanud uuritav kemikaal. Katsega hinnatakse mikrotuumade moodustumist erütrotsüütides, mis saadakse loomadelt, tavaliselt närilistelt, võetud luuüdi või perifeerse vere rakkude proovidest.

Mikrotuumade tekke katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad tsütogeneetilist kahjustust, mille tulemus on kas kromosoomilõivest mahajäänud fragmente või terveid kromosoomide sisaldava mikrotuumade moodustumine.

Kui luuüdi erütroblast areneb ebaküpseks erütrotsüüdiks (mõnikord nimetatakse seda ka polükroomseks erütrotsüüdiks või retikulotsüüdiks), siis põhituum lõkatakse välja; moodustunud mikrotuumad võivad jääda tsütoplasmasse. Põhituumade puudumine hõlbustab mikrotuumade visualiseerimist või määramist nendes rakkudes. Mikrotuumsete ebaküpsete erütrotsüütide esinemissageduse suuremine kemikaaliga kokkupuutunud loomades näitab, et kemikaal on tekitanud struktuurseid kromosoomaberratsioone või kromosoomiarvu muutusi.

Uudismoodustisena tekkinud mikrotuumadega erütrotsüüte määratakse ja loendatakse värvimise abil, millele järgneb kas visuaalne hindamine mikroskoobiga või automaatanalüüs. Piisava arvu ebaküpsete erütrotsüütide loendamist täiskasvanud loomade perifeerses veres või luuüdis hõlbustab oluliselt automaatse hindamisplatvormi kasutamine. Sellised platvormid on vastuvõetav alternatiiv käsitsi hindamisele (2). Võrdlevate uuringutega on näidatud, et selliste meetoditega, milles kasutatakse asjakohaseid kalibrimisstandardeid, saab tagada parema laborisise ja laboritevahelise korratavuse ja tundlikkuse kui mikroskoobi abil käsitsi hindamisega (3, 4). Automatiseeritud süsteemid, millega saab mõõta mikrotuumadega erütrotsüütide sagedust, on läbivoolutsütomeetrid (5), kujutiste analüüsi platvormid (6, 7) ja laserskaneerimisega tsütomeetrid (8), kuid neid on veel muidki.

Kuigi seda kõnealuse katse raames tavaliselt ei tehta, saab kromosoomifragmente eristada terviklikest kromosoomidest rea kriteeriumide alusel. Need hõlmavad kinetohoori või tsentromeerse DNA olemasolu või puudumise kindlakstegemist; mõlemad on iseloomulikud terviklikele kromosoomidele. Kinetohoori või tsentromeerse DNA puudumine näitab, et mikrotuum sisaldab üksnes kromosoomifragmente; kui need on olemas, näitab see kromosoomide kaotsiminekut.

Kasutatud terminite määratlused on esitatud 1. liites.

▼ **M7****LÄHTEKAALUTLUSED**

Selle katse puhul on geneetilise kahjustuse sihtkoeks noorte täiskasvanud näriliste luuüdi, kuna erütrotsüüdid tekivad selles koes. Mikrotoomade määramiseks perifeerse vere ebaküpsedes erütrotsüütides võib kasutada ka muid imetajaliike, kui nende puhul on tõendatud piisav tundlikkus, mis võimaldab kindlaks teha kemikaale, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone või kromosoomiarvu muutusi nendes rakkudes (tekitades mikrotoomasid ebaküpsedes erütrotsüütides), ja esitatakse teaduslik põhjendus. Mikrotoomadega ebaküpsede erütrotsüütide sagedus on peamine uuritav näitaja. Uuritava näitajana võib kasutada ka mikrotoumi sisaldavate perifeerse vere küpsede erütrotsüütide sagedust liigis, mille põrnas ei esine tugevat selektsiooni mikrotoomadega erütrotsüütide vastu ja kui loomadel on pidev kokkupuude kemikaaliga ajavahemiku jooksul, mis on pikem kui erütrotsüüdi eluiga asjaomasel liigis (hiirte puhul näiteks neli nädalat või rohkem).

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav(ad) kemikaal(id) või metaboliit(metaboliidid) ei jõua sihtkoeni, ei pruugi käesoleva katse kasutamine olla asjakohane.

Enne kui meetodit hakatakse kasutama segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi saavutamiseks, tuleb kaaluda, kas sel viisil üldse saadakse sobivaid tulemusi selle eesmärgi jaoks, ja kui, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

**KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sobiva manustamistee kaudu. Luuüdi kasutamise korral hukatakse loomad humaanselt sobival ajal pärast kemikaali manustamist; eraldatakse luuüdi, valmistatakse preparaadid ning värvitakse need (9–15). Kui kasutatakse perifeerset verd, võetakse veri sobival ajal pärast manustamist, valmistatakse preparaadid ja värvitakse need (12, 16–18). Kui kemikaal manustatakse lühikese aja jooksul, on oluline valida luuüdi või perifeerse vere proovide võtmiseks selline aeg, kus kemikaali toimel tekkinud mikrotoomsete ebaküpsede erütrotsüütide määramine on võimalik. Proovide võtmisel perifeerses verest peab olema möödunud piisavalt aega, et sellised ebaküpsed erütrotsüüdid oleksid jõudnud vereringesse. Preparaate analüüsitakse mikrotoomade esinemise määramiseks kas mikroskopeerides, läbivoolutsütomeetriaga või laserskaneeriva tsütomeetriaga.

**LABORI PÄDEVUSE KONTROLLIMINE****Pädevuse tõendamise katsed**

Enne katsete rutiinset tegemist peab labor tõendama, et tal on piisavalt kogemusi selle katse tegemiseks; selleks peab ta näitama, et suudab korrata mikrotoomade sageduse määramise kohta avaldatud töödes (17, 19–22) saadud tulemusi vähemalt kahe positiivse kontrolli kemikaaliga (kaasa arvatud positiivse kontrolli kemikaalide väikeste doosidega saadud nõrk toime), vt tabel 1, ja vastava vehiikuli/lahusti kontrolli katsega (vt punkt 26). Nendes katsetes tuleks kasutada doose, mis annavad reprodutseeritavaid ja doosist sõltuvaid suurenemisi ning tõendavad labori kasutatava hindamise meetodi puhul katsesüsteemi tundlikkust ja dünaamilist ulatust huvipakkuvas koes (luuüdi või perifeerne veri). Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, see tähendab, kui on olemas varasemate katsete andmebaas, mis on määratletud punktides 14–18.

**Varasemad kontrolli andmed**

Pädevuse tõendamise katsete käigus peab labor kindlaks tegema:

— varasemate positiivse kontrolli katsete väärtuste vahemiku ja jaotuse ning

**▼ M7**

— varasemate negatiivse kontrolli katsete väärtuste vahemiku ja jaotuse.

Kui hakatakse saada tulemusi varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotuse kohta, peaksid negatiivse kontrolli paralleelide väärtused olema kooskõlas kontrolli katsete avaldatud andmetega (kus need on avaldatud). Kui varasemate kontrolli katsete jaotusele lisatakse uusi eksperimendiandmeid, peaksid paralleelsete negatiivse kontrolli katsete tulemused ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaas peaks olema statistiliselt usaldusväärne, et laboril oleks võimalik hinnata oma negatiivse kontrolli andmete jaotust. Kirjanduse põhjal läheb vaja vähemalt kümnet katset, kuid parem oleks, kui andmebaasis oleksid vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse tulemused. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (23)), et määrata, kui suures ulatuses nende andmed varieeruvad, ja tõendada, et meetoodika on laboris „kontrolli all“. Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemaid andmeid (st varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse vastuvõetavuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (24).

Kui labor ei tee piisavat arvu katseid, et saada statistiliselt usaldusväärne negatiivse kontrolli jaotus (vt punkt 15) pädevuskontrolli katsete käigus (kirjeldatud punktis 13), siis on lubatud selle jaotuse kindlakstegemine esimeste rutiinsete katsetega. Sellise lähenemisviisi kasutamisel tuleks järgida kirjanduses (24) esitatud soovitusi ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused peaksid olema kooskõlas avaldatud negatiivse kontrolli andmetega.

Katse-eeskirja igasuguse muutmise puhul tuleks arvestada, kuidas see võib mõjutada saadavate andmete kooskõla labori varasemate kontrolli katsete tulemuste andmebaasiga. Ainult suurte vastuolude tekkimise puhul tuleks koostada uus varasemate kontrolli katsete tulemuste andmebaas, kui ekspertteadmiste alusel tehakse kindlaks, et uus jaotus erineb varasemast jaotusest (vt punkt 15). Uue andmebaasi koostamise ajal ei ole ühe konkreetse katse tegemiseks täielikku negatiivsete kontrolli katsete tulemuste andmebaasi vaja siis, kui labor suudab tõendada, et nende negatiivse kontrolli paralleelkatsete väärtused on kooskõlas kas nende varasema andmebaasiga või vastavate avaldatud andmetega.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid sisaldama mikrotoomsete ebaküpsete erütrotsüütide esinemise sagedust iga looma puhul. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli katsete jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %. Kui negatiivse kontrolli paralleelkatsete tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli katsete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku võõrväärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 15), ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

## MEETODI KIRJELDUS

### Ettevalmistus

#### *Loomaliigi valimine*

Kasutada tuleks tavapäraest laboriliinidest pärit terveid noori loomi. Kasutada võib hiiri, rotte või muid sobivaid imetajaliike. Kui kasutatakse perifeerset verd, tuleb kindlaks teha, et valitud loomaliigi puhul ei takista mikrotoomsete rakkude



▼ **M7**

vereringest eemaldamine põrna poolt tekkinud mikrotoomsete rakkude kindlakstegemist. See on kindlalt tõendatud roti ja hiire perifeerse vere puhul (2). Katseprotokollis tuleb esitada teaduslik põhjendus, miks kasutati muud liiki kui rott või hiir. Kui kasutatakse muud loomaliiki kui närilisi, on soovitatav, et kemikaali põhjustatud mikrotoomade mõõtmine oleks integreeritud muusse sobivasse toksilisuskatsesse.

*Loomade pidamis- ja söötmingimused*

Näriliste puhul peaks pidamisruumi temperatuur olema 22 °C ( $\pm 3$  °C). Kuigi suhteline niiskus peaks ideaaljuhul olema 50–60 %, peaks see olema vähemalt 40 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades (kuni viis looma puuris), igas puuris on samast soost ja sama katserühma loomad, kui ei eeldata agressiivset käitumist; eelistatavalt peaksid puurid olema kõva põrandaga, sobivalt mitmekesistatud keskkonnaga. Loomi võib üksikult pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

*Loomade ettevalmistamine*

Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud loomi (näriliste puhul ideaaljuhul soovitatavalt 6–10nädalased, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad), kes jagatakse juhuvaliku alusel kontrolli- ja katserühmadesse. Iga loom saab kordumatu identimismärgistuse, mille tegemiseks kasutatakse humaanset võimalikult vähe invasiivset meetodit (nt rõngastamine, märgistamine, mikrokiipimine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine või varba kõndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõju on võimalikult väike. Positiivse kontrolli ja uuritava kemikaali omavahelist ristsaastumist tuleks vältida. Katse alguses peavad loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte erinema üle  $\pm 20$  % kummagi soo keskmisest massist.

*Dooside valmistamine*

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspenderida sobivas lahustis või vehiikulis või segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela disperse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Kasutada tuleks uuritava kemikaali värskeid valmistisi, välja arvatud juhul, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud sobivad säilitamistingimused.

**Katsetingimused***Lahusti/vehiikul*

Lahusti/vehiikul avaldada toksilist toimet korral kasutatavate dooside korral ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse tuntud lahustist/vehiikulist erinevat lahustit või ainet, peab olema võrdlusandmetega näidatud, et see on sobiv. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandained on näiteks vesi, füsioloogiline keedusoolalahus, metüülselluloosi lahus, karboksümetüülselluloosi naatriumsoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrolli andmeid, mis näitaksid, et valitud ebatüüpiline lahusti/vehiikul ei põhjusta mikrotoomade moodustumist ega muid kahjulikke tagajärgi, tuleks kõigepealt teha esialgne katse, et näidata lahusti/vehiikuli sobivust lahusti/vehiikuli kontrolli katses.

▼ **M7****Kontrollid***Positiivsed kontrollid*

Igasse katsesse peab tavaliselt lisama positiivse kontrolli kemikaaliga kokku puutuva loomade rühma. Sellest võib loobuda juhul, kui katselabor on tõendanud kõnealuse katse läbiviimise pädevust ja on kindlaks teinud varasemate katsete positiivse kontrolli väärtuste vahemiku. Kui paralleelset positiivse kontrolli rühma ei kasutata, tuleb igas katses teha hindamise kontrolli katseid (fikseeritud ja värvimata mikroskoobipreparaadid või rakususpensioonide proovid, sõltuvalt sellest, mis on hindamismeetodi asjakohane). Neid võib saada sobivate võrdlusstandardite hindamise lisamisega uuringu hindamistesse; selliseid võrdlusstandardeid saadakse eraldi positiivse kontrolli katsega, mida tehakse korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu tagant) ja millega saadud materjale selleks alles hoitakse; näiteks kasutatakse tasemekatsete materjale ja seejärel tehakse selleks katseid korrapäraselt vastavalt vajadusele.

Positiivse kontrolli kemikaalid peavad usaldusväärselt põhjustama mikrotoomade sageduse määratava suurenemise, võrreldes mikrotoomade spontaanse esinemissagedusega. Mikroskoobiga hindamise korral tuleks positiivse kontrolli doosid valida nii, et nende toime oleks selge, kuid hindaja ei tohiks kodeeritud preparaatide hulgas kontrolli katset siiski kohe ära tunda. Positiivse kontrolli kemikaali manustamiseks on lubatud kasutada ka muud manustamisteed kui uuritava kemikaali puhul, muu manustamisskeemi kasutamine ja proovide võtmine võib toimuda ka ainult ühel ajahetkel. Võimaluse korral tuleks kaaluda selliste positiivse kontrolli kemikaalide kasutamist, mis kuuluvad samasse kemikaalide rühma kui uuritav kemikaal. Tabelis 1 on esitatud mõned positiivse kontrolli kemikaalide näited.

*Tabel 1***Positiivse kontrolli kemikaalide näited.**

Kemikaal ja CASi nr
Etüülmetaansulfonaat [CASi nr 62-50-0]
Metüülmetaansulfonaat [CASi nr 66-27-3]
Etüülnitrosokarbamiid [CASi nr 759-73-9]
Mitomütsiin C [CASi nr 50-07-7]
Tsüklofosfamiid (monohüdraat) [CASi nr 50-18-0 (CASi nr 6055-19-2)]
Trietüleenmelamiin [CASi nr 51-18-3]
Kolhitsiin [CASi nr 64-86-8] või vinblastiin [CASi nr 865-21-4] kui aneugeenid

*Negatiivsed kontrollid*

Igal proovivõtukorral tuleks võtta proovid ka negatiivse kontrolli rühma loomadelt, keda muidu tuleks käidelda kui katserühma kuuluvaid loomi, selle erinevusega, et neile ei manustata uuritavat kemikaali. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse lahustit/vehiikulit, tuleb kontrollrühmale manustada sedasama lahustit/vehiikulit. Kui igal proovivõtu korral on loomadevahelise varieeruvuse ja mikrotoomadega rakkude esinemissagedus andmed siiski olnud tõendatult kooskõlas katselabori varasemates katsetes saadud negatiivse kontrolli andmetega, võib negatiivse kontrolli jaoks vaja minna ainult ühte proovivõttu. Kui negatiivse kontrolli puhul kasutatakse ainult ühte proovivõttu, peab see toimuma katse esimese proovivõtu ajal.

▼ **M7**

Kui kasutatakse perifeerset verd, võib lühiajalise uuringu korral enne kemikaali manustamist võetud proovi kasutada paralleelse negatiivse kontrollina, kui saadud tulemused on kooskõlas sama labori varasemate kontrollikatsete tulemuste andmebaasiga. Rottide puhul on näidatud, et väikese ruumalaga proovide (nt alla 100 µl päevas) võtmisel on minimaalne mõju mikrotoomade taustagedusele (25).

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

Üldiselt on mikrotoomade tekke reaktsioon isas- ja emasloomadel sarnane ja seepärast võib enamiku uuringuid teha ükskõik kummast soost loomadega (26). Andmed, millest nähtuks isas- ja emasloomade vaheline erinevus (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biosaadavuse, luuüdi suhtes avalduva toksilisuse jne erinevus, sealhulgas nt annusevahemiku uuringu andmed), toetaksid kummastki soost loomade kasutamist. Sellisel juhul võib olla asjakohane teha uuring kummastki soost loomadega, näiteks osana korduvdoosi toksilisuse uuringust. Kui kasutatakse mõlemast soost loomi, võib olla asjakohane kasutada mitme faktori määramist võimaldavat katseplaani. Üksikasjad selle kohta, kuidas sellise katseplaani puhul andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Uuringu alguses tuleks moodustada nii suured rühmad, et igas rühmas oleks viis analüüsitavat looma ühest soost või kummastki soost, kui kasutatakse mõlemast soost loomi. Kui inimese kokkupuude kemikaalidega võib olla soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Luuüdi uuringuks, mis viiakse läbi punktis 37 sätestatud näitajate määramiseks kolme doosirühma ning paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli rühmadega (millest igaühesse kuuluvad viis samast soost looma), kulub loomadega seotud kõige tüüpilisemate nõuete kohaselt 25–35 looma.

**Doosid**

Kui tehakse vahemiku leidmise eeluuring, sest sobivaid andmeid doosi valimiseks ei ole, tuleb see teha samas laboris, kasutades sama loomaliiki, -liini, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus (27). Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis on suurim doos, mida loomad suudavad taluda uuringu ajavahemiku jooksul ilma, et neil avalduks uuringut piirava toksilisuse nähte (näiteks väheneb neil kehamaas või avaldub tsütotoksiline mõju vereloomesüsteemi suhtes, kuid see ei kutsu veel esile surma ega selliseid valu, piinlemist või kannatusi, mis nõuaksid loomade humaanset hukkamist (28)).

Suurima doosi võib samuti määratleda kui doosi, mis avaldab toksilist toimet luuüdile (näiteks vähendab ebaküpsete erütrotsüütide osakaalu luuüdis või perifeerses veres rohkem kui 50 % erütrotsüütide üldarvust, kuid mitte väiksema väärtuseni kui 20 % kontrolli väärtusest). Kui analüüsitakse CD71-positiivseid drakke perifeerses vereringes (läbivoolutsütomeetria abil), reageerib see väga noorte ebaküpsete erütrotsüütide fraktsioon toksilise kemikaaliga mõjutamisele siiski kiiremini kui ebaküpsete erütrotsüütide RNA-positiivne suurem fraktsioon. Seetõttu võib akuutset kokkupuudet hõlmava katsekorralduse korral avalduda suurem näiline toksilisus, kui mõõdetakse CD71-positiivsete ebaküpsete erütrotsüütide fraktsiooni, võrreldes sellise katsekorraldusega, kus ebaküpseid erütrotsüüte määratakse RNA-sisalduse järgi. Kui katses kasutatakse sellist kokkupuudet kemikaaliga, mis kestab viis päeva või vähem, võib toksilise toimega uuritavate kemikaalide suurima doosi määratleda kui doosi, mis põhjustab CD71-positiivsete ebaküpsete erütrotsüütide osakaalu statistiliselt olulise vähenemise erütrotsüütide üldarvust, kuid mitte väiksema väärtuseni kui 5 % kontrolli väärtusest (29).

**▼ M7**

Kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine, või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mille tõttu kokkupuude võib väheneda pärast pikaajalist manustamist, võivad olla doosi määramise kriteeriumide seisukohast erandlikud ning neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

Selleks et saada teavet doosi ja toime seose kohta, peaks täielik uuring hõlmama negatiivse kontrolli rühma ja vähemalt kolme doositaset, mis tavaliselt erinevad üksteisest kaks korda, kuid mitte rohkem kui neli korda. Kui doosivahemiku leidmise uuringus või olemasolevate andmete põhjal ei põhjusta uuritav kemikaal toksilisust, tuleks 14-päevase või pikema manustamisperioodi puhul kasutada suurimat doosi 1 000 mg kehmassi kg kohta päevas, 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul aga 2 000 mg kehmassi kg kohta päevas. Kui uuritava kemikaali puhul avaldub toksiline toime, peaks suurim manustatav doos olema MTD ning muud kasutatavad doositasemed peaksid eelistatult hõlmama vahemikku MTD-st kuni vähese toksilisusega või ilma toksilise toimeta doosini. Kui toksilisust sihtkoe (luuüdi) suhtes täheldatakse kõikide katses kasutatud dooside korral, on soovitatav teha katse ka mittetoksilise doosiga. Uuringute puhul, millega tahetakse täielikult iseloomustada kvantitatiivset doosi-toime sõltuvust, võib vaja minna täiendavaid doosirühmasid. Teavat tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimtervishoius kasutatavate ravimite) puhul, millele kohaldatakse erinõudeid, võivad need piirmäärad olla teistsugused.

**Piirsalduskatse**

Kui doosipiirkonna leidmise katsetega või lähedasi loomaliine käsitlevatest andmetest on saadud tõendeid, et piirdoosi manustamise katses (kirjeldatud allpool) ei ole uuritaval kemikaalil sedastatavat toksilist toimet (sealhulgas luuüdirakkude paljunemise vähenemist ega muid tõendeid sihtkoe suhtes avalduva tsütotoksilisuse suhtes), ja kui genotoksilisust ei ole alust eeldada *in vitro* genotoksilisuse uuringute või sarnase struktuuriga kemikaalide andmete põhjal, võib täielikku kolme doositasemega uuringut pidada ebavajalikuks, kui on tõendatud, et uuritav kemikaal jõuab (uuritavad kemikaalid jõuavad) sihtkoesse (luuüdisse). Sellistel juhtudel võib olla piisav ühe doosiga nn piirsalduskatse. Kui manustamine kestab 14 päeva või rohkem, on piirdoos 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on vähem kui 14 päeva, on piirdoos 2 000 mg kehakaalu kg kohta päevas.

**Dooside manustamine**

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavalt põhjendatusele kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, paikselts naha alla, veenisiseselt, suu kaudu (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implantatsiooniga. Igal juhul tuleb manustamistee valikuga tagada kemikaali adekvaatne kokkupuude sihtkoega (-kudedega). Tavaliselt ei soovitata intraperitoneaalset süstimist, kuna see ei ole inimese puhul ette nähtud kokkupuute viis, ning seda tuleks kasutada ainult konkreetse teadusliku põhjendatuse korral. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda sisse või joogivette, eriti üheainsa doosi manustamise korral, tuleks jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning proovide võtmise vahel oleks ajavahemik, mis oleks piisav, et võimaldada toime tuvastamist (vt punkt 37). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt ei tohiks kogus ületada 1 ml 100 g kehmassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada kogust 2 ml 100 g kehmassi kohta. Suurema koguse kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Kui jätta kõrvale ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille toime on suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevam, tuleks katses vedeliku ruumala varieeruvust minimeerida ja reguleerida kontsentratsioone nii, et kõiki doose manustataks kehmassi suhtes ühesuguse lahusekogusega.

▼ **M7****Manustamiskava**

Eelistatavalt tuleks kemikaali manustada kaks või rohkem korda, 24-tunniste vahedega, eriti kui katse ühendatakse muude toksilisuse uuringutega. Alternatiivina võib kemikaali manustada ühe korraga, kui see on teaduslikult põhjendatud (nt kui uuritav kemikaal teadaolevalt blokeerib rakutsükli). Uuritavaid kemikaale võib manustada ka jagatud doosina, näiteks kaks manustamist ühel päeval mitte rohkem kui 2–3-tunnise vahega, et hõlbustada lahuse suure ruumala manustamist. Sellistel asjaoludel, või kui uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamisega, tuleks proovide võtmise aeg kavandada selle põhjal, millal toimus viimane manustamine või lõpetati kokkupuude.

Katse võib teha hiirte või rottidega ühel viisil järgmistest kolmest:

- a. Loomi mõjutatakse uuritava kemikaaliga ühel korral. Luuüdi proovid võetakse vähemalt kahel korral (sõltumatutest loomarühmadest), alustades mitte varem kui 24 tundi pärast manustamist, kuid mitte hiljem kui 48 tundi pärast manustamist, ning jäetakse sobivad ajavahemikud proovide vahele, kui ei ole teada, et uuritava kemikaali poolestusaeg on erakordselt pikk. Proovide võtmist varem kui 24 tundi pärast manustamist tuleb põhjendada. Perifeerse vere proovid võetakse vähemalt kahel korral (ühest ja samast loomarühmast), alustades mitte varem kui 36 tundi pärast manustamist ning jättes esimese proovivõtu järele sobiva(d) ajavahemiku(d); viimane proov võetakse mitte hiljem kui 72 tundi pärast manustamist. Esimese proovivõtu ajal tuleb kõigile doosirühmadele manustada uuritav kemikaal ja kõigilt kogutakse proovid analüüsimiseks; järgmistel proovivõtukordadel tuleb manustada üksnes suurimat doosi. Kui positiivne tulemus on tuvastatud ühel proovivõtukorral, siis lisa-proove ei ole vaja võtta, kui ei vajata kvantitatiivset teavet doosi-toime seosest. Kirjeldatud proovivõtuajad tulenevad mikrotuumade ilmumise ja kadumise kineetikast nendes kahes koekompartendis.
- b. Kui kasutatakse kahte või enam manustamist sagedusega üks kord päevas (nt kaks manustamist 24-tunnise intervalliga), võetakse luuüdi proovid üks kord 18–24 tundi pärast viimast manustamist ja perifeerse vere proovid üks kord 36–48 tundi pärast viimast manustamist (30). Kirjeldatud proovivõtuajad tulenevad mikrotuumade ilmumise ja kadumise kineetikast nendes kahes koekompartendis.
- c. Kui kasutatakse kolme või enam manustamist sagedusega üks kord päevas (nt kolm või enam manustamist ligikaudu 24 tunni järel), tuleb luuüdi proovid võtta hiljemalt 24 tundi pärast viimast manustamist ja perifeerse vere proovid tuleb võtta hiljemalt 40 tundi pärast viimast manustamist (31). Selline manustamisviis võimaldab kombineerida nn komeedikatse (nt proovide võtmine 2–6 tundi pärast viimast manustamist) ja mikrotuumade tekke katse ning siduda mikrotuumade tekke katse korduvdoosi toksilisuse uuringutega. Kogutud andmed on näidanud, et mikrotuumade tekke indutseerimist võib jälgida nende pikemate ajavahemike jooksul, kui kemikaali on manustatud kolm või enam korda (15).

Võib kasutada ka muid dooside manustamise ja proovide võtmise ajakavasid, kui need on asjakohased ja teaduslikult põhjendatud ning hõlbustavad katsete ühendamist muude toksilisuse määramise katsetega.

**Vaatlus**

Vähemalt üks kord päevas, eelistatult igal päeval samal ajal ning võttes arvesse ajavahemikku, kui eeldatav toime avaldub pärast manustamist kõige intensiivsemalt, tuleb teha katseloomade üldisi kliiniline vaatlus ja registreerida kõik kliinilised sümptomid. Haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda päevas üle vaadata. Kõik loomad tuleb kaaluda uuringu alguses, vähemalt kord nädalas korduvdoosi uuringute ajal ja pärast eutanaasiat. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleb

▼ **M7**

vähemalt kord nädalas mõõta sööda tarbimist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad surmavaga mitte lõppeva raske toksilisuse nähud, tuleb humaanselt hukata enne katse lõppu (28). Teatavate asjaolude puhul võiks jälgida loomade kehatemperatuuri, kuna kemikaali manustamisest tingitud hüper- või hüpotermiat on seostatud ekslike tulemuste põhjustamisega (32–34).

**Sihtkoe kokkupuude**

Sobival ajal (sobivatel aegadel) tuleb võtta vereproov, et mõõta uuritava kemikaali sisaldust vereplasmas, selleks et tõendada, et luuüdi kokkupuude on tõesti toimunud, kui muid andmeid kokkupuute kohta ei ole olemas (vt punkt 48).

**Luuüdi-/verepreparaat**

Luuüdirakud eraldatakse tavaliselt loomade reie- või sääreluudest vahetult pärast humaanset eutanaasiat. Rakud eraldatakse, prepareeritakse ja värvitakse enamasti kindlakskujunenud meetoditega. Loomade heaolu standarditega kooskõlas võib perifeerse vere väikse ruumalaga proove võtta, kas meetodiga, mis võimaldab katselooma ellu jätta, näiteks vere võtmine sabaveenist või muust sobivast veresoonest, või südamepunktsiooniga või proovi võtmisega suurest veresoonest looma eutanaasia ajal. Luuüdist või perifeersest verest saadud erütrotsüütide puhul võib, olenevalt analüüsimeetodist, rakud kohe värvida supravitaalvärvide abil (16–18), teha äigepreparaadid ja seejärel värvida mikroskoopia jaoks või fikseerida ja värvida rakud sobivalt läbivoolutsütomeetria analüüsi jaoks. DNA-spetsiifilise värvaine kasutamisega (nt akridiinoranž (35) või Hoechst 33258 pluss püroniin-Y (36)) võib vältida mõne muu kui DNA-spetsiifilise värvaine kasutamisega seotud artefakte. See eelis ei välista aga tavaliste värvainete kasutamist (nt Giemsa mikroskoopiliseks analüüsiks). Täiendavaid süsteeme (nt tsellulooskolonne tuumaga rakkude eemaldamiseks (37, 38)) saab samuti kasutada tingimusel, et laboris on tõendatud kõnealuste süsteemide ühildatavus preparaatide valmistamisega.

Kui kõnealused meetodid on kohaldatavad, võib kinetohoorivastaseid antikehi (39), *in situ* fluorestsentshübridimist pantsentromeersete DNA proovidega (40) või praimerite põhjal *in situ* märgistamist pantsentromeersete praimeritega koos DNA asjakohase kontrastvärvimisega (41) kasutada, et määrata, mida mikrotoomad sisaldavad (kromosoom/kromosoomifragment), et teha kindlaks, kas mikrotoomade tekke põhjus on klastogeenne või aneugeenne protsess. Klastogeene ja aneugeene eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, mille kohta on tõendatud, et need on tõhusad.

**Analüüs (manuaalne ja automaatne)**

Kõik analüüsivad mikroskoobipreparaadid või proovid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult enne analüüsi ja need tuleb randomiseerida, et käsitsi hindaja ei teaks, millise kokkupuutetasemega on proovi puhul tegemist; selline kodeerimine ei ole vajalik, kui kasutatakse automaatsüsteeme, mis ei põhine visuaalsel vaatlusel ja mida hindaja kallutus ei saa mõjutada. Iga looma kohta määratakse ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide koguhulgast (ebaküpsed + küpsed), loendades kokku vähemalt 500 erütrotsüüti luuüdist ja 2 000 erütrotsüüti perifeersest verest (42). Ebaküpsete mikrotoomsete erütrotsüütide esinemissageduse määramiseks hinnatakse looma kohta vähemalt 4 000 ebaküpset erütrotsüüti (43). Kui varasemad negatiivse kontrolli andmed andmebaasis näitavad, et mikrotoomsete erütrotsüütide esinemise keskmine taustsagedus asjaomases laboris on < 0,1 %, tuleks kaaluda täiendavate rakkude hindamist. Proovide analüüsimisel ei tohiks ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust olla väiksem kui 20 % vastavast osakaalust

**▼ M7**

lahusti/vehiikuli kontrolli katsetes mikroskoobi abil hindamise puhul ja mitte väiksem kui ligikaudu 5 % vastavast osakaalust lahusti/vehiikuli kontrolli katsetes, kui näitajat CD 71+ ebaküpsed erütrotsüüdid hinnatakse tsütomeetriliste meetoditega (vt punkt 31) (29). Näiteks kui luuüdi katset hinnatakse mikroskoobi abil ja kui kontrolli katses on ebaküpsede erütrotsüütide osakaal luuüdis 50 %, oleks toksilisuse ülempiir 10 % ebaküpsed erütrotsüüte.

Kuna roti põrn peab kinni ja hävitab mikrotoomseid erütrotsüüte, oleks analüüsi suure tundlikkuse säilitamiseks roti perifeerse vere analüüsimise puhul soovitatav piirduda mikrotoomsete ebaküpsede erütrotsüütide kõige noorema fraktsiooni analüüsimisega. Automatiseeritud analüüsimeetodite kasutamise korral võib neid kõige ebaküpsmaid erütrotsüüte teha kindlaks nende suure RNA-sisalduse järgi või nende pinnal ekspresseeritud transferrinireseptorite (CD71+) suure arvu järgi (31). Erinevate värvimismeetodite otsene võrdlus on siiski näidanud, et häid tulemusi on võimalik saada mitmesuguste meetoditega, sealhulgas tavapärase akridiinoranžiga värvimise abil (3, 4).

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete töötlemine**

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabelina. Iga analüüsitava looma kohta tuleb eraldi esitada ebaküpsede erütrotsüütide arv, mikrotoomadega ebaküpsede erütrotsüütide arv ja ebaküpsede erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust. Kui uuritavat kemikaali manustatakse hiirtele järjest neli nädalat või rohkem, tuleb esitada andmed ka mikrotoomsete küpsede erütrotsüütide arvu ja osakaalu kohta, kui neid on kogutud. Samuti tuleb esitada andmed toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:

- a. paralleelse negatiivse kontrolli tulemused loetakse sobivaks selleks, et need lisada labori varasemate tulemuste andmebaasi (vt punktid 15–18);
- b. paralleelse positiivse kontrolli tulemused või hindamise kontrolli tulemused peaksid näitama toimet, mis on võrreldav varem laboris saadud positiivse kontrolli tulemustega, ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolli tulemustega (vt punktid 24–25);
- c. analüüsitud peab olema vajalik arv doose ja rakkusid;
- d. suurima doosi valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mida on kirjeldatud punktides 30–33.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui:

- a. vähemalt ühes doosirühmas esineb ebaküpsede mikrotoomsete erütrotsüütide esinemissageduse statistiliselt oluline suurenemine, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;
- b. see suurenemine sõltub doosist vähemalt ühel proovide võtmise ajal, kui seda hinnatakse sobiva trenditestiga, ning
- c. ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %).

▼ **M7**

Kui teataval proovivõtuajal uuritakse üksnes suurimat doosi, loetakse konkreetne uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline suurenemine, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga, ja tulemused on väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli andmete jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %). Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta võib leida kirjandusest (44–47). Doosi-toime analüüsi tegemise korral tuleks analüüsida vähemalt kolme doosirühma. Statistiliste testide puhul tuleb ühte looma lugeda katseühikuks. Mikrotuumade tekke katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav kemikaal indutseerib mikrotuumade teket; mikrotuumad tekivad katsealuse loomaliigi erütroblastide kromosoomide või mitoosiaparaadi kahjustuse tagajärjel. Kui tehakse katse, et kindlaks teha tsentromeeride olemasolu mikrotuumades, on uuritav kemikaal, mis tekitab tsentromeeri sisaldavaid mikrotuumasid (tsentromeerne DNA või kinetohoor, mis viitab terve kromosoomi kaotusele), tõendiks, et uuritav kemikaal on aneugeen.

Tingimusel, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõikides uuritud katsetingimustes:

- a. mitte üheski doosirühmas ei esine ebaküpsete mikrotuumsete erütrotsüütide esinemissageduse statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;
- b. doosist sõltuvat suurenemist ei esine ühelgi proovivõtuajal, kui selle hindamiseks kasutatakse sobivat trenditesti;
- c. kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli katsete jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 %), ning
- d. toimus luuüdi kokkupuude uuritava kemikaaliga.

Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta võib leida kirjandusest (44–47). Tõend luuüdi kokkupuutest uuritava kemikaaliga võib olla ebaküpsete ja kypsete erütrotsüütide proportsiooni vähenemine või uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõtmise vereplasmas või veres. Intravenoosse manustamise puhul ei ole tõendeid kokkupuute kohta vaja esitada. Teise võimalusena võib luuüdi kokkupuute tõendamiseks kasutada uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise (ADME) andmeid, mis on saadud sõltumatu uuringuga, milles on kasutatud sama manustamisviisi ja loomaliiki. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei põhjusta kemikaal katsealuse loomaliigi ebaküpsetes erütrotsüütides mikrotuumade teket.

Selget positiivset või selget negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Juhul kui vastus ei ole negatiivne ega positiivne ning selleks, et aidata mõista tulemuse (nt vähese või piiripealse suurenemise) bioloogilist olulisust, tuleb andmetele anda eksperdi hinnang ja/või uurida lõpetatud katsest saadud tulemusi edasi. Mõnel juhul võib olla kasulik analüüsida rohkem rakke või teha korduskatse, kasutades muudetud katsetingimusi.

Harvadel juhtudel ei võimalda isegi edasiste uuringutega saadud andmed teha järeldust, kas uuritava kemikaaliga saadi positiivne või negatiivne tulemus, sel juhul loetakse, et tulemus on ebaselge.

### **Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

*Kokkuvõte*

*Uuritav kemikaal:*

— allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui see on teada;



**▼ M7**

— uuritava kemikaali stabiilsus, kui see on teada.

*Ühest koostisosaga aine:*

- välimus, lahustuvus vees ja täiendavad asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemiline laad vajaduse ja praktilise teostatavuse korral jne.

*Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:*

- iseloomustatakse võimaluste piires keemiliste identifitseerimisandmete (vt eespool), kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste füüsikalise-keemiliste omaduste kaudu.

*Uuritava kemikaali preparaadi valmistamine:*

- vehiikuli valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/vehiikulis, kui on teada;
- sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva koostisega preparaativormi valmistamine;
- osutatud koostiste analüüsid (nt, stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid), kui neid on tehtud.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- meetod loomade üheseks identifitseerimiseks;
- lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast kauem kestva uuringu korral: iga looma kehamass uuringu vältel ja toidu tarbimine. Tuleks lisada kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

*Katsetingimused:*

- positiivse ja negatiivse (lahus/vehiikuli) kontrolli andmed;
- doosivahemiku määramise katse tulemused, kui see katse tehti;
- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamistee ja manustamise kestuse põhjendus;
- meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis (uuritavad kemikaalid jõudsid) üldvereringesse või sihtkoosse;

▼ **M7**

- tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi selles, kui see on kohaldatav;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- eutanaasia meetod;
- analgeesia meetod (kui kasutati);
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused;
- mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;
- proovide eraldamise ja säilitamise kord;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- ebaküpsete mikrotoomsete erütrotsüütide hindamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta mikrotoomsete erütrotsüütide esinemissageduse kindlaksmääramisel ning ebaküpsete ja kypsete erütrotsüütide suhte määramisel;
- katse nõuetekohasuse kriteeriumid;
- vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotoom sisaldab terveid kromosoome või nende fragmente, näiteks kinetohoorivastaste antikehade või tsentromeerispetsiifiliste DNA-proovide kasutamine.

*Katsetulemused:*

- loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas toksilisuse avaldumise sümptomid;
- ebaküpsete erütrotsüütide osakaal erütrotsüütide üldarvust;
- ebaküpsete mikrotoomsete erütrotsüütide arv, esitatakse iga looma kohta eraldi;
- mikrotoomsete ebaküpsete erütrotsüütide arvu keskvärtus ± standardhälve rühma kohta;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid.
- paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli katsete andmed, sh vahemikud, keskvärtused ja standardhälbed;
- varasemad negatiivse ja positiivse kontrolli andmed, sh vahemik, keskvärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti hõlmatud ajavahemik ja mõõtepunktide arv;
- andmed, mis kinnitavad luuüdi kokkupuudet uuritava kemikaaliga;
- andmed selle kohta, kas mikrotoomad sisaldavad terveid kromosoome või kromosoomifragmente, kui see on asjakohane;
- positiivset või negatiivset toimet kinnitavad kriteeriumid, mis on täidetud.

▼ M7

*Tulemuste arutelu.*

*Järeldused.*

*Viited.*

## KIRJANDUS

- (1) OECD, OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), „*in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10–30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), „Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat“, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92–107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), „Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring“, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83–91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), „Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage“, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139–145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), „Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system“, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65–73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), „An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149–154.
- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), „Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry“, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153–155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), „A rapid *in vivo* test for chromosomal damage“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187–190.
- (10) Schmid, W. (1975), „The micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9–15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), „The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61–118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), „The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program“, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29–80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), „Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice“, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555–558.

▼ M7

- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), „Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103–112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), „The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies“, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513–522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), „The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245–249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), „Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83–98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), „Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test“. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153–159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavourin (1994), „Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239–273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), „Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45–50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), „The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power“, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419–424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), „Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.“ MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84–100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87–90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), „Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108–120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), „*in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay“, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293–304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), „Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313–319.

▼ M7

- (28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), „Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222–228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), „An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test“, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313–319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), „*in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234–252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), „High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79–83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), „Transient hypothermia induces micronuclei in mice“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7–14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), „Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia“, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120–127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), „An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test“, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241–247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), „A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y“, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269–275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), „The automated bone marrow micronucleus test“, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91–104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), „Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure“, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121–126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), „Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*“, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411–415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), „Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA“, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297–302.
- (41) Russo, A. (2002), „PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage“, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99–104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), „Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97–99.
- (43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 198, OECD Publishing, Paris.

**▼M7**

- (44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115–141.
- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), „Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay“, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49–52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), „Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233–241.

▼ M7

## 1. liide

## MÕISTED

**Erütroblast** – varajane staadium erütrotsüütide arengus, mis vahetult eelneb ebaküpse erütrotsüüdi staadiumile, milles rakul on veel olemas tuum.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kinetohoor** – valguline struktuur, mis moodustub eukarüootse raku tsentromeeril, ühendab mitoosi ja meioosi ajal kromosoomi mitoosikäävi mikrotuubulite polümeeridega ning toimib raku jagunemise ajal, tõmmates ödekromatiidid teineteisest eemale.

**Mikrotuumad** – rakus põhituumast eraldi ja lisaks sellele esinevad väikesed tuumad, mis on tekkinud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

**Normokroomne ehk küps erütrotsüüt** – täielikult valminud erütrotsüüt, mis on kaotanud jääk-RNA, mis jääb alles pärast tuuma väljatõukamist ja/või mis on kaotanud muud lühialised rakumarkerid, mis tavaliselt kaovad pärast erütroblasti viimasele jagunemisele järgnenud enukleatsiooni.

**Polükroomne ehk ebaküps erütrotsüüt** – hiljuti moodustunud erütrotsüüt oma arengu vahepeelses staadiumis; selline erütrotsüüt värvub vere klassikalise värvaine, näiteks Wrighti Giemsa nii sinise kui ka punase komponendiga, kuna sellises hiljuti moodustunud rakus on olemas jääk-RNA. Sellised äsja moodustunud rakud on ligikaudu samad mis retikulotsüüdid, mida muudetakse nähtavaks vitaalvärvidega, mis põhjustavad jääk-RNA kämpude teket retiikulumis. Tänapäeval kasutatakse hiljuti moodustunud punaste vereliblede kindlakstegemiseks sageli muid meetodeid, sealhulgas RNA monokroomset värvimist fluorestseerivate värvainetega või lühialiste pinnamarkerite nagu CD71 märgistamist fluorestseerivate antikehadega. Polükroomsed erütrotsüüdid, retikulotsüüdid ja CD71-positiivsed erütrotsüüdid on kõik ebaküpsed erütrotsüüdid, kuigi igapähele on mõnevõrra erinev vanuseline jaotus.

**Retikulotsüüt** – hiljuti moodustunud erütrotsüüt, mis on värvitud vitaalvärviga, mis põhjustab raku jääk-RNA kämpude koondumist iseloomuliku retiikulumi. Retikulotsüütidel ja polükroomsetel erütrotsüütidel on sarnane rakkude vanuseline jaotus.

**Tsentromeer** – kromosoomi ala(d), millele kääviiniidid kinnituvad raku jagunemise ajal, võimaldades tütar-kromosoomide korrapäraselt liikumist tütar-rakkude poolustele.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M7

## 2. liide

**MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN  
SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS  
MIKROTUUMADE TEKKE *IN VIVO* KATSES**

**Mitme faktori määramist võimaldav katseplaani mudel ja selle analüüs**

Selle katseplaani korral tehakse katse vähemalt viie isas- ja viie emasloomaga igal kontsentratsioonitasemel, milleks on vaja vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, lisaks veel asjakohased positiivse kontrolli katsed).

See katseplaani, mis on üks lihtsamaid mitme teguri määramise analüüse, on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised tegurid on sugu ja kontsentratsiooni väärtus. Andmete analüüsimiseks võib kasutada mitmeid statistikatarkvara standardpakette, nagu SPSS, SAS, STATA, Genstat; samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud, kontsentratsiooniga seotud ning soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga seotud dispersiooniks. Igähte nendest liikmetest testitakse võrdluses dispersiooni hinnanguga, mis iseloomustab katses paralleelselt käideldud loomi, kes on samast soost ja kes puutuvad kokku samasuguse kontsentratsiooniga. Aluseks oleva meetoodika üksikasjalik kirjeldus on esitatud paljudes standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapaketide *help*-funktsiooni juhendites.

Analüüs toimub interaktsiooniliikme (sugu × kontsentratsioon) uurimise kaudu ANOVA tabelis<sup>(1)</sup>. Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral saab eri sugude või eri kontsentratsioonitasemete ühendatud väärtusi kasutada kontsentratsioonitasemete vaheliste informatiivsete statistiliste testidena, mis põhinevad rühma piires ühendatud ANOVA dispersiooniliikmel.

Edasiseks analüüsiks jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab kontrollida mõjude lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõikidel kontsentratsioonidel. Kui on olemas märkimisväärne sugu × kontsentratsiooni interaktsiooni liige, saab ka selle liikme jaotada interaktsiooni kontrastideks lineaarse interaktsiooni kontrast × sugu ja ruutinteraktsiooni kontrast × sugu. Need liikmed võimaldavad teha kindlaks, kas kummagi soo reageerimine kemikaalile on paralleelne või on sugude reageerimine kemikaalile erinev.

Rühma piires koondatud dispersiooni hinnangut võib kasutada keskvaartuste erinevuse paariviisilisel võrdlemisel. Selliseid võrdlusi võib teha kahe soo keskvaartuste vahel ja eri kontsentratsioonitasemete keskvaartuste vahel, näiteks võrdlusteks negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samasooliste loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskvaartusi või erisooliste loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskvaartusi.

**Viited**

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemeetoodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaane, meetoodikat, analüüsi ja tõlgendamist. Järgnevalt on esitatud mittetäielik loetelu. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate katseplaanide praktilisi näiteid, mõnel juhul koos üksikasjalike eeskirjadega, kuidas analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

<sup>(1)</sup> Statistikud, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad analüüsiks kasutada erinevat, ent võrreldavat lähenemiseviisi, kuid ei pruugi tingimata tuletada tavalist ANOVA tabelit, mis põhineb arvutielese ajastu statistiliste näitajate arvutamiseks kasutatud algoritmidel.



**▼M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York, John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

**▼ B**

B.13/14. **MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÕÖRDMUTATSIOON-  
KATSE**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼ M7**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

▼ M8

**B.17. HPRT VÕI XPRT GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO*  
GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M7

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**▼ B****B.21. IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Imetajarakukultuure on võimalik *in vitro* kasutada keemiliste mutageenide poolt indutseeritud fenotüübiliste muutuste avastamiseks. Neid mutageene seostatakse maliigse transformatsiooni tekkega *in vivo*. Laialt kasutatavateks rakkudeks on C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 3T3, SHE ja Fischeri roti rakuliinid. Testid põhinevad rakumorfoloogia muutuste, fookuse moodustumise või agarosgeelidel rakkude pesastumise muutuste avastamisel. Harvem tehakse uuringuid, mis avastavad kartsinogeensetele kemikaalidele eksponeeritud rakkudel teisi morfoloogilisi või füsioloogilisi muutuseid. Ükski *in vitro* testi tulemusnäitaja ei ole kinnitanud ühegi mehhanismi konkreetset süstemaatilist seost kasvajatega. Osad testsüsteemid on võimelised kindlaks tegema kasvajate promotoreid. Uuritavate ainete tsütotoksilisuse astet saab määrata, kui mõõta aine toimet pesasid moodustavatele ühikutele (kloonide produktsiooni efektiivsusele) ja raku-kultuuride kasvukiirusele. Tsütotoksilisuse määramine on oluline tõestamaks, et testitav kemikaal avaldab toksilist toimet rakkudele, vaatamata sellele, et rakkude maliigse transformatsiooni sagedust ei ole alati võimalik mõõta. Põhjuseks on osades katsetes kasutatav pikem inkubatsiooniaeg ja/või ümber külvamine teisele alusele.

**1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID**

Puuduvad.

**1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS***Ettevalmistused***R a k u d**

Läbiviidavast transformatsioonitestist sõltuvalt on võimalik kasutada erinevaid rakuliine või tüvirakke. Katse tegija peab olema kindel, et testis kasutatavad rakud teevad läbi vajaliku fenotüüpse muutuse pärast kokkupuudet tuntud kartsinogeenidega. Samuti peab katse tegija tagama optimaalsed laboritingimused ning dokumenteeritud tõestuse, et uuring on kehtiv ja usaldusväärne.

**K e s k k o n d**

Transformatsiooni analüüsi tegemise keskkond ja katsetingimused peavad vastama vajadustele.

**▼B****Uuritav aine**

Uuritavad ained võib valmistada kultiveerimiskeskonnas või lahustada või suspendeerida vastavates lahustis enne rakkude töötlemist. Lahusti lõppkonsentratsioon kultiveerimiskeskonnas ei tohi mõjutada rakkude elulemust ega kasvukiirust.

**Metaboolne aktivatsioon**

Rakud peaksid olema eksponeeritud uuritavale ainele nii imetaja metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolul kui ka selle puudumisel. Kui kasutatakse sisemist metaboolset aktiivsust omavaid rakutüüpe, peab tegema kindlaks, et rakkude metabolismi kiirus ja aktiivsuse iseloom vastavad tingimustele.

**Katsetingimused****Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine**

Igas eksperimendis peab rakendama positiivset kontrolli rakkudele otsest mõju avaldava ühendiga ja ka ühendiga, mille toime avaldumiseks on vajalik metaboolse aktiivsuse olemasolu. Samuti on vajalik negatiivne kontroll (lahusti).

Positiivsete kontrollidena võib kasutada

— otsest toimet avaldavaid ühendeid:

— etüülmetaansulfonaat;

—  $\beta$ -propiolaktoon;

— kaudse toimega ühendeid:

— 2-atsetüülaminofluoreen;

— 4-dimetüülaminoasobenseen;

— 7,12-dimetüülbenzantseen.

Kui võimalik, võib kasutada positiivse kontrollina uuritava ühendiga samasse keemilisse klassi kuuluvat ainet.

**Kasutatavad kontsentratsioonid**

Testis tuleb kasutada erineva uuritava aine kontsentratsiooniga lahuseid. Eesmärk on teha kindlaks kontsentratsioonist sõltuv toksiline efekt. Efekti olemasolul peaks kõrge uuritava aine kontsentratsiooniga lahuse toime järel rakkude elulemus langema ning väikese kontsentratsiooniga lahuse toime järel peaks rakkude elulemus olema ligikaudu sama, mis negatiivses kontroll-lahuses. Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid aineid tuleks vastavate meetodite abil uurida lahustuvuse piirini. Täielikult veeslahustuvatele mittetoksilistele ainetele tuleb maksimaalne kontsentratsioonimäär valida vastavalt iga katse vajadusele.

**▼B***Protseduur*

Rakud peavad toksilisele substantsile olema eksponeeritud sobiva aja vältel, mis oleneb kasutatud testisüsteemist. Kui kokkupuuteaega pikendatakse, võib olla vajalik aine uuesti lisamine koos keskkonna vahetamisega (ja vajaduse korral värske, metaboolselt aktiivse lahuse lisamine). Piisava sisemise metaboolse aktiivsusega rakud peavad uuritava ainega kokku puutuma nii sobiva metaboolset aktivatsiooni esilekutsuva süsteemi olemasolul kui ka puudumisel. Kokkupuuteaja lõppemisel pestakse rakud uuritavast ainest puhtaks ning külvatakse tingimustel, mis sobivad uuritava fenotüübi muutuse ilmnemiseks ja transformatsioonide arvu määramiseks. Kõik tulemused tõestatakse sõltumatu uuringuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada tabelis, mis võib olla erinev sõltuvalt kasutatud testist (kasutatud alusklaaside arv, positiivse tulemusega alusklaaside arv, mutatsioonidega rakkude arv). Võimaluse korral tuleks esitada mutatsioonisagedus muteerunud rakkude arvu ja eluvõimeliste rakkude arvu suhtena. Eluvõimelisuse määr ja kloonide produtseerimismäär esitatakse protsendina kontrollmäärast. Andmeid peab analüüsima sobivate statistiliste meetodite abil.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakuliin, rakukultuuride arv, rakukultuuride säilitusmeetodid;

— katsetingimused: uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubatsiooni aeg, rakutihedus töötlemise ajal, imetaja metaboolset aktiivsust omava süsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid, jälgitud fenotüüpide kirjeldus, kasutatud selektiivsed ained (kui on asjakohane), annuste valiku põhimõte;

— eluvõimeliste ja mutantsete rakkude loendamise meetod;

— statistiline hindamine;

— tulemuste arutelu;

— järeldused.

3.2. **HINNANG JA JÄRELDUSED**

Vt üldtutvustus, B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus, B osa.

▼ **M8**

B.22. **DOMINANTSE LETAALSE MÕJU KATSE NÄRILISTEGA**

▼ **M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide toksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼M8

B.23. KROMOSOOMIABERRATSIOONIKATSE IMETAJATE  
SPERMATOGOONIDEGA

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 483 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaoluga seotud kaalutlusi. Käesolevas katsemeetodi muudetud versioonis kajastub selle meetodi kasutamisel saadud aastatepikkune kogemus, samuti annab see võimaluse lõimida või kombineerida seda meetodit muude mürgisuse või genotoksilisuse hindamise meetoditega. Mürgisuse hindamise meetodite kasutamine kombineerituna võimaldab vähendada mürgisuskatsetes kasutatavate loomade arvu. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).
2. Imetajate spermatogoonidega tehtava *in vivo* kromosoomiaberratsioonikatse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad imetajate spermatogoonides struktuurseid kromosoomiaberratsioone (2, 3, 4). Peale selle on kõnealune katse oluline genotoksilisuse hindamiseks, sest ehkki *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA reparatsiooni protsessidega seotud tegurid võivad liigiti varieeruda, on need aktiivsed ja aitavad kaasa vastusreaktsiooni kujunemisele. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud kromosoomiarvu kõrvalekallete mõõtmiseks ning seda ei kasutata regulaarselt sel eesmärgil.
3. Käesoleva meetodiga mõõdetakse struktuurseid kromosoomiaberratsioone (nii kromosoomi- kui ka kromatiidiaberratsioone) jagunevates spermatogoonides ning seepärast võimaldab see eeldatavalt ennustada pärilike mutatsioonide tekkimist nimetatud idurakkudes.
4. Põhimõistete määratlused on esitatud liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse tavaliselt närilisi, kuid mõnel teaduslikult põhjendatud juhul võib olla asjakohane kasutada mõnda muud liiki. Näriliste munandite tavapärase tsütogeneetiliste preparaatide puhul analüüsitakse mitoosi metafaasi (spermatogoonides) ja meioosi metafaasi (spermatotsüütides). Mitoosi ja meioosi metafaas tuvastatakse kromosoomide morfoloogia alusel (4). Käesolev *in vivo* tsütogeneetiline meetod võimaldab teha kindlaks mitoosi ajal täheldatavaid struktuurseid kromosoomiaberratsioone spermatogoonides. Käesolevat meetodit ei kasutata muude sihtkudede puhul.
6. Spermatogoonides kromatiidiaberratsioonide tuvastamiseks tuleks uurida rakkude esimest töötlemisjärgset mitootilist jagunemist, kuna nimetatud aberratsioonid saavad rakkude järgnevate jagunemiste käigus kromosoomiaberratsioonid. Lisateabe saamiseks analüüsitakse töödeldud spermatotsüütide kromosoomide meioosi vältel diakineesi, I metafaasi ja II metafaasi etappides struktuursete kromosoomiaberratsioonide suhtes.



**▼M8**

7. Munandis esineb mitu spermatogoonide põlvkonda (5) ning kõnealuste eri tüüpi idurakkude tundlikkus kemikaalidega töötlemise suhtes võib olla erinev. Seega kajastavad tuvastatud aberratsioonid töödeldud spermatogoonide populatsioonidele avalduvat koondmõju. Munandipreparaatides on enamik mitoosis rakkudest B-tüüpi spermatogoonid, mille rakutsükli kestus on umbes 26 tundi (3).
8. Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav kemikaal või selle metaboliit/metaboliidid ei jõua munandisse, ei ole käesoleva katsemeetodi kasutamine asjakohane.

**KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

9. Üldpõhimõtte kohaselt viiakse loomad pärast sobiva kokkupuuteviisi valimist uuritava kemikaaliga kokkupuutesse ning sobiva ajavahemiku möödumisel töötlemisest surmatakse loomad humaanselt. Enne surmamist manustatakse loomadele ainet, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt kolhitsiin või Colcemid®). Seejärel tehakse idurakkudest kromosoomipreparaadid ja värvitakse need ning metafaasis rakke analüüsitakse kromosoomiaberratsioonide suhtes.

**LABORI PÄDEVUSE TÕENDAMINE**

10. Käesoleva meetodi kasutamise pädevuse kinnitamiseks tuleks tõendada võimekust reprodutseerida positiivse kontrollina kasutatavate, näiteks tabelis 1 loetletud (sealhulgas nõrga toimega) ainetega saadud, spermatogoonides täheldatavate struktuursete kromosoomiaberratsioonide esinemissagedust käsitlevaid tulemusi, samuti peaks negatiivsete kontrollide puhul täheldatud sagedus jääma vastuvõetavasse kirjanduses avaldatud kontrollandmete jaotusvahemikku (nt allikad 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) või laboris kontrollidega varem saadud tulemuste jaotusvahemikku, kui sellised tulemused on olemas.

**MEETODI KIRJELDUS****Ettevalmistused***Loomaliigi valimine*

11. Tuleks kasutada tavapäraste laboriliinide terveid noori täiskasvanud loomi. Tavaliselt kasutatakse isaseid hiiri; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib siiski kasutada ka mõne muu sobiva imetajaliigi isasloomi, et käesolevat katsemeetodit oleks võimalik kasutada koos mõne muu katsemeetodiga. Teaduslik põhjendus näriliste asemel mõne muu liigi loomade kasutamise kohta tuleks esitada katseprotokollis.

*Loomade pidamis- ja söötistingimused*

12. Näriliste puhul peaks loomapidamisruumi temperatuur olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline niiskus peaks olema vähemalt 40 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, ideaaljuhul aga 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Näriliste pidamisel tuleks kasutada väikesi loomade rühmi (maksimaalselt viis looma puuri kohta), kui ei ole põhjust eeldada agressiivset käitumist; soovitatavalt tuleks kasutada sobiva mitmekesistatud keskkonnaga täispõhjala puure. Loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

**▼M8***Loomade ettevalmistamine*

13. Tavaliselt kasutatakse terveid noori täiskasvanud (töötlemishetkeks 8–12 nädala vanuseid) loomi, kes jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Iga looma üheseks identimiseks kasutatakse humaanset minimaalselt invasiivset meetodit (nt rõngastamine, määrgistamine, mikrokiibistamine või biomeetriline tuvastamine, kuid mitte kõrva sälkamine ega varba kõndistamine) ning loomadel lastakse vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Tuleks ära hoida positiivse kontrollina kasutatava aine ja uuritava kemikaali vahelist ristsaastumist. Katse alguses peaksid loomade kehamaassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle  $\pm 20\%$ .

*Annuste ettevalmistamine*

14. Tahke uuritav kemikaal tuleks enne loomadele annustamist lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines või segada sööda või joogiveega. Vedelat uuritavat kemikaali võib annustada vahetult või seda enne annustamist lahjendada. Kui kokkupuude toimub sissehingamise teel, võib uuritavat kemikaali sõltuvalt selle füüsikalise-keemilistest omadustest manustada gaasina, auruna või tahke/vedela dispersee faasiga aerosoolina. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsket valmistist, välja arvatud juhul, kui kemikaali püsivusandmetest nähtub säilitamise vastuvõetavus ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

**Katsetingimused – lahusti/kandeaine**

15. Lahusti/kandeaine ei tohiks avaldada kasutatavate annuste puhul mürgist mõju ega olla võimeline uuritava kemikaaliga keemiliselt reageerima. Kui on valitud vähem tuntud lahusti/kandeaine, tuleks selle sobivuse tõendamiseks esitada selle kasutamist toetavad võrdlusandmed. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda veepõhise lahusti/kandeaine kasutamist. Tavaliselt kasutatavad lahustid/kandeained on näiteks vesi, füsioloogiline lahus, metüülselluloosi lahus, karboksümetüülselluloosi naatriumisoola lahus, oliiviõli ja maisiõli. Valitud ebatüüpilisest lahustist/kandeainest põhjustatud struktuursete kromosoomiaberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks teha eelkatse, et tõendada lahustiga/kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

*Positiivsed kontrollid*

16. Katses tuleks alati paralleelselt kasutada positiivse kontrollina kasutatava ainega töödeldud loomi, välja arvatud juhul, kui labori pädevus katse läbiviimiseks on tõendatud ja katsemeetodid on lähiminevikus (nt viimase viie aasta jooksul) korrapäraselt kasutatud. Kui paralleelse positiivse kontrolli rühma ei kasutata, peaks iga katse hõlmama hindamiskontrolle (fikseeritud ja värvimata mikroskoobipreparaadid). Selleks võib uuringu raames hinnata asjakohaseid säilitatud võrdlusproove, mis on saadud positiivse kontrolliga tehtud eraldi katsest, mida viiakse uuringut tegevas laboris läbi korrapäraselt (nt iga 6–18 kuu järel), näiteks pädevuse tõendamise käigus ja seejärel regulaarselt vastavalt vajadusele.
17. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete puhul tuvastatav struktuursete kromosoomiaberratsioonidega rakkude esinemissagedus peaks järjepidevalt olema suurem kui vastav spontaanse esinemise sagedus. Positiivse kontrolli annused tuleks valida nii, et toime oleks selgelt tuvastatav, kuid ei võimaldaks hindajal teha kohe kindlaks kodeeritud proovide identiteeti. Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited on esitatud tabelis 1.

## ▼M8

Tabel 1

## Positiivse kontrollina kasutatavate ainete näited

Aine [CASi nr] (viitenumber)
Tsüklofosfamiid(monohüdraat) [CASi nr: 50-18-0 (CASi nr: 6055-19-2)] (9)
Tsükloheksüülamiin [CASi nr: 108-91-8] (7)
Mitomütsiin C [CASi nr: 50-07-7] (6)
Monomeerne akrüülamiid [CASi nr: 79-06-1] (10)
Trietüleenmelamiin [CASi nr: 51-18-3] (8)

*Negatiivsed kontrollid*

18. Igal proovivõtukorral tuleks kasutada negatiivse kontrollina loomi, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja keda on muidu koheldud samal viisil kui katserühma loomi. Valitud lahustist/kandeainest põhjustatud kromosoomiberratsioonide ja muu kahjuliku mõju puudumist kinnitavate varasemate laboriandmete või avaldatud kontrollandmete puudumisel tuleks igal proovivõtukorral kasutada kontrollina ka loomi, kellele ei ole midagi manustatud, et tõendada kandeainega töödeldud kontrollrühma andmete vastuvõetavust.

## KATSE KÄIK

**Loomade arv**

19. Uuringu alguses tuleks kindlaks määrata selline rühmade suurus, et igas rühmas oleks vähemalt viis isaslooma. Sellist loomade arvu peetakse piisavaks, et tagada küllaldane statistiline võimsus (st üldjuhul võimekus tuvastada miinimumeesmärgina kromosoomiberratsioonide esinemissageduse kahekordistumine 80-protsendilise tõenäosusega olulisusnivool 0,05, kui negatiivse kontrolli puhul täheldatav esinemissagedus on 1 % või suurem) (3, 11). Tüüpilisel juhul on suurim vajalik loomade arv katses, kus on kaks proovivõtuaega ning kolm eri annustele vastavat katserühma, paralleelse negatiivse kontrolli rühm ja positiivse kontrolli rühm (igas rühmas viis looma), 45 isendit.

**Manustamiskava**

20. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt üks kord (st ühekordse annusena); kui see on teaduslikult põhjendatud, võib kasutada ka mõnda muud annustamisrežiimi.
21. Rühmas, kus kemikaali kasutatakse suurimas annuses, võetakse manustamise järel proove kahel korral. Kuna uuritava(te) kemikaali(de) omastamiseks ja metaboliseerimiseks ning rakutsükli kineetikale mõju avaldumiseks vajalik aeg võib mõjutada kromosoomiberratsioonide tuvastamise optimaalset aega, võetakse varasemad proovid umbes 24 tundi ja hilisemad proovid umbes 48 tundi pärast kemikaaliga töötlemist. Suurimast annusest erinevate annuste puhul tuleks proovid võtta varasemal proovivõtuajal ehk 24 tundi pärast töötlemist (see ajavahemik on lühem või sama pikk kui B-tüüpi spermatogoonide rakutsükli kestus ning esimese töötlemisjärgse metafaasi hindamise tõenäosus on seega optimaalne), välja arvatud juhul, kui mõne muu proovivõtuaja kasutamine on teadaolevalt asjakohasem ja põhjendatud.
22. Võib kasutada ka teistsuguseid proovivõtuaegu. Näiteks võib olla asjakohane kasutada S-faasist sõltumatu toimega kemikaalide puhul varasemat proovivõtuaega (st 24 tunnist lühemat ajavahemikku).

## ▼M8

23. Võib kasutada ka korduvannustamisel põhinevat režiimi, näiteks juhul, kui katse viiakse läbi koos katsega, milles hinnatakse mõnda muud lõppnäitajat ja kus kasutatakse 28 päeva pikkust manustamisperioodi (nt vastavalt katsemeetodile B.58); sel juhul on siiski vaja kasutada erinevate proovivõtuaegade puhul täiendavaid loomade rühmi. Sellest lähtuvalt tuleb sellise manustamiskava asjakohasust igal eraldi juhul teaduslikult põhjendada.
24. Enne humaanset surmamist süstitakse loomadele intraperitoneaalselt sobivas annuses kemikaali, mis peatab rakkude jagunemise metafaasis (nt Colcemid® või kolhitsiin). Seejärel võetakse loomadelt sobiva intervalliga proove. Hiirte ja rottide puhul on see intervall umbes 3–5 tundi.

**Annused**

25. Kui annuste valimist hõlbustavate sobivate andmete puudumise tõttu tehakse annusevahemiku kindlakstegemiseks eeluuringu, tuleks see vastavalt annusevahemiku kindlakstegemise uuringu tegemist käsitlevatele soovitudele viia läbi samas laboris, samast liigist ja liinist loomadega ning sama manustamisrežiimi alusel kui põhiuuringu (12). Eeluuringu eesmärk peaks olema teha kindlaks suurim talutav annus, mis on määratletud kui annus, mille puhul täheldatakse uuringuperioodi jooksul vähest mürgist mõju (näiteks ebatavalised reaktsioonid või käitumine, väike kehamassi vähenemine või tsütotoksilisus vereloomesüsteemi suhtes), kuid mis ei põhjusta surma ega selliseid kannatusi, valu või stressi, mis nõuaksid loomade humaanset surmamist (13).
26. Suurima annusena võib käsitada ka annust, mille puhul täheldatakse teatavaid mürgisuse ilminguid spermatogoonides (nt mitotoiliste spermatogoonide ning meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarvu vähenemine). Kõnealune vähenemine ei tohiks olla suurem kui 50 %.
27. Selliste uuritavate kemikaalide puhul, millel avaldub juba väikese mittemürgise annuse juures konkreetne bioloogiline aktiivsus (näiteks hormoonid ja mitogeenid) või mille puhul esineb toksikokineetiliste omadustega seotud küllastumine, ei pruugi annuste valimise kriteeriumid olla kohaldatavad ning neid kemikaale tuleks igal konkreetsel juhul eraldi hinnata.
28. Annusest sõltuvuse kohta teabe saamiseks tehtav täielik uuring peaks hõlmama negatiivse kontrolli rühma (punkt 18) ja vähemalt kolme eri annust, mis erinevad üksteisest üldjuhul kaks korda, ent kõige rohkem neli korda. Kui uuritav kemikaal ei ole annusevahemiku kindlakstegemise uuringus või olemasolevate andmete põhjal mürgine, peaks suurim korraga manustatav annus olema 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta. Kui aga uuritav kemikaal põhjustab mürgisusnähte, tuleks suurima manustatava annusena kasutada suurimat talutavat annust ning kasutatav annusevahemik peaks soovitatavalt ulatuma suurimast annusest kuni annuseni, mille puhul täheldatav mürgisus on vähene või puudub. Kui mürgisust sihtkoe (st munandite) suhtes täheldatakse kõigi katses kasutatud annuste puhul, on soovitatav teha lisakatse, milles kasutatakse mittemürgiseid annuseid. Uuringutes, milles soovitakse kvantitatiivset annusest sõltuvust lähemalt iseloomustada, võib olla vaja kasutada täiendavaid annuserühmi. Teatavat liiki uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimite) puhul, mille suhtes kohaldatakse erinõudeid, võivad asjaomased piirmäärad olla teistsugused. Kui uuritav kemikaal ei ole mürgine, tuleks kasutada piirannust ja kahte väiksemat annust (nagu on kirjeldatud eespool). Piirannus on 14 päeva pikkuse või pikema manustamisperioodi puhul 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas ning 14 päevast lühema manustamisperioodi puhul 2 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas.

▼ **M8****Annuste manustamine**

29. Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese puhul eeldatavat kokkupuuteviisi. Seepärast võib vastavast põhjendusest lähtuvalt kasutada selliseid manustamisviise nagu manustamine söödaga, joogiveega, paikset, naha alla, veenisiselt, suu kaudu (toitmissondiga), sissehingamise teel või implantaadiga. Igal juhul tuleks manustamisviis valida nii, et oleks tagatud sihtkoe piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalne süstimine ei ole tavaliselt soovitatav, kui see ei ole teaduslikult põhjendatud, kuna üldjuhul ei ole tegemist inimese puhul füsioloogiliselt asjakohase kokkupuuteviisiga. Kui uuritav kemikaal segatakse sööda või joogiveega, tuleks eriti üheainsa annuse manustamisel jälgida, et sööda ja vee tarbimise ning proovivõtmise vaheline ajavahemik oleks piisav, et võimaldada kemikaali mõju tuvastamist (vt punkt 33). Toitmissondi kaudu või süstimise teel korraga manustatav suurim vedelikukogus sõltub katselooma suurusel. Tavaliselt ei tohiks see kogus olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mida võib kasutada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema koguse kasutamist (kui see on loomade heaolu käsitlevate õigusaktide kohaselt lubatud) tuleks põhjendada. Katses kasutatava ruumala varieeruvuse minimeerimiseks tuleks muuta kemikaali kontsentratsiooni, et tagada kehamassi suhtes püsiva ruumala kasutamine kogu annusevahemiku lõikes.

**Vaatlused**

30. Katseloomadel tuleks teha kliinilisi vaatlusi ja registreerida kliinilised sümptomid vähemalt üks kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal, ning võtta seejuures arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise ajavahemikku. Kõiki loomi tuleks haigestumise ja surmajuhtude tuvastamiseks kontrollida vähemalt kaks korda päevas. Kõikide loomade kaal tuleks määrata uuringu alguses, korduvannustamise uuringu kestel vähemalt kord nädalas ning humaanse surmamise hetkel. Kui uuring kestab vähemalt ühe nädala, tuleks vähemalt kord nädalas mõõta sööda tarbimist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta iga veevahetuse ajal ja vähemalt kord nädalas. Loomad, kellel täheldatakse liigse mittesurmava mürgisuse nähte, tuleks enne katse lõppu humaanselt surmata (13).

**Kromosoomipreparaatide valmistamine**

31. Kohe pärast humaanset surmamist võetakse ühest või kummastki munandist idurakususpensioon, mis viiakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse väljatöötatud meetodite kohaselt (nt allikad 2, 14, 15). Seejärel kantakse rakud objektiklaasile ja värvitakse (16, 17). Kõik mikroskoobipreparaadid tuleks kodeerida, et nende identiteet ei oleks hindajale teada.

**Analüüs**

32. Iga looma puhul tuleks hinnata vähemalt 200 hästi väljendunud metafaasis raku (3, 11). Kui laboris negatiivse kontrolli puhul varem täheldatud sagedus on  $< 1\%$ , tuleks statistilise võimsuse suurendamiseks hinnata üle 200 raku looma kohta (3). Tuleks kasutada tsentromeeri tuvastamist võimaldavaid värvimismeetodeid.
33. Kromosoomi- ja kromatiidiberratsioonid tuleks registreerida eraldi ja liigitada need alatüübi alusel (katked, vahetused). Tuleks registreerida ka lüngad, kuid jätta need selle kindlakstegemisel, kas kemikaal põhjustab kromosoomiberratsioonidega rakkude esinemissageduse olulist suurenemist, arvesse võtmata. Labori eeskirjadega tuleks tagada, et kromosoomiberratsioone

**▼M8**

analüüsivad väljaõppinud hindajad. Lähtuvalt asjaolust, et mikroskoobipreparaadi valmistamise käigus puruneb sageli osa metafasis olevatest rakkudest ning sellega kaasneb kromosoomide kadu, peaks tsentromeeride arv hinnatavates rakkudes olema vähemalt  $2n \pm 2$ , kus  $n$  on liigiomane haploidne kromosoomiarv.

34. Ehkki katse eesmärk on tuvastada struktuurseid kromosoomiberratsioone, on oluline registreerida polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude täheldamisel ka nende esinemissagedus (vt punkt 44).

**ANDMED JA ARUANDLUS****Andmete töötlemine**

35. Andmed iga looma kohta tuleks esitada tabelina. Iga looma puhul tuleks hinnata struktuurse(te) kromosoomiberratsiooni(de)ga rakkude arvu ja kromosoomiberratsioonide arvu raku kohta. Alatuüpidesse liigitatud kromatidi- ja kromosoomiberratsioonid (katked, vahetused) tuleks loetleda eraldi ning esitada nende arv ja esinemissagedus katse- ja kontrollrühmades. Lüngad registreeritakse eraldi. Lünkade esinemissagedus küll esitatakse, kuid üldjuhul ei võeta seda struktuursete kromosoomiberratsioonide üldsageduse analüüsimisel arvesse. Polüploidsete rakkude või endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemisel esitatakse ka nende protsentuaalne osakaal.

36. Tuleks esitada andmed mürgisuse ja kliiniliste sümptomite kohta (vt punkt 30).

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

37. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid on järgmised:
- paralleelse negatiivse kontrolliga saadud tulemused on kooskõlas varasemaid negatiivse kontrolli andmeid käsitlevate avaldatud normidega, mille kohaselt on kromosoomiberratsioonidega rakkude osakaal eeldatavalt  $> 0\%$  ja  $\leq 1,5\%$ , ning samuti laboris kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas (vt punktid 10 ja 18);
  - paralleelsed positiivsed kontrollid kutsuvad esile reaktsioone, mis on kooskõlas varasemaid positiivsete kontrollide andmeid käsitlevate avaldatud normidega, samuti laboris positiivsete kontrollidega varem saadud tulemustega, kui need on olemas, ning paralleelsete positiivsete kontrollidega saadud väärtused on statistiliselt oluliselt suuremad kui negatiivse kontrolliga saadud väärtused (vt punktid 17 ja 18);
  - analüüsitud rakkude ja eri annuste arv on piisav (vt punktid 28 ja 32);
  - suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas punktides 25 ja 26 kirjeldatud kriteeriumidega.
38. Kui vaadeldakse nii meioosi kui ka mitoosi, tuleks tsütotoksilisuse hindamiseks teha iga töödeldud looma ja negatiivse kontrolli looma puhul kindlaks mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafasis olevate rakkude suhtarv proovis, kus on kokku 100 jagunevat rakku. Kui vaadeldakse üksnes mitoosi, tuleks iga looma puhul teha vähemalt 1 000 raku põhjal kindlaks mitoosiindeks.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

39. Annusest sõltuvuse analüüsimiseks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme rühma, kus on töötlemiseks kasutatud eri annuseid.

▼ **M8**

40. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt positiivseks, kui:

- vähemalt ühe katses kasutatud annuse puhul täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
- kõnealune suurenemine on vähemalt ühe proovivõtuoja puhul annusest sõltuv ning
- mis tahes saadud tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotust (nt väljapoole Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Kasutatavate statistiliste testide puhul tuleks katseüksusena käsitada üksikisendit.

41. Kui kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritava kemikaaliga saadud tulemus selgelt negatiivseks, kui:

- ühegi katses kasutatud annuse puhul ei täheldata saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes,
- ühegi katsetingimuse puhul ei esine annusest sõltuvat väärtuse suurenmist ning
- kõik saadud tulemused jäävad vastuvõetavasse negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste olemasolul selliste tulemuste jaotusvahemikku (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %).

Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama katseloomade spermatogoonides kromosoomiberratsioone. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud ka kirjanduses (11, 18). Negatiivse tulemuse korral ei ole välistatud võimalus, et kemikaal põhjustab kromosoomiberratsioone mõnes uuringuga hõlmamata hilisemas arenguetapis või kutsub esile geenimutatsioone.

42. Selgelt positiivset või negatiivset tulemust ei ole vaja üle kontrollida.

43. Juhul, kui tulemus ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ning eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse – näiteks vaadeldava väärtuse väikese või piiripealse suurenemise – bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdi hinnangut ja/või olemasolevatel katseandmetel põhinevat täiendavat analüüsi, näiteks kaaluda, kas positiivne tulemus jääb väljapoole vastuvõetavat negatiivse kontrolli andmete vahemikku või laboris negatiivsete kontrollidega varem saadud tulemuste jaotust (19).

44. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavat analüüsi teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.

45. Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima mitoosiprotsesse ja põhjustama kromosoomiarvu muutusi (20). Endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude arvu suurenmine võib viidata sellele, et uuritav kemikaal on võimeline pärssima rakutsükli edenemist (21, 22) – see kromosoomiarvu muutusi põhjustav mehhanism erineb mitoosiprotsesside pärssimise mehhanismist (vt punkt 2). Seepärast tuleks polüploidsete rakkude ja endoreduplitseeritud kromosoomidega rakkude esinemissagedus registreerida eraldi.

**▼M8****Katseprotokoll**

46. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Kokkuvõtte**Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;
- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist;

*ühest koostisosast koosnev aine:*

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

*mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:*

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

*Uuritava kemikaali ettevalmistamine:*

- kandeaine valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines;
- sööda või joogiveega või sissehingamise teel manustamiseks sobiva valmistise valmistamine;
- valmistise analüüsi tulemused (nt püsivus, homogeensus, nominaalne kontsentratsioon), kui need on olemas.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin ja selle kasutamise põhjendus;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- loomade ühese identimise meetod;
- lühiajaliste uuringute puhul: iga looma kehamass katse alguses ja lõpus; ühest nädalast pikemate uuringute puhul: iga looma kehamass uuringu vältel ja sööda tarbimise andmed. Iga rühma kohta tuleks esitada kehamasside vahemik, keskväärts ja standardhälve.

*Katsetingimused:*

- positiivse ja negatiivse (kandeainega/lahustiga) kontrolli andmed;



**▼M8**

- annusevahemiku kindlakstegemise uuringu andmed, kui need on olemas;
- annuste valimise põhjendus;
- manustamisviisi valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- surmamisaja valimise põhjendus;
- loomadel avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas andmed histopatoloogilise või hematoloogilise analüüsi kohta, kui seda on tehtud, samuti loomade vaatlemise ja kehamassi määramise sagedus;
- negatiivsete tulemuste korral meetodid selle kontrollimiseks, et uuritav kemikaal on jõudnud sihtkoesse või üldvereringesse;
- vajaduse korral tegelik annus (milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas), mis arvutatakse lähtuvalt sööda/joogivee tarbimisest ja selles sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioonist (miljondikes);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtturežiimide üksikasjalik kirjeldus ja nende valimise põhjendus;
- humaanse surmamise meetod;
- valutustamismeetod (kui seda kasutati);
- kudede eraldamise meetodid;
- kemikaal, mida kasutati rakkude jagunemise peatamiseks metafaasis, selle kontsentratsioon ja manustamise kestus;
- mikroskoobipreparaadi valmistamise meetodid;
- aberratsioonide hindamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta;
- kriteeriumid uuringutulemuse liigitamiseks positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

*Tulemused:*

- loomade seisund enne katset ja katseperioodi kestel, sealhulgas mürgisuse nähud;
- kehamass ja organite kaal surmamishetkel (korduvmanustamise korral manustamisperioodi vältel mõõdetud kehamass);
- mürgisusnähud;
- mitoosiindeks;
- mitootiliste spermatogoonide ja meioosi esimeses või teises metafaasis olevate rakkude suhtarv või mõni muu tõend, et sihtkude on kemikaaliga kokku puutunud;
- aberratsioonitüübid ja aberratsioonide arv eraldi iga looma kohta;
- aberratsioonide üldarv rühma kohta ning vastavad keskväärtused ja standardhälbed;

**▼M8**

- aberratsioonidega rakkude arv rühma kohta ning vastavad keskvärtused ja standardhälbed;
- võimaluse korral andmed annusest sõltuvuse kohta;
- teave statistilise analüüsi ja kasutatud meetodite kohta;
- paralleelse negatiivse kontrolli andmed;
- negatiivse kontrolliga varem saadud andmed, sealhulgas väärtusevahemikud, keskvärtused, standardhälbed ja usaldusvahemikud usaldusnivool 95 % (kui need on olemas), või varasemad avaldatud negatiivse kontrolli andmed, mida kasutati katsetulemuste vastuvõetavuse hindamiseks;
- paralleelse positiivse kontrolli andmed;
- täheldatud muutused ploidsuses, sealhulgas polüploidsete ja/või endoreplokatsiooniga rakkude esinemissagedus.

*Tulemuste arutelu**Järeldused***KIRJANDUS**

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Väljaandes: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Venitt, S., ja Parry, J. M. (toim.), IRL Press, Oxford, Washington, D. C. Lk 275–306.
- (3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., ja Tanaka, N. (1994). Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutat. Res.* 312: 313–318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. *Mutat. Res.* 455: 167–189.
- (5) Hess, R. A., ja Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Väljaandes: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (toim.), Landes Bioscience ja Springer Science+Business Media. Lk 1–15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C. *Mutat. Res.* 23(3): 368–379.  
Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Väljaandes: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis. Ramel, C., Lambert, B., ja Magnusson, J. (toim.), Liss, New York. Lk. 477–484.
- (7) Cattanach, B. M., ja Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse. *Mutat. Res.* 12: 472–474.
- (8) Cattanach, B. M., ja Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens. *Mutat. Res.* 13: 371–375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia. *Humangenetik* 29: 135–140.

## ▼M8

- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice. *Mutat. Res.* 57(3): 313–324.
- (11) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., ja Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis. *Mutat. Res.* 417: 19–30.
- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., ja Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis* 7: 313–319.
- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (14) Yamamoto, K., ja Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutat. Res.* 52: 207–209.
- (15) Hsu, T. C., Elder, F., ja Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.* 1: 291–294.
- (16) Evans, E. P., Breckon, G., ja Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenet. Cell Genet.* 3: 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., ja Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. Väljaandes: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 115–141.
- (18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., ja Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. Väljaandes: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part III. Kirkland, D. J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. Lk 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., ja Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutat. Res.* 723: 87–90.
- (20) Warr, T. J., Parry, E. M., ja Parry, J. M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens. *Mutat. Res.* 287: 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C., ja Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.* 43: 1362–1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutat. Res.* 119: 403–413.

▼ **M8***Liide***MÕISTED**

Aneuploidsus – mis tahes kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

Genotoksilisus – üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide mis tahes liiki kahjustusi, sealhulgas katkeid, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiaberratsioone ja aneuploidsust. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

Kemikaal – aine või segu.

Klastogeen – mis tahes kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiaberratsioone.

Kromatiidiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub üksikkromatiidi katkemisena või kromatiidide katkemise ja omavahelise taasühinemisena.

Kromosoomiaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis väljendub mõlema kromatiidi katkemisena või katkemise ja taasühinemisena samas kohas.

Kromosoomiarvu kõrvalekalle – kasutatud loomadele omase tavapärase kromosoomiarvu muutus.

Kromosoomide varieeruvus – kromosoomide kuju ja suuruse varieeruvus (nt metatsentrilised, akrotsentrilised vm kromosoomid).

Lünk – akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millega kaasneb kromatiidi struktuuri minimaalne muutus.

Mitoos – rakutuuma jagunemise protsess, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitoosiindeks – suhtarv, mis saadakse metafaasis olevate rakkude arvu jagamisel vaatlusaluse rakupopulatsiooni rakkude üldarvuga; võimaldab hinnata paljunemismäära selles rakupopulatsioonis.

Mutageensus – omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspääride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiaberratsioonid).

Polüploidsus – haploidse kromosoomiarvu ( $n$ ) kordsus, v.a diploidsus (nt  $3n$ ,  $4n$  jne).

Struktuurne aberratsioon – raku jagunemise metafaasietapis mikroskoobi abil tuvastatav kromosoomistruktuuri muutus, mis väljendub deletsioonis või fragmentide vahetuses.

Tsentromeer – kromosoomi piirkon(na)d, mille külge kinnituvad raku jagunemise ajal käviniidid, mis võimaldavad tütarchromosoomidel liikuda korrapäraselt tütarakkude poolustele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega kemikaal, kompleksne reaktsiooni-saadus või bioloogilist päritolu materjal.

▼ **M7**

**▼ B**

**B.25. HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON**

**▼ M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide toksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼B**

**B.26. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE –  
SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE  
UURING NÄRILISTEL**

**▼M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼B****B.27. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING MITTENÄRILISTEL****1. MEETOD**

See subkroonilise suukaudse toksilisuse uurimismeetod lähtub juhendist OECD TG 409 (1998).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha subkroonilise suukaudse toksilisuse katseid, kasutades kordusdoose pärast seda, kui on saadud esialgne teave toksilisuse kohta akuutsetest või 28päevastest kordusdoosidega toksilisuse katsetest. 90päevane uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kiire kasvuperioodi jooksul kuni nooremasse täisikka arenemiseni. Uuring annab teavet toksilisuse peamiste mõjude kohta, tuvastab sihtorganid ja akumulereumisvõimaluse ja võib anda katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni väärtuse, mida saab kasutada doositasete valimisel krooniliste mõjude uurimisel ja ohutuskriteeriumide väljatöötamisel kokkupuutel inimestega.

Käesolev uurimismeetod võimaldab kindlaks määrata keemilise ainega kokkupuute ebasoodsaid mõjusid mittenäriliste liikidel ja seda tuleks kasutada ainult siis,

— kui teistes uuringutes täheldatud mõjud viitavad vajadusele saada selgust või iseloomustust teise, mittenäriliste liigi kohta või

— kui toksikokineetilised uuringud viitavad sellele, et konkreetse mittenäriliste liigist laboratooriumiloomade kasutamine on parim valik, või

— kui mõni muu konkreetne põhjus õigustab mittenäriliste liigi kasutamist.

Vt ka üldise sissejuhatus B osa.

**1.2. MÕISTED**

**Doos** – uuritava aine manustatav kogus. Doosi väljendatakse massina (g, mg) või uuritava aine massina katsealuse looma kaaluühiku kohta (nt mg/kg) või toidus oleva püsikontsentratsioonina (ppm).

**Doseerimine** – üldmõiste, mis hõlmab doosi, selle sagedust ja doseerimise kestust.

**NOAEL** – lühend sõnadest „no observed adverse effect level” ehk dooside kõige kõrgem tase, mis vastab katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldavale sisaldusele.

**1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Uuritav aine manustatakse erinevatele katseloomade rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suureneva koguse kaupa selliselt, et üks rühm saaks 90 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul vaadeldakse loomi põhjalikult toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõppemisel tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

**▼B**

## 1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Loomaliigi valik

Tavaliselt kasutatav mitteräiliste liik on koerad, kelle tõug peaks olema täpselt määratletud; sageli kasutatakse jänesekoeri. Kasutada võib ka teisi liike, nt sigu ja minisigu. Esikloomaliste kasutamine ei ole soovitatud ja nende kasutamist tuleb põhjendada. Kasutada tuleks noori, terveid loomi ja koerte puhul võiks doseerimine eelistatavalt alata 4-6 kuu aga mitte hiljem kui üheksa kuu vanuselt. Kui uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada sama liiki/tõugu loomi.

## 1.4.2. Loomade ettevalmistamine

Kasutada tuleks terveid noori loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem uuringus kasutatud. Aklimatiseerumise kestus sõltub valitud katselooma liigist ja päritolust. Selle kestuseks soovitatakse vähemalt viis päeva koertele või vastaval eesmärgil kohapeal kasvatatavatele sigadele ja vähemalt kaks nädalat kõnealustele loomadele, kui need on pärit väljastpoolt laboratooriumi. Katseloomad tuleks kirjeldada vastavalt nende liigile, liinile, päritolule, soole, kaalule ja/või vanusele. Loomad tuleks juhuslikult paigutada kontroll- ja katserühmadesse. Puurid tuleks asetada nii, et puuri ümberasetamisega seotud võimalikud mõjud oleks minimaalsed. Igale loomale peab määrama unikaalse identifitseerimisnumbri.

## 1.4.3. Dooside ettevalmistamine

Uuritavat ainet võib manustada söögi või joogiveega, sundsöötmisega või kapslitena. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava aine füüsikalise-keemilistest omadustest.

Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas vehiikelis. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/suspensiooni, seejärel õilahust/emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist teistes vehiikelites. Mittevesilahuseliste vehiikelite puhul peab teadma vehiikeli toksilisi omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava aine püsivus manustamise tingimustes.

## 1.5. KATSE KÄIK

## 1.5.1. Loomade arv ja sugu

Iga doositamise juures tuleks kasutada vähemalt kaheksat looma (nelja emast ja nelja isast). Kui osa loomi on kavas katse käigus tappa, tuleks loomade arvu enne katse lõppu tapetavate loomade arvu võrra suurendada. Loomade arv uuringu lõpul peab olema piisav toksilise mõju adekvaatseks hindamiseks. Tuginedes eelnevatele teadmistele aine või selle lähedase analoogi kohta, tuleks kaaluda kaheksaloomalise (neli kummastki soost) satelliitrühma lisamist kontrollrühma ja suurima doosi rühma, et jälgida pärast manustamisperioodi lõppu mis tahes toksilise toime pööratavust või püsivust. Selle menetlusjärgse perioodi kestus tuleks dokumenteerida vastavalt täheldatud mõjudele.



**▼B****1.5.2. Doseerimine**

Uurimuses tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja ühel ajal uuringuga peab tegema ka kontrolli, välja arvatud piirsalduskatse tegemisel (vt 1.5.3). Doositasemed võivad põhineda kordusdoosi või vahemiku leidmise uuringu tulemustel ja peaksid arvesse võtma uuritava ühendi või sellega seotud materjalide kohta olemasolevat toksikoloogilist ja toksikokineetilist teavet. Kui uuritava aine füüsikalise-keemilised omadused või bioloogiline mõju ei piira suurima doosi valimist, tuleb doositaset valida nii, et sellega kaasneks mürgitus, kuid et see ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Doositasemed tuleks valida kahanevas järjekorras, eesmärgiga näidata iga doosiga seotud reaktsioonid ja katseorganismidele tähelepanetav toimet mitteavaldav sisaldus (NOAEL) kõige madalamal doositasemel. Sageli on kõige optimaalsemad kahe- kuni neljakordsed erinevused alanevate doositasemete korral ja sageli on kasulik lisada neljas katserühm, kui kasutatakse väga suuri vahesid dooside vahel (nt suuremaid kui 6–10kordseid).

Kontrollrühm peab olema rühm, millele ei manustata, või rühm, mis saab vehiikelit, kui uuritava aine manustamisel kasutatakse vehiikelit. Kontrollrühma loomi tuleb käidelda samal viisil kui katserühmade loomi, välja arvatud see, et neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse vehiikelit, manustatakse kontrollrühmale vehiikelit suurimas kasutatavas ruumalas. Kui uuritavat ainet antakse koos toiduga ja see põhjustab toidu tarbimise vähenemist, võib paaristoidetav kontrollrühm olla kasulik selleks, et teha vahet maitsest või katsemudelisel aset leidnud toksikoloogilistest muutustest põhjustatud vähenemisel.

Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmiseid vehiikeli ja teiste lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, ainevahetusele või retentsioonile; mõju uuritava aine keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi; ja mõju loomade toidu või vee tarbimisele või nende toitumisseisundile.

**1.5.3. Piirsalduskatse**

Kui katse ühe doosi suurusega, mis on vähemalt 1 000 mg looma kehakaalu kg kohta ööpäevas, kasutades käesoleva uuringu jaoks kirjeldatud töökorda, ei põhjusta märgatavat ebasoodsat mõju ja kui toksilisust ei eeldata samalaadse struktuuriga ainete kohta käivate andmete põhjal, ei ole kolme doosi suurustega täisuurine vajalik. Teha võib piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

**1.5.4. Doseerimine**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 90 päeva jooksul. Mis tahes muu doseerimisrežiim, nt viis päeva nädalas, vajab põhjendamist. Kui uuritavat ainet manustatakse kunstlikult, peaks seda tegema loomadele ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Maksimalne vedelikumaht, mida võib korraga loomale manustada, sõltub katseloomade suurusest. Tavaliselt tuleks hoida need mahud võimalikult madalal. Välja arvatud ärritavate või söövitavate ainete puhul, millel on suurematel kontsentratsioonidel tavaliselt halvem toime, tuleks katsemahu varieeruvus muuta minimaalseks sellega, et kõikidel doositasemetel kohandatakse ühesuguse mahu tagamiseks kontsentratsiooni.

**▼B**

Ainete puhul, mida manustatakse toidu või joogiveega, on oluline tagada, et toiduga kasutatavad uuritava aine kogused ei häiriks tavalist toitumise või joogivee tasakaalu. Kui uuritavat ainet manustatakse toiduga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni toidus (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehakaalule; valitud alternatiiv tuleb täpsustada. Kui ainet manustatakse kunstlikult, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et looma kehakaalu suhtes säiliks püsiv doositase. Kui 90päevane uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada samalaadset toitu.

1.5.5. **Vaatlused**

Vaatlusperiood peaks kestma vähemalt 90 päeva. Järelvaatluse jaoks planeeritud satelliitrühma loomad tuleks hoida sobiva perioodi jooksul menetlemata, et oleks võimalik avastada toksilise toime pööratavust või püsivust.

Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal/samadel aegadel, arvestades eeldatavat mõju kõrgperioodil pärast doseerimist. Loomade kliiniline seisund tuleks dokumenteerida. Vähemalt kaks korda päevas, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

Vähemalt üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada subjektide omavahelist kõrvutamist) ja pärast seda kord nädalas tuleks teha kõikide loomade üksikasjalik kliiniline läbivaatus. Kui see on praktiliselt võimalik, tuleks sellised vaatlused teha väljaspool puuri, selleks ettenähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal ajal. Tuleks üritada tagada, et vaatlustingimuste varieerumine oleks minimaalne. Toksilisuse nähud tuleks koos nende algusaja, raskusastme ja kestusega hoolikalt üles märkida. Vaatlus peaks sealhulgas sisaldama muutusi nahal, karvkattes, silmades, limaskesetadel, sekretsiooni ja ekskretsiooni esinemises ja autonoomses tegevuses (nt pisaratevool, karvade jäigastumine, pupilli suurus, ebataoline hingamisrütm). Samuti tuleks üles märkida muutused käimises, seisangus ja samuti reageerimine käitlemisele ning klooniliste või tooniliste liigutuste esinemine, stereotüübid (nt liigne karvade puhastamine, korduv tiirlemine) või igasugune kummaline käitumine.

Oftalmoloogiline läbivaatus, kasutades silmapeeglit või samalaadset sobivat vahendit, tuleks teha enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes eelistatavalt kõikidel loomadel, kuid vähemalt suure doosiga rühmas ja kontrollrühmas. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad.

1.5.5.1. *Kehakaal ja toidu/vee tarbimine*

Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Toidu tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist samuti vähemalt kord nädalas mõõta. Vee tarbimise mõõtmist võib kaaluda ka selliste toitumise või kunstlikult toitumise uuringute korral, mille jooksul võib joomisaktiivsuses esineda muutusi.

**▼B**1.5.5.2. *Hematoloogia ja kliiniline biokeemia*

Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast ja neid tuleks vajaduse korral säilitada sobivates tingimustes. Katseperioodi lõpus võetakse proovid vahetult enne loomade tapmist või selle käigus.

Katse alguses tuleks uurida hematoloogiat, sealhulgas hematokritti, hemoglobiini kontsentratsiooni, erütrotsüütide arvu, leukotsüütide üld- ja diferentseeritud arvu, vereliistakute arvu ja mõõta vere hüübimisvõimet, nagu näiteks hüübimise kiirust, protrombiiniiga või tromboplastiiniiga, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus.

Kliinilise biokeemia analüüsid, millega uuritakse kõige tähtsamaid mürgi mõjusid kudedes ja eriti selle mõju neerule ja maksale, tuleks teha vereproovide kohta, mis on võetud kõikidelt loomadelt katse alguses, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus. Vaatluse alla tuleks võtta sellised uuringuvaldkonnad nagu elektrolüütide tasakaal, sahhariidide ainevahetus ja maksa ning neeru funktsioon. Konkreetsete katsete valikut mõjutavad tähelepanekud uuritava aine mõju kohta. Sõltuvalt liigist ei tohiks loomadele enne vereproovide võtmist teatud aja vältel süüa anda. Soovitavad analüüsid on kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, paastumise glükoos,alaniinaminotransferaas, aspartaaminotransferaas, ornitiindekarboksülaas, gamma-glutamüültranspeptidaas, karbamiidlämmastik, albumiin, vere kreatiniin, kogu bilirubiin ja kogu seeriumi valgu mõõtmised.

Uriinianalüüsi peaks tegema vähemalt uuringu alguses, keskel ja lõpus, kasutades uriini kogumist kindlatel aegadel. Uriinianalüüsi puhul määratakse välimus, ruumala, osmolaalsus või erikaal, pH, valk, glükoos ja veri ja/või vererakud. Vajadusel võib kasutada lisaparameetreid, kui on tarvis laiendada täheldatud mõju uurimist.

Lisaks tuleks kaaluda üldisele kude kahjustusele osutavate markerite uurimist. Muud analüüsid, mis võivad osutada vajalikuks adekvaatse toksikoloogilise hindamise saamiseks, hõlmavad lipiidide, hormoonide, happe-aluse tasakaalu, methemoglobiini ja kolinesteraasi pärssimise analüüsi. Vajadusel võib kasutada täiendavaid kliinilise biokeemia valdkonda kuuluvaid uuringuid, kui on tarvis laiendada täheldatud mõju uurimist. Need tuleb kindlaks määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.

Üldiselt on vaja paindlikku lähenemist, mis sõltub liigist ja antud aine täheldatud ja/või eeldatavast mõjust.

1.5.5.3. *Täielik lahang*

Kõik uuringusse kaasatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki haavu, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevatena ja/või tapetakse uuringu ajal) maks koos sapipõiega, neerud, neerupealsed, munandid, munandimanused, munasarjad, emakas, kilpnääre (koos kõrvalkilpnäärmetega), harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass tuleks fikseerida võimalikult kohe pärast nende eemaldamist, et vältida kuivamist.

**▼B**

Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu seisukohast kõige sobivamas fiksaatoris: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja medulla/ajusild), seljaaju (kolmel tasandil: tservikaalne, poolrindmik, lumbaarne), ajuripats, silmad, kilpnääre, kõrvalkilpnääre, harknääre, söögitoru, süljenäärmed, magu, peen- ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, sapipõis, kõhunääre, neerud, neerupealsed, põrn, süda, trahhea ja kopsud, aort, sugunäärmed, emakas, lisaorganid, emaste rinnanäärmed, eesnääre, kusepõis, lümfisõlmed (eelistatavalt üks lümfisõlm, mis paikneb manustamise teel, ja teine, mis asub manustamise teest kaugel ja näitab süsteemset mõju), perifeerne närv (istmik või sääreluu), eelistatavalt vastava lihase läheduses olev, luuüdi proov (ja/või värske luuüdi aspiraati) ja nahk. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka teisi kudesid. Säilitada tuleks ka teised organid, mis on uuritava aine teadaolevatest omadustest tulenevalt tõenäoliselt sihtorganid.

1.5.5.4. *Histopatoloogia*

Kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. See uuring tuleks läbi viia ka teiste doosirühmade loomade puhul juhul, kui kõrge doosiga rühma osas tuvastatakse manustamisega seotud muudatusi.

Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogiline uuring teha nende kudede ja organite puhul, millel esineb samasugune toime kui katserühma puhul.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. **ANDMED**

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel tapetud loomade arv, toksiliste märkidega loomade arv, täheldatud toksiliste märkide kirjeldus, sealhulgas toksilise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta loomade protsent, kellel neid esines.

Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsivad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

2.2. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

**▼B**

- 2.2.1. **Uuritav aine:**
- füüsikaline loomus, puhtus ning füüsikalis-keemilised omadused;
  - identifitseerimisandmed;
  - vehiikel (vajaduse korral): vehiikeli valiku põhjendus, kui vehiikeliks ei ole vesi.
- 2.2.2. **Katseloomade liigid:**
- liik ja kasutatav liin;
  - loomade arv, vanus ja sugu;
  - päritolu, pidamistingimused, toit jne;
  - iga looma kaal katse alguses.
- 2.2.3. **Katsetingimused:**
- doositaseme valimise põhjendus;
  - üksikasjad uuritava aine koostise/toiduvalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
  - uuritava aine manustamise üksikasjad;
  - tegelikud doosid (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur toidu/joogivee uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) ja tegeliku doosi vahel;
  - toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.
- 2.2.4. **Tulemused**
- eluskaal/muutused eluskaalus;
  - toidu ja vajaduse korral vee tarbimine;
  - toksilise reaktsiooni andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas toksilisuse märgid;
  - kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
  - oftalmoloogiline läbivaatus;
  - hematoloogilised katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
  - kliinilise biokeemia katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
  - lõplik kehakaal, organite kaal ja organite kaalu/kehakaalu suhted;
  - lahkamise tulemused;
  - histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
  - vajaduse korral tulemuste
  - statistiline töötlemine.
- Tulemuste arutelu.
- Järeldused.

**▼B****B.28. SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL – 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

**1.2. MÕISTED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Puuduvad.

**1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE**

Uuritavat ainet manustatakse 90 päeva jooksul iga päev suu kaudu gradueeritud annustes mitmele katseloomade rühmale, iga uuringurühm saab eri suurusega annuse. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada toksilisuse nähtude ilmumist. Katse ajal surnud loomad lahatakse, katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

**1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID**

Puuduvad.

**1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS****1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne uuringut pügatakse katseloomade karv kehataivelt selja piirkonnast. Kasutada võib raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Korduvat pügamist või raseerimist on tavaliselt vaja rakendada nädalaste intervallidega. Karva lõigates või raseerides tuleb olla ettevaatlik, et mitte nahka kriimustada. Uuritava aine manustamiseks peaks olema paljastatud vähemalt 10 % nahapinnast. Paljastamist vajava nahapinna suuruse ja katmise dimensioonide otsustamisel tuleb arvesse võtta looma kaalu. Tahkete ainete manustamisel pulverisaatoriga, kui see on sobilik, tuleb uuritavat ainet piisavalt niisutada veega või vajadusel sobiva kandeainega, et kindlustada head kontakti nahaga. Vedelaid aineid kasutatakse tavaliselt ilma lahjendamata. Kasutatakse igapäevast manustamist viiest kuni seitsme päevani nädalas.

**1.6.2. Katsetingimused****1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutada tuleks täiskasvanud rotte, küülikuid või merisigu. Teisi liike võib kasutada, kuid selline otsus peab olema põhjendatud. Uuringu alguses ei tohiks loomade kaal erineda keskmisest rohkem kui  $\pm 20\%$ . Kui subkroonilise nahakaudse manustamise uuring tehakse pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike ja liine.

**▼B**

## 1.6.2.2. Arv ja sugu

Igasse annuserühma peaks kuuluma vähemalt 20 terve nahaga looma (10 isast ja 10 emast). Emasloomad tohi olla poeginud ega tiined. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleb katsealuste algarvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Peale selle võib moodustada satelliitühma 20 loomast (10 looma kummastki soost), keda ravida suurte annustega 90 päeva ja jälgida toksiliste toimete pöördumist, püsivust ja hilinenud avaldumist 28 päeva pärast ravi lõppu.

## 1.6.2.3. Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma või vehiikli kontrollrühma, kui kasutatakse vehiiklit. Uuritavat ainet tuleks manustada iga päev samal ajal ja annuseid tuleb kohandada kindlate ajavahemike järel (üks või kaks korda nädalas), et säilitada püsiv tase looma kehamassi kohta. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi (v.a uuritava ravimi manustamine). Kui annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks kontrollrühmale manustada vehiiklit samal viisil nagu ravirühmale ja nad peaksid seda saama võrdses koguses suurimat annust saava rühmaga. Suurima annuse korral peaks ilmne toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla või tekib neid vähe. Väikseim annus ei peaks põhjustama mingeid toksilise nähte. Kui saadaval on andmeid inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Ideaalselt peaks keskmine annus põhjustama minimaalset tuvastatavat toksilisust. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine. Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas peaks surmajuhte olema vähe, et tulemustest saaks teha tähenduslikke järeldusi.

Kui uuritava aine manustamine põhjustab tõsist nahaärritust, tuleb kontsentratsiooni vähendada. See võib kaasa tuua toksiliste toimete vähenemise või puudumise suure annuse rühmas. Kui nahk on raskelt kahjustunud, võib osutada vajalikuks uuring lõpetada ja alustada uut uuringut madalamate kontsentratsioonidega.

## 1.6.3. Piirsalduskatse

Kui eelnev uuring annusega 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või teadaolev inimese ekspositsioon sellest suuremale annusele ei ole põhjustanud toksilisi toimeid, pole edasine uuring vajalik.

## 1.6.4. Jälgimisaeg

Katseloomi tuleb iga päev jälgida toksilisuse ilmingute suhtes. Registreerida tuleb surma aeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

**▼B**

## 1.6.5. Protseduur

Loomad peavad olema kambrites ühekaupa. Loomadele manustatakse uuritavat ainet ideaalsel juhul seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul.

Satelliitühmesse kuuluvaid loomi hoitakse jälgimiseks ilma ravita järgmised 28 päeva, et tuvastada toksilise toime möödumist või püsimist. Ekspositsiooni aeg peab olema kuus tundi päevas.

Uuritavat ainet tuleb manustada ühtlaselt nahapiirkonnale suurusega umbes 10 % kehapinnast. Väga toksiliste ainete puhul võib kasutada väiksemat nahapinda, kuid üldiselt tuleks katta nii suur ala kui võimalik võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Ekspositsioonija jooksul hoitakse uuritavat ainet nahaga kontaktis poorse marlisideme ja mitteärritava teibiga. Manustamiskohta tuleb katta sobival viisil, et hoida side ja uuritav aine paigal ja kindlustada, et loomad ei saaks uuritavat ainet alla neelata. Uuritava aine allaneelamise vältimiseks võib kasutada piiravaid vahendeid, kui täielik immobilisatsioon ei ole soovitatav meetod.

Ekspositsioonija lõpus tuleb uuritava aine jäägid nahalt kõrvaldada, kui see on rakendatav. Puhastamiseks kasutatakse vett või mõnda muud sobivat nahapuhastamise meetodit.

Kõiki loomi tuleb jälgida iga päev ja registreerida toksilisuse ilmingud, sealhulgas algusaeg, ulatus ja kestus. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist ja loomi kaaluda. Loomade regulaarne jälgimine on vajalik tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Katseperioodi lõpus lahatakse kõik mitte-satelliitvirühma kuulunud loomad. Surevad loomad tuleb eemaldada, surmata ja lahata, kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

- a) oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne kokkupuudet uuritava ainega ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi;
- b) katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv;



**▼B**

- c) kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringuperioodi lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, <sup>(1)</sup> seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transami-naas, <sup>(2)</sup> ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüültranspeptidaas, urea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, hape-alus tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisi kliinilise biokeemia analüüse;
- d) uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Kui teadaolevad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne annustamise algust.

**L a h a n g**

Kõikidele loomadele tuleb teha täielik lahang, mis hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude, sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud, ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, süljenäärmed, maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas lisasugunäärmed, sapipõis (kui see on olemas), söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, põis, näidislümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), (reiepiirkonna lihaskond), perifeerne närv, (silmad), rinnak koos luudiga, (reieluu, sealhulgas liigespind), (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa) ja (ekstraorbitaalsed pisaranäärmed). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

**Histopatoloogiline uuring**

- a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma kuulunud loomade normaalsest ja ravitud nahast ja organitest ja kudedest.
- b) Uurida tuleb kõiki silmaga nähtavaid lesioone.

<sup>(1)</sup> Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.

<sup>(2)</sup> Praegu tuntud kuialaniini aminotransferaas.

**▼B**

- c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.
- d) Kui kasutatakse rotte, tuleks väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendesse rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.
- e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabelis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioon ja lesioonide tüübid ja iga tüübi protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet;
- katsetingimused;
- annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid;
- toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa;
- toime puudumise tase, kui see on võimalik;
- surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni;
- toksiliste või muude toimete kirjeldus;
- iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg;
- andmed toidu ja kehakaalu kohta;
- oftalmoloogilised leiud;
- kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused;
- kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüsides tulemused);
- lahanguleiud;

**▼B**

- histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus;
- tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik;
- tulemuste arutelu;
- tulemuste tõlgendamine.

3.2. HINNANG JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼ M4

B.29. **SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL:  
90-PÄEVANE UURING**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M4

B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼ B**

**B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M4

B.32. KANTSEROGEENSUSE UURINGUD

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ **M4**

**B.33. KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSERO-  
GEENSUSE UURING**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.



**▼ B**

**B.34. ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING**

**▼ M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide toksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼ B**

**B.35. KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE  
UURING**

**▼ M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide toksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ **M4****B.36. TOKSIKOKINEETIKA**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 417 (2010). Uuritava kemikaali toksikokineetika uuringud tehakse selleks, et saada tõest teavet kemikaali imendumise, jaotumise, biotransformatsiooni (metaboliseerimise) ja väljutamise kohta, et aidata kaasa kontsentratsiooni või doosi seostamisele täheldatud mürgisusega ning aidata mõista selle mürgisuse mehhanismi. Toksikokineetika võib aidata mõista toksikoloogiauringuid, kuna sel viisil näidatakse, et katseloomad puutuvad uuritava kemikaaliga kokku süsteemselt, ning selgitatakse välja, millised struktuuriühikud (lähtekemikaal/metaboliidid) ringlevad katselooma organismis. Kõnealustest uuringutest saadavad toksikokineetika põhiparameetrid annavad teavet ka uuritava kemikaali võimaliku akumulatsiooni kohta kudedesse ja/või organismesse ning uuritava kemikaaliga kokkupuute tõttu võimaliku biotransformatsiooni põhjustamise kohta.
2. Toksikokineetika andmed võivad aidata hinnata, kui võrd adekvaatne ja asjakohane on ekstrapoleerida loomadel avalduva mürgisuse andmeid inimesetega seotud ohtude ja/või riskide hindamisele. Lisaks sellele võivad toksikokineetilised uuringud anda kasulikku teavet mürgisuse uuringute doositasete (lineaarne vs. mittelineaarne kineetika), manustamistee mõju ja biokättesaadavuse kindlakstegemiseks ning uuringu kavandamise küsimuste lahendamiseks. Teatavat tüüpi toksikokineetika andmeid on võimalik kasutada füsioloogial põhineva toksikokineetika (PBTK) mudeli arendamiseks.
3. Metaboliitide/toksikokineetika andmetel on tähtsaid kasutusvaldkondi, näiteks aitavad need ennustada kemikaalide võimalikku mürgisust ja toimeviisi ning mõista mürgisuse ja toimeviisi seoseid doositaseme ja kokkupuutumisteedega. Lisaks sellele võib kemikaalide metaboliseerumise andmetest saada teavet, mis aitab hinnata uuritava kemikaali eksogeenselt tekkinud/-valmistatud metaboliitidega kokkupuute toksikoloogilist tähtsust.
4. Head toksiko-kineetilised andmed aitavad teha järeldusi, kui võrd usaldusväärsed ja kasutatavad on kemikaalide ohutuse hindamisel kvantitatiivsed struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, analoogmeetod ja grupeerimismeetod. Kineetika andmeid võib kasutada ka muude uuringute (näiteks *in vivo* / *in vitro*) toksikoloogilise asjakohasuse hindamiseks.
5. Kui ei ole nimetatud muud manustamisteed (vt eelkõige punktid 74–78), kasutatakse käesolevat katsemeetodit uuritava kemikaali suukaudse manustamise puhul.

## LÄHTEKAALUTLUSED

6. Õigussüsteemides on eri kemikaaliklasside (näiteks pestitsiidid, biotsiidid, tööstuskemikaalid) toksikokineetika näitajate ja parameetrite mõõtmisega seoses sätestatud erinevad nõuded ja vajadused. Erinevalt enamikust katsemeetoditest kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis toksikokineetika katseid, mis hõlmavad mitmeid mõõtmisi ja näitajaid. Tulevikus töötatakse arvatavasti välja mitu uut katsemeetodit ja/või juhenddokumenti, et kirjeldada eraldi ja täpsemalt iga näitajat. Käesoleva katsemeetodi puhul määratakse tehtavad katsed või hindamised kindlaks iga õigussüsteemi nõuete ja/või vajadustega.

**▼M4**

7. Regulaatiivseks otstarbeks võib uuritava kemikaali toksiko-kineetilist käitumist hinnata paljude uuringutega. Kõik kõnealused võimalikud uuringud ei pruugi uuritava kemikaali hindamiseks olla siiski vajalikud, kõik oleneb konkreetsetest regulaatiivsetest vajadustest või olukorrast. Toksiko-kineetiliste uuringute kavandamiseks on vaja paindlikkust ja uuritava kemikaali omaduste arvestamist. Mõnikord tuleb uurida ainult teatavaid küsimusi, et teha kindlaks uuritava kemikaaliga seotud ohud ja riskid. Mõnikord võib toksiko-kineetilisi andmeid koguda muus toksikoloogiauringus kemikaali hindamise osana. Muus olukorras võivad olla vajalikud ulatuslikud täiendavad toksiko-kineetilised uuringud, kui selleks on regulaatiivne vajadus või tekib uuritava kemikaali hindamisel uusi küsimusi.
  
8. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali ja asjakohaste metaboliitide ning analoogide kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja vältida loomade tarbetut kasutamist. See võib hõlmata muude asjakohaste katsemeetodite andmete kasutamist (*in vivo* uuringud, *in vitro* uuringud ja/või *in silico* hindamised). Füüsikalise-keemilised omadused, näiteks kemikaali jaotustegur süsteemis oktanool-vesi ( $\log P_{OW}$ ), pKa, lahustuvus vees, aururõhk ja molekulmass võivad olla kasulikud uuringu planeerimisel ning tulemuste tõlgendamisel. Need on võimalik kindlaks määrata sobivate meetodite abil, nagu on kirjeldatud asjakohastes katsemeetodites.

**PIIRANGUD**

9. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud tegelemiseks eriolukordadega (näiteks tiined või poegi imetavad loomad ja noorloomad) või võimalike jääkide hindamiseks kemikaalidega kokku puutunud loomades, keda inimene tarbib toiduks. Katsemeetodi B.36 kohase uuringu andmed võivad siiski anda taustteavet, mis aitab kavandada eriuuringuid selliste küsimuste lahendamiseks. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. OECD katsejuhendite esialgse läbivaatamise aruandes, milles käsitletakse nende kohaldatavust nanomaterjalide uurimisele, on märgitud, et katsejuhend nr 417 (mis on samaväärne käesoleva katsemeetodiga B.36) ei pruugi olla kohaldatav nanomaterjalide uurimisele (1).

**MÕISTED**

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on esitatud liites.

**LOOMADE HEAOLU KAALUTLUSED**

11. Suunised loomade humaanse kohtlemise kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (2). OECD juhenddokumenti nr 19 soovitatakse kasutada kõigi käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* ja *in vitro* uuringute puhul.

**MEETODITE KIRJELDUS****Prooviuringud**

12. Soovitatakse kasutada prooviuringuid, et valida toksiko-kineetilistel uuringutel jälgitavad parameetrid (näiteks kemikaali metaboliseerimine, massibilanss, analüüside tegemine, dooside valimine, CO<sub>2</sub> väljahingamine jne). Mõnda kõnealustest parameetritest saab määrata ka ilma radiomärgistatud kemikaali kasutamata.

**▼ M4****Loomade valimine***Liik*

13. Toksikokineetika katsetes kasutatav loomaliik (ja liin) peaks eelistatavalt olema sama kui asjakohase uuritava kemikaaliga tehtud muudes toksikoloogilistes uuringutes. Üldiselt tuleks kasutada rott, kuna seda liiki on toksikoloogilistes uuringutes palju kasutatud. Muu või täiendava liigi kasutamine võib olla põhjendatud, kui asjakohased toksikoloogilised uuringud näitavad märkimisväärset mürgisust kõnealuse liigi suhtes või kui mürgisus kõnealuse liigi suhtes või liigi isenditel avalduv toksikokineetika on näidatud olevat inimeste jaoks asjakohasem. Loomaliigi ja liini valikut tuleks põhjendada.
  
14. Kui ei ole öeldud teisiti, viidatakse käesolevas katsemeetodis katseliigina rotile. Muu katseliigi kasutamise korral võib meetodi teatavaid aspekte muuta.

*Vanus ja liin*

15. Tuleks kasutada noori terveid täiskasvanud loomi, kes on annustamise ajal tavaliselt 6–12 nädala vanused (vt ka punktid 13 ja 14). Muude kui noorte täiskasvanud loomade kasutamise korral tuleks seda põhjendada. Kõik loomad peaksid uuringu alguses olema samases vanuses. Üksiku looma kehamass ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 20\%$  katserühma keskmisest kehamassist. Kõige parem oleks kasutada sama liini, mida kasutati uuritava kemikaali toksikoloogilise andmebaasi koostamisel.

*Loomade arv ja sugu*

16. Iga uuritava doosi korral tuleks kasutada vähemalt nelja samast soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Kui on tõendeid, et kummagi soo puhul avaldub mürgisus erinevalt, tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma).

*Pidamis- ja söötmingimused*

17. Loomi tuleks katse ajal üldjuhul eraldi pidada. Eriolukorras võib olla põhjendatud rühmas pidamine. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 °C ( $\pm 3$  °C) ja suhteline õhuniiskus 30–70 %. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

**Uuritav kemikaal**

18. Uuringu kõigi massibilansi ja metaboliitide tuvastamise andmete saamiseks tuleks kasutada  $^{14}\text{C}$  abil radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Kui on aga võimalik tõendada, et

— massibilansi ja metaboliite on võimalik õigesti hinnata märgistamata uuritava kemikaaliga,

— mitteradioaktiivse uuritava kemikaaliga kasutatud meetodi analüütiline täpsus ja tundlikkus on radiomärgistatud uuritava kemikaali kasutamisega võrreldes samaväärne või suurem,

▼ **M4**

ei ole radiomärgistatud uuritavat kemikaali vaja kasutada. Samuti võib kasutada muid radioaktiivseid ja stabiilseid isotoope, eelkõige juhul, kui kõnealune element põhjustab uuritava kemikaali mürgisuse või on selle osa. Kui võimalik, peaks radiomärgis asuma molekuli metaboliseerimise suhtes stabiilses põhiosas (osa, mis ei ole vahetatav, mida ei eemaldata metaboliseerimisel CO<sub>2</sub>-na ja mis organismis ei lähe ühe süsinikuaatomiga ühendite puuli). Uuritava kemikaali metaboliseerimise käigu väljaselgitamiseks võib olla vajalik märgistada molekulis mitu aatomit või konkreetset piirkonda.

19. Radiomärgisega ja radiomärgiseta uuritavat kemikaali tuleks asjakohaste meetodite abil analüüsida, et veenduda kemikaali puhtuses ja vastavuses keemilisele määratlusele. Radioaktiivse uuritava kemikaali radioloogiline puhtus peaks olema nii suur, kui konkreetse uuritava kemikaali puhul on võimalik saavutada (ideaaljuhul üle 95 %), ning tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et tuvastada kõik lisandid, mida on 2 % või rohkem. Tuleb esitada andmed uuritava kemikaali puhtuse kohta ja kõikide kindlaks tehtud lisandite keemilise määratluse ja osakaalu kohta. Igas regulatiivses kavas võidakse otsustada anda täiendavaid suuniseid, kuidas määratleda ja kirjeldada uuritavat kemikaali, mis kujutab endast segu, ning milliseid meetodeid tuleb kasutada selle puhtuse määramiseks.

**Doosi valik***Prooviuuring*

20. Üldjuhul on prooviuuringuks piisav üks suukaudne doos. Doos ei tohiks olla mürgine, kuid peaks olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes ja väljahingatud õhus (ja plasmas, kui see on asjakohane) ning saavutada prooviuuringu nimetatud eesmärk, mis on märgitud käesoleva katsemeetodi punktis 12.

*Põhiuuring*

21. Põhiuuringu puhul eelistatakse vähemalt kahe doosi kasutamist, kuna vähemalt kahest doosirühmast kogutud teave võib aidata määrata doosi muudes mürgisuse uuringutes ja hinnata juba olemasolevate mürgisuse katsete mõju sõltuvust doosist.
22. Kui manustatakse kahte doosi, peaksid mõlemad doosid olema piisavalt suured selleks, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane). Doosi valimisel tuleks arvesse võtta olemasolevatest toksilisuse andmetest saadud teavet. Kui teavet (näiteks ägeda suukaudse mürgisuse või korduvdoosi mürgisuse uuringute teavet kliiniliste mürgistusnähtude kohta) ei ole, võib kaaluda suuremat annust, mis on allpool LD<sub>50</sub> (suukaudsel ja nahakaudsel manustamisel) või LC<sub>50</sub> (sissehingamise kaudu manustamisel) hinnangulist väärtust või allpool ägeda mürgisuse hinnangulise vahemiku alumist väärtust. Väiksem annus peaks olema suurema doosi mingi murdosa.
23. Ainult ühe doositaseme uurimise korral peaks doos ideaaljuhul olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane), põhjustamata ilmset mürgistust. Teise doositaseme lisamata jätmist tuleks põhjendada.
24. Kui on vaja määrata doosi mõju kineetilistele protsessidele, ei pruugi kahest doosist piisata ja vähemalt üks neist peaks olema piisavalt suur, et saavutada kõnealuses protsessis küllastumist. Kui plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC) ei ole põhiuuringus kasutatud kahe doositaseme vahel lineaarne, on see oluline tõend, et ühe või enama kineetilise protsessi küllastumine toimub kusagil kahe doositaseme vahel.

**▼ M4**

25. Vähesel mürkisusega uuritavate kemikaalide puhul tuleks (suu- ja naha-kaudse manustamise korral) kasutada maksimumdoosi 1 000 mg kehakaalu kg kohta (sissehingamise teel manustamise puhul vt suunised, käesoleva lisa peatükk B.2; üldjuhul ei ületa see doos 2 mg/l). Kemikaalist olenevalt võib regulatiivsete nõuete täitmiseks osutada vajalikuks suurema doosi kasutamine. Doosi valik peaks olema alati põhjendatud.
26. Ühe doosi toksiko-kineetilised ja kudedes jaotumise andmed võivad olla piisavad bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkuse kindlaksmääramiseks. Mõnel juhul võib siiski olla vajalik korduvdoosi manustamine, i) et käsitleda täpsemalt bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkust või muutusi toksikokineetikas (s.o näiteks ensüümide induksioon ja inhibeermine), või ii) kui seda nõuab kohaldatav õigussüsteem. Kuigi üldjuhul piisab väikese doosi korduvast manustamisest, võib korduvdoosiuuringute puhul olla mõnedel tingimustel vajalik ka suure doosi korduv manustamine (vt punkt 57).

**Uuritava kemikaali manustamine**

27. Uuritav kemikaal tuleks lahustada või tekitada selle ühtlane suspensioon samas kandeaines, mida on kasutatud muude suukaudse mürkisuse sündsöötmisega manustamisega uuringutes, kui kõnealune teave kandeaine kohta on olemas. Kandeaine valikut tuleks põhjendada. Kandeaine ja doseerimiskoguse valimist tuleks käsitleda juba uuringu koostamisel. Tavaline manustamismeetod on sündsöötmisega; manustamine želatiinkapslis või söödasegu osana võib siiski olla konkreetse olukorras kasulik (mõlemal juhul tuleks valitud meetodit põhjendada). Igale loomale tegelikult manustatud doosi tuleks kontrollida.
28. Suukaudsel sündsöötmisel korraga manustatava vedeliku maksimaalne kogus on katselooma suurusest, doosi kandeaine tüübist ja sellest, kas loomi enne uuritava kemikaali manustamist nälgutatakse või mitte. Enne manustamist sööda andmist või mitteandmist tuleks põhjendada. Üldiselt peaks manustatav maht nii veepõhise kui ka muude kandeainete puhul olema nii väike, kui praktiliselt võimalik. Doosi kogus näriliste puhul ei tohiks üldiselt ületada 10 ml kehakaalu kg kohta. Lipofiilsema uuritava kemikaali puhul kasutatav kandeaine kogus võiks alata 4 ml-st kehakaalu kg kohta. Korduvdoosiuuringutes, kus igapäevane nälgutamine on vastunäidustatud, tuleks kaaluda väiksema doosikoguse (näiteks 2–4 ml kehakaalu kg kohta) kasutamist. Kui võimalik, tuleks püüda kasutada sellist doosikogust, mis on kooskõlas uuritava kemikaaliga tehtud muude suukaudse sündsöötamise uuringutega.
29. Uuritava kemikaali intravenooset manustamist ning uuritava kemikaali mõõtmist veres ja/või väljaheidetes võib kasutada biosaadavuse või suhtelise suukaudse imendumise määramiseks. Intravenoosse manustamise uuringu puhul manustatakse asjakohase kandeaine abil üks doos uuritavat kemikaali (mis on üldiselt võrdväärne väikese suukaudse doosiga, aga ei tohi seda ületada, vt doosi valimine). Seda materjali tuleks manustada sobiv kogus (näiteks 1 ml kehakaalu kg kohta) valitud manustamiskohas vähemalt neljale asjakohasest soost loomale (kui see on põhjendatud, siis võib kasutada mõlemat sugu, vt punkt 16). Intravenoosseks manustamiseks tuleb ette valmistada uuritava kemikaali täielikult lahustatud või suspendeeritud doos. Intravenoosse manustamise kandeaine ei tohiks mõjutada vere koostist ega

▼ **M4**

voolamist. Kui uuritav kemikaal kanti üle infusioonipumbaga, tuleks katseprotokollis teatada ülekandmise kiirus, mis peaks kõigi loomade puhul olema standardne. Kanüüli viimisel jugulaarveeni (uuritava kemikaali manustamiseks ja/või vere kogumiseks) või reicarterisse (uuritava kemikaali manustamiseks) tuleks kasutada tuimestust. Tuimestuse tüüpi tuleks hoollega kaaluda, kuna see võib toksikokineetikat mõjutada. Loomad peaksid saama enne uuritava kemikaali ja kandeaine manustamist piisavalt toibuda.

30. Teatava uuritava kemikaali puhul võib olla asjakohane muu manustamistee, näiteks nahakaudne või sissehingamise teel manustamine (vt punktid 74–78), olenevalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest ja eeldatavast kasutamisest inimeste poolt või inimestega kokkupuute teest.

**Mõõtmised***Massibilanss*

31. Massibilansi määramiseks liidetakse manustatud (radioaktiivse) doosi kogused (protsent esialgsest doosist), mis leitakse uriinis, väljaheites ja väljahingatud õhus ning tehakse kindlaks kudedes, korjusejääkides ja puuripesuvedelikus (vt punkt 46). Üldiselt peetakse piisavaks, kui manustatud uuritavat kemikaalist (radioaktiivsusest) suudetakse liitmisega koguda > 90 %.

*Imendumine*

32. Esialgne imendumise hinnang saadakse sel teel, et massibilansi arvutusest lahutatakse seedetraktis ja/või väljaheites oleva doosi osakaal. Imendumise protsendi arvutus on esitatud punktis 33. Väljahingatava õhu, väljaheite ja uriini uurimise kohta vt punktid 44–49. Kui pärast suukaudset manustamist ei ole imendumise täpset ulatust võimalik massibilansi abil kindlaks määrata (näiteks kui üle 20 % manustatud doosist leitakse väljaheitest), võib vajalik olla täpsem uuring. Kõnealune uuring võib seisneda kas 1) uuritava kemikaali suukaudses manustamises ja määramises, kui palju uuritavat kemikaali leidub sapis, või 2) uuritava kemikaali suukaudses ja intravenoosses manustamises ning uriinis leiduva uuritava kemikaali netosisalduse mõõtmises, millele liidetakse väljahingatud õhus ja korjuses leiduv uuritava kemikaali sisaldus kummagi manustamistee puhul. Mõlemas uuringuprojekti mõõdetakse radioaktiivsust uuritava kemikaali ja metaboliitide keemilise analüüsi asendusmeetodina.
33. Sapi kaudu eritamise uuringu tegemisel kasutatakse üldiselt suukaudset manustamist. Kõnealusel uuringus viiakse vähemalt nelja asjakohasest soost (vajaduse korral kummastki soost) looma sapijuhasse kanüül ja manustatakse üks doos uuritavat kemikaali. Pärast uuritava kemikaali manustamist tuleks jälgida radioaktiivsuse / uuritava kemikaali eritumist sapiiga nii kaua, kui on vaja sapi kaudu erituvat manustatud doosi protsendi hindamiseks, mida saab otseselt kasutada suukaudse imendumise ulatuse arvutamiseks järgmiselt:

$$\text{imendumise protsent} = \frac{(\text{kogus sapis} + \text{uriinis} + \text{väljahingatud õhus} + \text{korjuses ilma seedetrakti sisalduseta})}{\text{manustatud kogus}} \times 100$$

34. Mõne uuritavate kemikaalide klassi puhul võib imendunud doos sekreteeruda otse läbi soolestiku membraanide. Sellisel juhul loetakse, et sapijuhasse sisestatud kanüüliga rotile suukaudselt manustatud doosi väljaheites sisalduva protsendi mõõtmine ei näita imendumata doosi protsenti. Kui oletatakse sekretsiooni otse soolestikku, soovitatakse imendunud doosi protsendi arvutamisel toetuda imendumisele, mis arvutatakse suukaudse manustamise puhul väljutamise ja intravenoosse manustamise puhul väljutamise (intaktne rott või rott, kelle sapijuhasse on viidud kanüül) võrdluse alusel (vt punkt 35). Samuti soovitatakse, et kui peetakse vajalikuks soolestiku sekretsiooni arvulist määramist, tuleks mõõta doosi väljutamist pärast doosi intravenooset manustamist rotile, kelle sapijuhasse on viidud kanüül.



▼ **M4***Biosaadavus*

35. Biosaadavust on võimalik kindlaks määrata suukaudse ja intravenoosse manustamise rühmade plasma/vere kineetika alusel, nagu on kirjeldatud punktides 50–52, tuginedes uuritava kemikaali ja/või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) keemilisele määramisele; sel juhul ei ole vaja kasutada radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Uuritava kemikaali või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) biosaadavuse (F) võib siis arvutada järgmiselt:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (\text{Dose}_{\text{IV}}/\text{Dose}_{\text{exp}})$$

kus AUC on plasmas sisalduva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala, IV on intravenoosne ja exp on eksperimentaalne manustamistee (suukaudne, nahakaudne või sissehingamise teel).

36. Süsteemsete mõjude riski hindamisel eelistatakse üldjuhul kasutada toksilise osa biosaadavust imendumise protsendi asemel, kui võrreldakse loomade uuringute süsteemseid kontsentratsioone analoogsete bioseire andmetega, mis saadakse töötajate kokkupuute uuringutest. Olukord võib olla keerukam, kui doosid on mittelineaarses vahemikus, seepärast on tähtis, et toksiko-kineetilise sõelumise raames määratakse kindlaks lineaarse vahemiku doosid.

*Jaotumine kudedes*

37. Teadmised uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise kohta on olulised sihtkudede määramiseks ning mürgisuse aluseks olevate mehhanismide mõistmiseks, samuti teabe saamiseks uuritava kemikaali ja metaboliitide bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse kohta. Summaarse (radioaktiivse) doosi protsenti kudedes ning samuti korjusejäädikes tuleks mõõta vähemalt väljutamiskatse lõpus (näiteks üldjuhul seitse päeva pärast doosi või vähem, olenevalt uuritava kemikaali konkreetsest käitumisest). Kui uuringu lõpus uuritavat kemikaali kudedes ei tuvastata (näiteks kuna uuritav kemikaal võib olla enne uuringu lõppu lühikese poolestusaja tõttu juba kadunud), siis tuleks olla hoolikas, et vältida andmete väärtõlgendamist. Sellises olukorras tuleks uurida uuritava kemikaali (ja/või metaboliidi) jaotumist kudedes sel ajal, kui selle kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne ( $T_{\text{max}}$ ) või kui selle väljutamine uriini kaudu on kõige kiirem, nagu on asjakohane (vt punkt 38). Lisaks sellele võib olla vajalik kudede kogumine täiendavatel ajahetkedel, et hinnata uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise sõltuvust ajast (kui see on asjakohane), et hõlbustada massibilansi määramist ja/või täita pädeva ametiasutuse esitatud nõudeid. Kogutavate kudede hulka kuuluvad maks, rasvkude, magu ja soolestik, neerud, põrn, täisveri, korjusejäädigid, sihtorgani koed, samuti tuleks koguda uuritava kemikaali toksikoloogilise hindamise jaoks võimalikku tähtsust omavaid muid kudesid (näiteks kilpnääre, erütrotsüüdid, suguelundid, nahk, silm (eelkõige pigmenteerunud loomade puhul)). Tuleks kaaluda täiendavate kudede analüüsi samadel ajahetkedel, et kasutada loomi maksimaalselt, samuti juhul, kui subkroonilise või kroonilise mürgisuse uuringutes täheldatakse mürgisust sihtorgani suhtes. Samuti tuleks teatada (radioaktiivsete) jääkide kontsentratsioon ning kudede ja plasma (vere) radioaktiivsuse suhtarvud.

38. Kudedes jaotumise hindamine täiendavatel ajahetkedel, näiteks siis, kui kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne (näiteks  $T_{\text{max}}$ ) või kui väljutamine uriini kaudu toimub suurima kiirusega, mis on kindlaks tehtud vastavate plasma/vere kineetika või väljutamise katsetega, võib samuti olla vajalik või seda võib nõuda pädev asutus. See teave võib olla vajalik mürgisuse mõistmiseks ning uuritava kemikaali ja metaboliidi bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse hindamiseks. Tuleks esitada proovide valiku põhjendused; analüüsiproovid peaksid üldjuhul olema samad kui eespool nimetatud (vt punkt 37).

▼ **M4**

39. Kudedes jaotumise uuringutes võidakse radioaktiivsuse arvuline määramine teha vedelik-stsintillatsiooniloenduri (VSL) abil pärast seda, kui organid on välja lõigatud, homogeenitud, põletatud ja/või solubiliseeritud ning nende jäägid on kogutud ja viidud loendurisse. Praegu arendatakse mitut tehnilist meetodit, nagu kvantitatiivne kogu keha autoradiograafia ja retseptori mikroskoop-autoradiograafia, mis võivad osutada kasulikuks uuritava kemikaali organites ja/või kudedes jaotumise määramisel (3, 4).
40. Muu kui suukaudse kokkupuute puhul tuleks koguda ja analüüsida konkreetseid kudesid, näiteks inhalatsiooniuringute puhul kopsu ja nahakaudsete uuringute puhul nahka. Vt punktid 74–78.

*Metaboliseerimine*

41. Väljaheidet (ja plasma, kui see on asjakohane) tuleks koguda muutumata uuritava kemikaali ja metaboliitide tuvastamiseks ja arvuliseks määramiseks, nagu on kirjeldatud punktides 44–49. Metaboliitide tuvastamise lihtsustamiseks on lubatud koondada ühe doosirühma väljaheidet. Soovitav on iga ajahetke jaoks määrata metaboliidiprofiil. Kui proovide ja/või radioaktiivsuse puudumine seda ei võimalda, siis on lubatud koondada mitme ajahetke uriini ja fekaalid, kuid sugude- ja doosidevaheline koondamine ei ole lubatud. Uuritava kemikaaliga töödeldud loomade uriini, fekaalide, väljahingatud radioaktiivsuse ja sapi (kui see on asjakohane) analüüsimiseks tuleks kasutada sobivaid kvalitatiivseid ja kvantitatiivseid meetodeid.
42. Tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et määrata kindlaks kõik metaboliidid, mille kogus on vähemalt 5 % manustatud doosist, ning esitada uuritava kemikaali metaboliseerimise skeem. Tuleks kindlaks teha uuritavad kemikaalid, mida on väljaheidetes vähemalt 5 % manustatud doosist. Tuvastamine tähendab siin koostisainete täpse struktuuri määramist. Üldiselt toimub keemilise struktuuri määramine nii, et metaboliiti ja teadaolevaid võrdlusaineid kromatografeeritakse kahes erinevas süsteemis, või kasutatakse meetodeid, mille abil on võimalik otse määrata keemilist struktuuri, näiteks massispektrometria, tuumamagnetresonants jne. Kromatograafia puhul ei peeta metaboliidi struktuuri kahe meetodi abil tõendamisel piisavaks seda, kui kromatograafiat tehakse kahe erineva lahustisüsteemiga, kuid sama stationaarse faasiga, kuna need meetodid ei ole sõltumatud. Kromatograafiline tuvastamine peaks toimuma kahe sõltumatu analüüsisüsteemiga, näiteks tavaline ja pöördfaasi õhukese kihi kromatograafia ning kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). Kui kromatograafiline eraldamine on piisava kvaliteediga, ei ole täiendav spektroskoopiline kinnitamine vajalik. Alternatiivselt võib ühese tuvastamise saavutada struktuuriteavet andvate meetoditega, näiteks vedelikkromatograafia pluss massispektrometria (LC-MS) või vedelikkromatograafiaga tandemisse ühendatud massispektrometria (LC-MS/MS), gaaskromatograafia pluss massispektrometria (GC-MS) ning tuumamagnetresonantspektrometria.
43. Kui ei ole võimalik tuvastada metaboliite, mida on vähemalt 5 % manustatud doosist, tuleks lõpparuandes seda põhjendada või selgitada. Võib olla asjakohane tuvastada sellised metaboliidid, mille kogus on vähem kui 5 % manustatud doosist, et ohu ja/või riski hindamiseks mõista paremini uuritava kemikaali metaboliseerimisteed. Võimaluse korral tuleks esitada struktuuri kinnitus. See võib hõlmata plasmas, veres või muudes kudedes tekkinud metaboliidiprofiilide esitamist.

▼ **M4***Eritumine*

44. Tuleks kindlaks teha manustatud doosi eritumise kiirus ja ulatus; selleks mõõdetakse uriinis, fekaalides ja väljahingatud õhus leitud (radioaktiivse) doosi protsent. Neid andmeid saab kasutada ka massibilansi määramiseks. Uriini, fekaalide ja väljahingatud õhuga organismist väljunud uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) kogused tuleks kindlaks määrata sobivate ajavahe-  
mike järel (vt punktid 47–49). Korduvdoosi katsed tuleks asjakohaselt kavandada, et eritumise andmete kogumisel oleks võimalik järgida punktis 26 sätestatud eesmärgi. See võimaldab võrdlemist ühe doosi katsetega.
45. Kui prooviuuringust selgub, et uuritavat kemikaali (radioaktiivsust) (punkti 49 kohaselt) ei ole väljahingatud õhuga märkimisväärses koguses väljutatud, ei ole lõpliku uuringu ajal vaja väljahingatud õhku koguda.
46. Iga loom tuleb paigutada eraldi metaboolsesse üksusesse väljaheidete (uriini, fekaalide) ja väljahingatud õhu kogumiseks. Iga kogumisajavahe-  
miku lõpus (vt punktid 47–49) tuleks metaboolsed üksused asjakohase lahustiga loputada (seda nimetatakse puuri loputamiseks), et tagada uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) maksimaalne kogumine. Väljaheidete ja väljahingatud õhu kogumine tuleks lõpetada seitsme päeva möödudes või kui vähemalt 90 % manustatud doosist on kogutud, olenevalt sellest, kumb kriteerium enne täidetakse.
47. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused uriinis määratakse kindlaks vähemalt kahel ajahetkel kogumise 1. päeva kohta, millest üks peaks olema 24 tundi pärast doseerimist, ja seejärel üks kord päevas kuni uuringu lõpuni. Soovitatav on 1. päeval kasutada rohkem kui kahte proovi kogumise ajahetke (näiteks 6, 12 ja 24 tundi pärast doseerimist) valimist. Prooviuuringute tulemusi tuleks analüüsida, et saada teavet proovi kogumise alternatiivsete või täiendavate ajavahe-  
mike kohta. Kogumise ajakava tuleks põhjendada.
48. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused fekaalides tuleks kindlaks määrata iga päev pärast 24 tunni möödumist manustamisest kuni uuringu lõpuni, v.a juhul, kui prooviuuringutest tuleneb, et kogumiseks tuleb kasutada muid või täiendavaid ajavahe-  
mikke. Kogumise alternatiivset ajakava tuleks põhjendada.
49. Väljahingatud CO<sub>2</sub> ja muude lenduvate materjalide kogumise võib konkreetses uuringus peatada, kui väljahingatud õhus leitakse pärast 24-tunnist kogumist vähem kui 1 % manustatud doosist.

**Mõju ajast sõltuvuse uuringud***Plasma/vere kineetika*

50. Kõnealuste uuringute eesmärk on hinnata uuritava kemikaali peamised toksiko-kineetilised parameetrid (näiteks C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, poolestusaeg (t<sub>1/2</sub>), plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC)). Kõnealused uuringud võib teha ühe doosiga või tõenäolisemalt kahe või enama doosiga. Doosid tuleks valida eksperimendi laadi ja/või uuritava probleemküsümise alusel. Kineetilised andmed võivad olla vajalikud, et lahendada selliseid küsimusi nagu uuritava kemikaali biosaadavus ja/või selgitada, kuidas kehast väljutamine sõltub doosist (näiteks selgitada, kas väljutamisel esineb küllastumine alates mingist doosist).
51. Kõnealuste uuringute puhul tuleks kasutada doosirühmas vähemalt nelja ühest soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma), kui on tõendeid, et mürgisus oleneb oluliselt soost.

▼ **M4**

52. Pärast (radiomärgistatud) uuritava kemikaali manustamist tuleks igalt loomalt võtta sobival ajal vereproovid, kasutades asjakohast proovivõtu metoodikat. Loomalt võetavate vereproovide kogus ja arv võib olla piiratud korduva proovivõtu võimaliku mõjuga looma tervisele/füsioloogiale ja/või analüüsimeetodi tundlikkusega. Iga looma proove tuleks analüüsida eraldi. Mõnikord (näiteks metaboliidi iseloomustamine) võib olla vajalik rohkem kui ühe looma proovide koondamine. Koondatud proovid tuleks selgelt märgistada ja esitada koondamise selgitus. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis võib olla vajalik esineva koguradioaktiivsuse analüüs. Kui see on nii, tuleks radioaktiivsust analüüsida täisveres ja plasmas või plasmas ja punastes verelibledes, et oleks võimalik arvutada vere ja plasma omavahelist suhet. Muudel juhtudel võivad olla vajalikud täpsemad uuringud, mille puhul on vaja määrata lähteühendit ja/või metaboliite või hinnata nende seostumist valkudega.

*Muude kudede kineetika*

53. Kõnealuste uuringute eesmärk on hankida teavet mõju ajast sõltuvuse kohta, et saada vastused sellistele küsimustele nagu mürgisuse mehhanism, bioakumulatsioon ja biopüsivus, milleks määratakse kindlaks uuritava kemikaali sisaldus eri kudedes. Kudede ja hindamisajavahemike valik oleneb käsitletavast küsimusest ning uuritava kemikaali toksikoloogilisest andmebaasist. Kõnealuse täiendavate kudede kineetikauuringu kavandamisel tuleks võtta arvesse kogutud teavet, nagu on kirjeldatud punktides 37–40. Kõnealused uuringud võivad hõlmata ühe või mitme doosi manustamist. Kasutatavat lähenemisviisi tuleks üksikasjalikult põhjendada.

54. Muude kudede kineetiliste uuringute tegemise võimalikud põhjused on järgmised:

— tõendid pikendatud poolestusaja kohta veres, mis viitab uuritava kemikaali võimalikule kogunemisele mitmesugustes kudedes, või

— vajadus kindlaks teha, kas konkreetses koes on saavutatud statsionaarne olek (näiteks korduvdoosi uuringutes; kuigi veres võib uuritava kemikaali kontsentratsiooniga olla saavutatud statsionaarne olek, võib pakkuda huvi küsimus, kas statsionaarne olek on saavutatud ka sihtkudedes).

55. Seda tüüpi mõju ajast sõltuvuse uuringutes tuleks asjakohane uuritava kemikaali doos manustada suukaudselt vähemalt neljale loomale iga doosi ja iga määratud ajahetke kohta ning tuleks jälgida valitud kudedes jaotumise ajalist kulgu. Võib kasutada ainult ühte sugu, v.a juhul, kui on täheldatud mürgisuse sõltuvust soost. See, kas analüüsitakse summaarset radioaktiivsust või lähtekemikaali ja/või metaboliite, oleneb ka probleemküsimusest, millega tegeldakse. Kudedes jaotumist tuleks hinnata asjakohaste meetodite abil.

*Ensüümide induksioon või inhibeerimine*

56. Ensüümide induksiooni (sünteesi esilekutsumise) või inhibeerimise võimaliku mõju uurimine või uuritava kemikaali biotransformatsiooni uurimine võib olla vajalik järgmistel juhtudel:

1) olemasolevad tõendid osutavad, et uuritava kemikaali mürgisust suurendab biotransformatsioon;

2) olemasolevad tõendid osutavad, et metaboliseerimine ei sõltu doosist lineaarselt;

▼ **M4**

- 3) metaboliitide määramise uuring näitab võimaliku mürgise metaboliidi olemasolu, mis võib olla tekkinud uuritava kemikaali poolt indutseeritud ensümaatilise raja kaudu;
  - 4) on vaja kontrollida hüpoteesi, et uuritava kemikaali mõju on seotud ensüümi induktsiooni nähtustega;
  - 5) kui uuritava kemikaali metaboliseerimise profiilis täheldatakse kas märkimisväärseid toksikoloogilisi muutusi *in vitro* või *in vivo* katsetes muude liikidega või muudes tingimustes, võib olla vajalik asjakohas(t)e ensüümi(de) iseloomustamine (näiteks I faasi ensüümid, nagu tsütokroom P450-sõltuva monooksügenaasi süsteemi isoensüümid, II faasi ensüümid, nagu sulfotransferaasi isoensüümid või uridiindifosfaat-glükuronosüül-transferaasi isoensüümid või muud asjakohased ensüümid). Seda teavet võib kasutada, et hinnata mehhanismide liigilt liigile ülekandmise lubatavust.
57. Uuritava kemikaaliga seotud toksiko-kineetiliste muutuste hindamiseks tuleks kasutada sobilikke nõuetekohaselt valideeritud ja põhjendatud katse-eeskirju. Näidisuuringuprojekt hõlmab märgistamata uuritava kemikaaliga korduvdoosi manustamist, millele järgneb ühekordne radiomärgistatud doos 14. päeval või radiomärgistatud uuritava kemikaaliga korduvdoos ning proovide võtmine 1., 7. ja 14. päeval metaboliidiprofiilide kindlaksmääramiseks. Radiomärgistatud uuritava kemikaali dooside korduv manustamine võib anda teavet ka bioakumulatsiooni kohta (vt punkt 26).

## TÄIENDAVAD LÄHENEMISVIISID

58. Muud lähenemisviisid, mis täiendavad käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* katseid, võivad teatavate liikide puhul anda kasulikku teavet uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metaboliseerimise või organismist kõrvaldamise kohta.

***In vitro* teabe kasutamine**

59. Mítmeid uuritava kemikaali metaboliseerimise küsimusi on võimalik käsitleda *in vitro* uuringutes, kasutades asjakohaseid katsesüsteeme. Võimalike metaboliitide uurimiseks võib kasutada maksa subtsellulaarse tasandi osakesi (näiteks mikrosoome ja tsütosooli või S9-fraktsiooni) ja värskest eraldatud või kultuuris kasvatatud hepatotsüüte. Riskihindamisel võib huvi pakkuda lokaalne metaboliseerimine sihtorganismis, näiteks kopsus. Selleks otstarbeks võib olla kasulik sihtkoe mikrosoomide fraktsioon. Mikrosoomiuuringud võivad olla kasulikud võimalike sooliste ja vanuseliste erinevuste selgitamiseks ning aidata leida ensüümiparameetreid ( $K_m$  ja  $V_{max}$ ), mis võivad aidata hinnata metaboliseerimise sõltuvust doosist, arvestades kokkupuutetasemeid. Lisaks võivad mikrosoomiuuringud aidata määrata konkreetseid mikrosoomiensüüme, mis osalevad uuritava kemikaali metaboliseerimises ja mille mõju võib vahest oletada ka muude liikide puhul (vt ka punkt 56). Biotransformatsiooni induktsiooni võimalust võib samuti uurida, kasutades selliste loomade maksa subtsellulaarseid fraktsioone (näiteks mikrosoome ja tsütosooli), keda on eelnevalt töödeldud asjakohase uuritava kemikaaliga, tehes hepatotsüütide induktsiooni *in vitro* uuringuid või kasutades teatavaid rakuliine, milles sünteesitakse asjaomaseid ensüüme. Teatavatel asjaoludel ja sobivates tingimustes võib kaaluda inimkudedest pärinevate subtsellulaarsete fraktsioonide kasutamist biotransformatsiooni võimalike liigierinevuste kindlakstegemiseks. *In vitro* uuringud võivad olla kasulikud ka füsioloogial põhinevate toksikokineetika mudelite koostamiseks (5).

▼ **M4**

60. Nahakaudse imendumise *in vitro* uuringutest võib saada lisateavet imendumise iseloomustamiseks (6).
61. Samasuguste küsimuste lahendamiseks, milleks kasutatakse maksa mikrosoome, võib kasutada ka maksa primaarsete rakkude kultuure ja värske koe lõikeid. Mõnikord võib konkreetsele küsimusele vastuse leidmiseks kasutada rakuliini, mille puhul asjakohase ensüümi ekspressioon on tõendatud, või insenergeneetilist rakuliini. Mõnel juhul võib olla kasulik uurida *in vitro* konkreetsete tsütokroomi P450 isosüümide (näiteks CYP1A1, 2E1, 1A2 ja muud) ja/või II faasi ensüümide induktsiooni ja inhibeerimist lähteühendi poolt. Saadud teave võib olla kasulik samalaadse struktuuriga ühendite puhul.

**Mürgisusuuringute toksiko-kineetiliste andmete kasutamine lisateabena**

62. Muude mürgisuse uuringute käigus saadud vere, kudede ja/või väljaheidete proovide analüüsist võib saada andmeid biosaadavuse, plasma kontsentratsiooni ajast sõltuvuse (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC),  $C_{max}$ ), bioakumulatsiooni võimalikkuse, kliirensi kiiruse ning metaboliseerimise ja kineetika sooliste erinevuste või vanuseliste muutuste kohta.
63. Uuringu projekti kavandamist võib kasutada vastuste leidmiseks küsimustele, mis on seotud järgmisega: imendumise küllastumine, biotransformatsioon või väljutamise teed suuremate dooside korral; uute metaboliseerimisradade sisselülitumine suurematel doosidel ning mürgiste metaboliitide esinemine vaid suurematel doosidel.
64. Muud ohu hindamisega seotud küsimused võivad olla näiteks järgmised:
- tundlikkuse sõltuvus vanusest seoses hematoentsefaalse barjääri, neerude ja/või detoksifitseerimisvõime ealiste muutustega;
  - erinev tundlikkus alampopulatsioonides biotransformatsioonivõime või muude toksiko-kineetiliste erinevuste tõttu;
  - kokkupuute ulatus loote puhul, kuna kemikaal suudab läbida platsentat, või vastsündinu puhul, kuna kemikaal läheb rinnapiima sisse.

**Toksiko-kineetilise modelleerimise kasutamine**

65. Toksiko-kineetilised mudelid võivad olla kasulikud ohu ja riski hindamise erinevate tahkude jaoks, näiteks süsteemse kokkupuute ning koesise doosi ennustamine. Lisaks sellele võidakse käsitleda toimeviisiga seotud konkreetseid küsimusi ja need mudelid võivad olla aluseks andmete ekstrapoleerimisel muudele liikidele, kokkupuuteteede ja doseerimismustritele ning aidata hinnata inimest ohustavat riski. Uuritava kemikaali füsioloogial põhineva toksiko-kineetilise mudeli koostamiseks kasulikud andmed on iga liigi puhul järgmised: 1) jaotuskoefitsiendid, 2) biokeemilised konstandid ja füsioloogilised parameetrid, 3) manustamistest sõltuvad imendumise parameetrid ning 4) *in vivo* kineetilised andmed mudeli hindamiseks (näiteks asjakohaste (> 10 %) väljutamisteede kaudu organismist väljaviimise (kliirensi) parameetrid, metaboliseerimise  $K_m$  ja  $V_{max}$ ). Mudeli koostamisel kasutatakse katseandmed tuleks saada teaduslikult põhjendatud meetodeid kasutades ning mudeli tulemused tuleks valideerida. Sageli määratakse uuritava kemikaali ja liigipõhised parameetrid, näiteks imendumise kiirused, veres ja kudedes jaotumise ning metaboliseerimise kiiruse konstandid, et lihtsustada mittekompartmentaalsete või füsioloogial põhinevate mudelite koostamist (7).

▼ **M4****KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**

66. Uuringu protokoll soovitatakse varustada sisukorraga.

**Protokolli tekstiosa**

67. Protokolli tekstiosa peaks sisaldama kõnealuse katsemeetodiga hõlmatud teavet, mis on jaotatud osadesse ja lõikudesse järgmiselt.

*Kokkuvõte*

68. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringuprojekti ülevaadet ja kasutatud meetodide kirjeldust. Selles tuleks samuti tuua esile peamised tulemused, mis on seotud massibilansi, metaboliitide laadi ja olulisuse, kudedes olevate jääkide, kliirensi kiirusega, bioakumulatsiooni võimalikkuse, sooliste erinevustega jne. Ülevaade tuleks esitada piisavalt üksikasjalikult, et uuringu tulemusi oleks võimalik hinnata.

*Sissejuhatus*

69. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringu eesmärke, põhjendust ja kava ning asjakohaseid viiteid ja taustteavet.

*Materjalid ja meetodid*

70. Selles uuringuprotokolli osas tuleks esitada kogu asjakohase teabe üksikasjalik kirjeldus, mis hõlmab järgmist.

## a) Uuritav kemikaal

Selles jaotises tuleks esitada uuritava kemikaali tunnusandmed: keemiline nimetus, molekuli struktuur, keemilise koostise kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine, keemiline puhtus ja võimaluse korral lisandite tüüp ja kogused. Samuti esitatakse teave füüsikaliste ja keemiliste omaduste kohta, sh füüsikaline olek, värvus, lahustuvus ja/või jaotuskoeffitsient, stabiilsus ja vajaduse korral söövitav toime. Kui see on kohaldatav, tuleks esitada isomeere käsitlev teave. Radiomärgistatud uuritava kemikaali kohta tuleks selles jaotises esitada järgmine teave: radionukliidi tüüp, märgise asukoht, eriaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

Tuleks esitada kandeaine, lahendusvedeliku, suspendeerimisvahendi ja emulgaatori või muude uuritava kemikaali manustamisel kasutatavate materjalide tüüp või kirjeldus.

## b) Katseloomad

Selles jaotises peaks olema teave katseloomade, sh nende valimise kohta; tuleks põhjendada, miks valiti konkreetne liik, liin ja loomade vanus uuringu alguses, sugu, ning esitada andmed kehakaalu, tervisliku seisundi ja loomade pidamise tingimuste kohta.

## c) Meetodid

See jaotis peaks sisaldama andmeid uuringu kava ja kasutatud meetodi kohta. Tuleks kirjeldada järgmist:

- 1) kokkupuutete ja -tingimuste kõigi muutuste põhjendus, kui see on kohaldatav;

▼ **M4**

- 2) doositasemete valiku põhjendus;
- 3) põhiuuringu eksperimentaalse osa kavandamiseks tehtud prooviuuringute kirjeldus, kui see on kohaldatav. Tuleks esitada prooviuuringu alusandmed;
- 4) kuidas valmistati doseerimislahus ning lahusti või kandeaine tüüp, kui seda kasutati;
- 5) katserühmade arv ja loomade arv rühmas;
- 6) doositasemed ja kogus (ning doosi eriaktiivsus, kui kasutati radioaktiivset märgist);
- 7) manustamistee(d) ja -meetodid;
- 8) manustamise sagedus;
- 9) näljutamise ajavahemik (kui loomi näljutati);
- 10) summaarne radioaktiivsus looma kohta;
- 11) loomade kohtlemine;
- 12) proovide kogumine ja ettevalmistamine;
- 13) metaboliitide eraldamiseks, koguse määramiseks ja kindlaksteigmiseks kasutatud analüüsimeetodid;
- 14) kasutatud meetoditega tuvastamise piir;
- 15) muud kasutatud eksperimentaalsed mõõtmised ja protseduurid (sh metaboliitide analüüsi meetodite valideerimine).

## d) Statistiline analüüs

Kui uuringutulemuste analüüsimiseks kasutati statistilist analüüsi, tuleks lisada piisav teave kasutatud analüüsimeetodi ja arvutiprogrammi kohta, et sõltumatu hindaja või statistik saaks analüüsi uuesti hinnata ja rekonstrueerida.

Kui tehakse süsteemi modelleerimise uuringuid, nagu füsioloogial põhineva toksikokineetika mudeli uuring, tuleks mudel esitada koos täieliku kirjeldusega, et mudelit saaks sõltumatult rekonstrueerida ja valideerida (vt punkt 65 ja liide „Mõisted”).

*Tulemused*

71. Kõik andmed tuleks esitada tabelites koos asjakohase statistilise töötusega, andmete kokkuvõtte tuleks esitada kõnealuse jaotise tekstiosas. Uuringu jaoks asjakohasel viisil tuleks esitada radioaktiivsuse loendusandmete kokkuvõtte; üldiselt esitatakse andmed mikro- või milligrammekvivalentidena proovi massiühiku kohta, kuid võib kasutada ka muid ühikuid. Selles jaotises tuleks tulemused esitada graafiliselt, lisada tüüpilised kromatograafia ja spektrometria graafilised andmed, metaboliitide tuvastamise ja kvantitatiivse määramise graafikud, oletatavad metaboliseerimisteed, sh metaboliitide molekulaarne struktuur. Kõnealuses jaotises esitatakse veel järgmine teave, kui see on kohaldatav:

- 1) radioaktiivsuse kogus ja taasleitud radioaktiivsuse protsent uriinis, fekaalides, väljahingatud õhus ning uriini ja fekaale sisaldavas puuriloputusvedelikus.

— Nahakaudse uuringu puhul tuleks samuti lisada andmed manustamiskoha nahast ja nahaloputusest uuritava kemikaali taasleidmise kohta ning jääradioaktiivsuse kohta nahka katnud seadmetes ja metaboliseerimise uurimise üksuses ning samuti nahaloputusuuringu tulemused. Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punktid 74–77.



▼ **M4**

- Inhalatsiooniuringute puhul lisage samuti andmed uuritava kemikaali taasleidmise kohta kopsudes ja nina kudedes (8). Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punkt 78;
- 2) jaotus kudedes protsendina manustatud doosist ja kontsentratsioonina (mikrogramm-ekvivalente koe grammi kohta) ning koes ja veres leiduva kemikaali või koes ja plasmas leiduva kemikaali suhtena;
- 3) materjalibilanss, mis on arvatud igast uuringust, mis hõlmab kehakudedes ja väljaheidetes analüüsimist;
- 4) plasmakontsentratsioonid ja toksiko-kineetilised parameetrid (biosaadavus, plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC), C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, kliirens, poolestusaeg) pärast asjakohas(t)e kokkupuutete(de) kaudu manustamist;
- 5) uuritava kemikaali imendumise kiirus ja ulatus pärast asjakohas(t)e kokkupuutete(de) kaudu manustamist;
- 6) väljaheidetest kogutud uuritava kemikaali ja metaboliitide kogused (väljendatuna manustatud doosi protsendina);
- 7) viide liite andmetele, mis sisaldavad kõiki mõõdetud näitajate andmeid iga üksiku looma kohta (näiteks doosi manustamine, taasleitud koguse protsent, kontsentratsioonid, toksiko-kineetilised parameetrid jne);
- 8) väljapakutud metaboliseerimisteede joonis ning metaboliidimolekulide struktuurid.

*Arutelu ja järeldused*

72. Selles jaotises peaks(id) autor(id)
  - 1) esitama uuritava kemikaali metaboliseerimisteede, toetudes metaboliseerimise ja organismist kõrvaldamise tulemustele;
  - 2) käsitlema uuritava kemikaali organismist kõrvaldamise ja/või biotransformatsiooni kõiki võimalikke liikide- ja sugudevahelisi erinevusi;
  - 3) esitama tabelina andmed metaboliitide tuvastamise ja koguste, kliirensi ja bioakumulatsiooni võimalikkuse kohta, lähteaine ja/või metaboliidi/metaboliitide jääkide taseme kohta kudedes ning toksikokineetika parameetrite võimaliku doosist sõltuva muutumise kohta, nagu on asjakohane, ja arutama kõike nimetatut;
  - 4) lisama kõnealusesse jaotisesse kõik asjakohased mürgisuse uuringutest saadud toksiko-kineetilised andmed;
  - 5) esitama lühikese järelduse, mida toetavad kõnealuse uuringu tulemused;
  - 6) lisama jaotisi (kui see on vajalik või asjakohane).
73. Kirjanduse andmete, tabelite, jooniste, liidete jne lisamiseks tuleks kasutada täiendavaid jaotisi.

▼ **M4**

## ALTERNATIIVSED KOKKUPUUTETEEDE

**Nahakaudne***Nahakaudne töötlemine*

74. Selles jaotises esitatakse üksikasjalik teave uuritava kemikaali toksikokineetika uurimise kohta nahakaudse kokkupuute korral. Nahakaudse imendumise kohta tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.44 („Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod” (9)). Muude näitajate puhul, näiteks jaotumine ja metaboliseerimine, võib kasutada käesolevat katsemeetodit B.36. Nahakaudsel töötlemisel tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte või enamat doositaset. Uuritav kemikaal (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peaks olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aeseaine). Doositase(med) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Asjaolud, mida võiks nahakaudse doosi valimisel arvesse võtta, on eeldatav inimeste kokkupuude ja/või doosid, mille juures muudes nahakaudsete mürgisuse uuringutes täheldati mürgisust. Nahakaudne (nahakaudsed) doos(id) tuleks vajaduse korral lahustada sobivas kandeaines ning peale kanda mahus, mis on piisav doosi manustamiseks. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Võib kasutada raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleks vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Uuritava kemikaali manustamiseks tuleks paljastada ligikaudu 10 % keha pinnast. Väga toksilise aine puhul võib kasutada väiksemat nahapinda kui ligikaudu 10 %, kuid võimalikult suur osa alast tuleks katta õhukese ja ühtlase kihiga. Kõigi nahakaudse kokkupuute katserühmade puhul tuleks kasutada sama töötlemise pindala. Doosiga kaetud alasid tuleb kaitsta sobiva kattega, mis kinnitatakse paigale. Loomi tuleks pidada eraldi.
75. Tuleks teha naha pesemise uuring, et hinnata pealekantud uuritava kemikaali kogust, mida on võimalik töödeldud nahalt pehmetoimelise seebi ja veega pesemise teel eemaldada. Uuritava kemikaali nahakaudse manustamise korral võib kõnealune uuring aidata koostada ka massibilanssi. Kõnealuse naha pesemise uuringu jaoks tuleks kahele loomale kanda peale üks doos uuritavat kemikaali. Doositase valitakse vastavalt käesoleva katsemeetodi punktile 23 (vt ka nahaga kokkupuute aja käsitlus, punkt 76). Pesemisel maha tulevad uuritava kemikaali kogused tuleks määrata, et hinnata, kui tõhus on uuritava kemikaali eemaldamine pesemise teel.
76. Uuritav kemikaal tuleks kanda nahale ja hoida seda nahal vähemalt kuus tundi, kui seda ei välista kemikaali söövitav toime. Pärast katte eemaldamist tuleks töödeldud pinda pesta, järgides naha pesemise uuringu jaoks kirjeldatud korda (vt punkt 75). Nii katet kui ka pesuvedelikku tuleks analüüsida uuritava kemikaali jääkide kindlakstegemiseks. Uuringu lõpus tuleks iga loom kooskõlas punktiga 2 humaansel viisil surmata ja töödeldud nahk tuleks eemaldada. Töödeldud naha asjakohast osa tuleks analüüsida, et määrata kindlaks uuritava kemikaali jäägid (radioaktiivsus).
77. Ravimite toksiko-kineetiliseks hindamiseks võivad vajalikud olla erinevad protseduurid kooskõlas asjakohase õigusraamistikuga.

▼ **M4****Hingamisteede kaudu**

78. Tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte kontsentratsiooni (või vajaduse korral mitut kontsentratsiooni). Kontsentratsioon(id) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Sissehingamise teel manustamine tehakse nn ninakoonuse või ainult peaseadme abil, et vältida imendumist muude kokkupuuteteede kaudu (8). Kui kasutatakse muid sissehingamise teel toimuva kokkupuute tingimusi, tuleks tingimuste muutmine dokumenteerida. Sissehingamise teel toimuva kokkupuute kestus tuleks kindlaks määrata; tavaline kokkupuuteaeg on 4–6 tundi.

**KIRJANDUS**

- 1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- 2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- 3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J Pharm and Tox Methods* 46: 73–81.
- 4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25–40.
- 5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400–411.
- 6) Käesoleva lisa peatükk B.45 „Nahakaudne imendumine: *in vitro* meetod”.
- 7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 9) Käesoleva lisa peatükk B.44 „Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod”.
- 10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- 11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼ **M4***Liide***MÕISTED**

**ADME** – lühend sõnadest *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion* (imendumine, jaotumine, metaboliseerimine ja väljutamine).

**Akumulatsioon** (bioakumulatsioon) – uuritava kemikaali koguse suurenemine aja jooksul kudedes (tavaliselt rasvkoes, korduva kokkupuute korral); kui uuritava kemikaali kehasse sisenemise kiirus on suurem kui kehast väljaviimise kiirus, siis organism akumuleerib uuritavat kemikaali ja võib tekkida uuritava kemikaali toksiline kontsentratsioon.

**Analoogmeetod** – ühe või enama kemikaali näitajaid käsitleva teabe kasutamine sihtkemikaali näitajate prognoosimiseks.

**AUC** (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala) – plasmas oleva uuritava aine kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala. See vastab eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul kehasse imendunud uuritava kemikaali üldkogusele. Lineaarsetes tingimustes on AUC (aja nullpunktist lõpmatuseni) võrdelises sõltuvuses kehasse imendunud uuritava kemikaali summaarsest kogusest, olenemata imendumise kiirusest.

**Autoradiograafia** (kogu keha autoradiograafia) – seda kasutatakse koes radioaktiivse uuritava kemikaali asukoha kvalitatiivseks ja/või kvantitatiivseks kindlaksmääramiseks; selle meetodi puhul kasutatakse röntgenfilmi või viimasel ajal digitaalset fosforkujutisi, et visualiseerida radioaktiivselt märgistatud molekule või molekulioosi, salvestades uuritava objekti kiiratud radioaktiivsuse. Kvantitatiivsel kogu keha autoradiograafial võivad uuritava kemikaali jaotumise hindamisel ning kudedes radioaktiivse aine taasleitumise üldkoguse ja lahutusvõime hindamisel olla mõned eelised võrreldes organite lahkamisega. Üks oluline eelis näiteks on võimalus kasutada seda pigmenteeritud loomamudeli puhul, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku sidumist melaniiniga, mis võib teatavaid molekule siduda. Kuigi see meetod võib suure mahu ja vähesel afiinsusega sidumiskohtadest kogu kehas ülevaate saamiseks olla kasulik, võib meetod olla piiratud konkreetsete sihtobjektide tuvastamisega, näiteks retseptorsidumiskohdade tuvastamisega, mille puhul tuvastamiseks on vaja suhteliselt suurt eraldusvõimet ja tundlikkust. Kui kasutatakse autoradiograafiat, tuleks manustatud ühendi massibilansi määramiseks kavandatud katsed teha eraldi rühmas või eraldi uuringuna kudedes jaotumise katsest, kus kõik väljaheited (mis võivad samuti hõlmata väljahingatud õhku) ja terved korjused homogeneeritakse ja neid analüüsitakse vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil.

**Bioakumulatsioon** – vaata „akumulatsioon“.

**Biopüsivus** – vt „püsivus“.

**Biosaadavus** – manustatud doosi osa, mis jõuab süsteemsesse ringlusse või mis on füsioloogilise aktiivsuse kohas kättesaadav. Tavaliselt viitab uuritava kemikaali biosaadavus lähteühendile, kuid see võib viidata ka lähteühendi metaboliidile. Tege mist on ainult ühe keemilise vormiga. *Tähelepanu!* Biosaadavus ei ole sama, mis imendumine. Erinevus näiteks suukaudse imendumise (s.o olemasolu soolestiku seintes ja portaalringes) ja biosaadavuse (s.o olemasolu üldises vereringes ja kudedes) vahel võib muude tegurite hulgas (10) tekkida sellest, et soolte seinad metaboliseerivad (lagundavad) kemikaali, et kemikaal liigub väljavoolutranspordiga tagasi soolevalendikku või et kemikaal metaboliseeritakse maksas enne üldisse vereringesse sattumist. Mürgise komponendi (lähteühend või metaboliit) biosaadavus on inimest ohustava riski hindamisel ülioluline näitaja (suurelt väikesele doosile ekstrapoleerimine, ühelt kokkupuuteviisilt teisele ekstrapoleerimine), mida kasutatakse

▼ **M4**

välise täheldatava kahjuliku toimetä doosi või võrdlusdoosi (kasutatud doos) alusel sisemise väärtuse tuletamiseks. Maksa mõju uurimiseks suukaudsel manustamisel piisab suukaudsest imendumisest. Kõigi muude mõjude puhul peale sisenemistee mõju on bioaadavus üldiselt usaldusväärsem näitaja edasises riskihindamises kasutamiseks kui imendumine.

**Biotransformatsioon** – asjakohase uuritava kemikaali (tavaliselt ensüümide toimet) keemiline muundamine kehas teiseks kemikaaliks. Sünonüümne metaboliseerimisega.

$C_{\max}$  – kas maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasma/seerum) pärast manustamist või maksimaalne (tipp)kontsentratsioon väljutamisel (uriinis või fekaalides) pärast manustamist.

**Detoksifitseerimise teed** – etapid, mis viivad mürgiste kemikaalide kehast kõrvaldamisele kas metaboliseerimise või väljutamise teel.

**Eksogeenselt** – manustatud väljastpoolt organismi või süsteemi, tekkinud väljastpoolt organismi või süsteemi.

**Ekstrapoleerimine** – ühe või enama tundmatu väärtuse tuletamine selle alusel, mis on juba teada või mida on täheldatud.

**Ensüümide parameetrid** –  $K_m$ : Michaelise konstant ning  $V_{\max}$ : maksimumkiirus.

**Ensüümid/isosüümid** – valgud, mis toimivad keemiliste reaktsioonide katalüsaatoritena. Isosüümid on ensüümid, mis katalüüsivad samalaadseid keemilisi reaktsioone, kuid mille aminohapete järjestus on erinev.

**Imendumine** – protsess(id), mille kaudu kemikaal tungib kudedesse või läbi kudede. Imendumisel peetakse silmas lähteühendit ja selle kõiki metaboliite. Seda ei tohiks segi ajada bioaadavusega.

**Induktsioon / ensüümi induktsioon** – ensüümi süntees keskkonnastiimuli või esilekutsuva molekuli tõttu.

**Jaotumine** – uuritava kemikaali ja selle derivaatide hajumine organismis.

**Jaotumine kudedes** – uuritava kemikaali pöörduv liikumine ühest asukohast kehas teise. Jaotumist kudedes on võimalik uurida organite lahkamise, homogeenimise, põletamise ja vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil või kvalitatiivse ja/või kvantitatiivse kogu keha autoradiograafia abil. Esimene nimetatud meetod võimaldab leida kudedes ja sama looma korjusejääkides kontsentratsiooni ning sealt taasleidmise protsendi, kuid selle eraldusvõime ei pruugi olla piisav kõigi kudede jaoks ning summaarse taasleidmise jaoks (< 90 %) ei pruugi see parim lahendus olla. Vt summaarse taasleidmise selgitus eespool.

**Jaotuskoefitsient** – see näitaja iseloomustab kemikaali erinevat lahustuvust kahes lahustis.

**Kliirens** – selle kiiruse kvantitatiivne näitaja, millega uuritav kemikaal verest, plasmast või teatavast koest ajaühiku kohta kõrvaldatakse.

**Kompartment** – keha, koe või raku struktuurne või biokeemiline osa (või üksus), mis asub ülejäänust eraldi.

**Küllastatus** – seisund, milles üks või mitu kineetilist protsessi (näiteks imendumine, metaboliseerimine või kliirens) on maksimumis („küllastatud“).

**Lineaarsus / lineaarne kineetika** – protsessi kineetika on lineaarne, kui kõik kompartmentidevahelise ülekande kiirused on võrdelised olemasoleva koguse või kontsentratsiooniga, s.o esimest järku. Sel juhul on uuritava kemikaali kliirensi ja jaotunud kogused, samuti poolestusajad, konstantsed. Saavutatud kontsentratsioonid on võrdelised annustamise määraga (kokkupuutega) ja akumulatsioon on kergemini ennustatav. Lineaarsust/mittelineaarsust on võimalik hinnata, kui võrreldakse omavahel asjakohaseid parameetreid, näiteks uuritava aine kontsentratsiooni plasmast ja plasmast oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alust pindala (AUC) pärast erinevaid doose või pärast ühekordset ja korduvat kokkupuudet. Doosist sõltuvuse puudumine võib viidata ühendi metaboliseerimises osalevate ensüümide küllastatusele; plasmast oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) suurenemine pärast korduvat kokkupuudet, võrreldes ühekordse kokkupuutega, võib viidata metaboliseerimise inhibeerimisele ning plasmast oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) vähenemine võib viidata metaboliseerimise induktsioonile (vt ka punkt 11).

▼ **M4**

**Manustamistee** (suukaudne, intravenoosne, nahakaudne, sissehingamine jne) – viitab viisile, kuidas kemikaali kehasse manustatakse (näiteks suukaudselt sündsöötmisega, suukaudselt söödaga, nahakaudselt, sissehingamise teel, intravenooselt jne).

**Massibilanss** – uuritava kemikaali süsteemi sisenemise ja sealst väljumise arvestus.

**Materjalibilanss** – vt „massibilanss“.

**Metaboliidid** – metaboliseerimise või metaboliseerimisprotsesside saadused.

**Metaboliseerimine** – sünonüümne „biotransformatsiooniga“.

**Mudelite valideerimine** – protsess, millega hinnatakse mudeli sobivust olemasolevate toksiko-koneetiliste andmete järjepidevaks kirjeldamiseks. Mudelid võib hinnata sel viisil, et mudeli prognoose võrreldakse statistiliselt ja visuaalselt katses saadud väärtustega ühise sõltumatu näitaja (näiteks aja) eri väärtuste juures. Hindamise ulatust tuleks mudeli kavandatava kasutusvaldkonna alusel põhjendada.

**Mürgisuse (toimeviisi) mehhanism / toimemehhanism (toimeviisi)** – toimemehhanism viitab konkreetsetele biokeemilistele mõjudele, mille kaudu tekib uuritava kemikaali mõju. Toimeviisi viitab üldisematele teedele, mis põhjustavad uuritava kemikaali mürgisuse.

**Poolestusaeg ( $t_{1/2}$ )** – aeg, mille jooksul uuritava kemikaali kontsentratsioon väheneb kompartendis poole võrra. Tavaliselt peetakse silmas uuritava kemikaali kontsentratsiooni plasmas või kogust kogu kehas.

**Püsivus (biopüsivus)** – kemikaali pikaajaline olemasolu (bioloogilises süsteemis) lagunemisele/kõrvaldamisele vastupidavuse tõttu.

**Retseptori mikroskoopne autoradiograafia** (või retseptori mikroautoradiograafia) – seda meetodit võib kasutada selleks, et uurida ksenobiootikumide sidumist konkreetsete koelementide või rakupopulatsioonide poolt näiteks retseptorite sidumise või konkreetse toimeviisi uuringutes, mis võivad nõuda suurt eraldusvõimet ja suurt tundlikkust, mis ei pruugi olla saavutatavad muu meetodi, näiteks kogu keha autoradiograafia puhul.

**Sapieritus** – eritumine sapijuhade kaudu.

**Sihtkude** – kude, milles avaldub mürgise aine peamine kahjulik mõju.

**Suukaudne imendumine** – manustatud uuritava kemikaali doosi manustamise kohast (näiteks seedetraktist) imendumise protsent. Seda üliolulist parameetrit saab kasutada selleks, et määrata manustatud uuritava kemikaali osa, mis jõuab portaalveeni ja seejärel maksa.

**Süsteemide modelleerimine** (füsioloogial põhinev toksikokineetika, farmakokineetikal põhinev, füsioloogial põhinev farmakokineetika, bioloogial põhinev jne) – abstraktne mudel, milles süsteemi käitumist kirjeldatakse matemaatilisel.

$T_{max}$  –  $C_{max}$ -i saavutamiseks vajalik aeg.

**Toksikokineetika** (farmakokineetika) – kemikaalide imendumise, jaotumise, metaboliseerimise ja väljutamise ajast sõltuvuse uurimine.

**▼ M4**

**Tundlikkus** – meetodi või mõõtevahendi suutlikkus eristada mõõdetavaid signaale, mis vastavad huvipakkuva muutuja erinevale sisaldusele.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Vere (plasma/seerumi) maksimaalsed tasemed** – maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasmas/seerumis) pärast manustamist (vt ka „ $C_{max}$ ”).

**Veres (plasmas) oleva kontsentratsiooni statsionaarne olek** – avatud süsteemi mittetasakaaluline olek, mille puhul kõik süsteemile avalduvad mõjud on täpselt tasakaalustatud vastupidiste mõjude poolt selliselt, et kõigi selle komponentide kontsentratsioon on püsiv, kuigi ained voolavad läbi süsteemi.

**Väljutamine** – protsess(id), millega manustatud uuritav kemikaal ja/või selle metaboliidid kehast kõrvaldatakse.

**▼B****B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD  
VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT  
KOKKUPUUTUMIST****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uuringutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uurimisobjektideks.

Viivistoimega polüneuropaatiat põhjustada võivate ainete tuvastamiseks tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neurotoksiline.

Vt B osa üldist sissejuhatust.

**1.2. MÕISTED**

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosforamidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioamidohapete tioestrid või anhüdriide, mis võivad põhjustada selle aineklassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoes neuropaatia sihtesteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Võrdlusaineid võib uurida positiivse võrdlusrühmaga tõestamiseks, et uuritava liigi vastus ei ole laboratoorsetel katsetingimustel märkimisväärselt muutunud.

Üks näide laialdaselt kasutatud neurotoksilisest aineist on tri-*o*-tolüül-3-fosfaat (CASi nr 78-30-8, EINECSi nr 201-103-5, CASi nomenklatuur: fosforhape, tris(2-metüülfenüül)ester), samuti tuntud kui tris-*o*-kresüülfosfaat.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Uuritav aine manustatakse suu kaudu ühekordse doosina kanadele, keda on vajaduse korral kaitstud ägedate kolinergiliste mõjude eest. Loomi vaadeldakse käitumuslike kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 21 päeva. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtesteraasi pidurdamine (NTE), tehakse tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast doosi andmist igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel. 21 päeva pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning seejärel viiakse läbi valitud närvikude histopatoloogiline uuring.



**▼B**

## 1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.5.1. Ettevalmistused

Noored terved täiskasvanud kanad, kellel ei esine takistavaid viirus-haigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse printsiibil katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, et kanad saaksid vabalt liikuda ja et neid saaks kergesti vaadelda.

Uuritav aine tuleks tavaliselt manustada sondi, želatiinikapslite või mõne samaväärse meetodi abil suu kaudu. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

## 1.5.2. Katsetingimused

## 1.5.2.1. Katseloomad

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud munakanu (*Gallus gallus domesticus*). Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

## 1.5.2.2. Arv ja sugu

Lisaks katserühmale tuleks kasutada nii võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, kui ka positiivset võrdlusrühma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 21 päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiuuringu läbiviimiseks.

Positiivset võrdlusrühma võib uurida samaaegselt või hilisema võrdlusrühmana. Positiivses võrdlusrühmas peaks olema vähemalt kuus kana, kellele on manustatud tuntud viivistoimega neurotoksiilist ainet, kolme kana puhul tehakse biokeemiline uuring ja kolmel kanal patoloogiline uuring. Varasemaid andmeid tuleks korrapäraselt ajakohastada. Uued positiivse võrdlusrühma andmed on vajalikud siis, kui katset tegev laboratoorium on mõnda katse tegemiseks olulist elementi (aretusliin, toit, pidamistingimused) muutnud.

**▼B**

## 1.5.2.3. Annused

Põhiuuringus kasutatav doositase tuleb määrata kindlaks eeluuringus, milles kasutatakse asjakohasel arvul kanu ja doositasemehümasid. Selleks et määrata kindlaks piisav doos põhiuuringu jaoks, peab eeluuringus tavaliselt mõni lind surema. Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib siiski kasutada atropiini või mõnda teist uuritavat ainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone. Uuritava aine mittesurmava maksimaalse doosi (vt meetod B.1a) määramiseks võib kasutada erinevaid uurimismeetodeid. Doosi valikul võib abi olla varasematest andmetest või muust toksikoloogilisest teabest.

Uuritava aine doositase peaks põhiuuringus olema võimalikult kõrge, võttes võimaluse korral arvesse doosivaliku eeluuringu tulemusi ja ülemist piirdoosi 2 000 mg kehakaalu kg kohta. Suremus ei tohiks olla nii suur, et see takistaks 21. päeval allesjäävate loomadega läbi viia biokeemilist uuringut (kuus katselooma) ja histoloogilist uuringut (kuus katselooma). Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib kasutada atropiini või mõnda teist kaitseainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone.

## 1.5.2.4. Piirsalduskatse

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 2 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Läbi võib viia piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

## 1.5.3. Vaatlusperiood

Vaatlusperiood peaks olema 21 päeva.

## 1.5.4. Katse käik

Pärast kaitseaine manustamist ägedast kolinergilisest toimest tuleneva surma vältimiseks manustatakse uuritav aine ühekordse doosina.

## Üldine vaatlus

Vaatlused peaksid algama kohe pärast kokkupuudet. Kõiki kanu tuleks esimese kahe päeva jooksul mitu korda hoolikalt vaadelda ning seejärel 21 päeva jooksul või kuni kavandatud tapmiseni vähemalt kord päevas. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnemise aeg, liik, raskusaste ja käitumuslike kõrvalekallete kestus. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset, ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Patoloogilise uuringu jaoks välja valitud kanu tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamise hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad ja loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humansest ja lahatakse.

**▼B****Kehakaal**

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine manustamist ning seejärel vähemalt kord nädalas.

**Biokeemia**

Kuus juhuslikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, ja kolm kana positiivsest võrdlusrühmast (kui katse viiakse läbi samaaegselt) tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajast ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks neuropaatia sihtesteraasi pidurdamisaktiivsuseks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude. Tavaliselt tapetakse 24 ja 48 tunni pärast kolm võrdlusrühma ja iga katserühma lindu ning 24 tunni pärast tuleks tappa ka kolm positiivsesse võrdlusrühma kuuluvat lindu. Kui toksilise kliiniliste märkide vaatlus (mida on võimalik hinnata kolinergiliste märkide ilmnemise aja vaatlemisel) viitab toksilise aine eriti aeglasele kõrvaldamisele, on soovitatav võtta kahel erineval ajahetkel 24–72 tunni jooksul pärast manustamist kolmelt linnult koeproov.

Vajaduse korral võib nende proovidega teha ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt *in vivo* reaktiiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

**Täielik lahang**

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsatud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

**Histopatoloogiline uuring**

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada perfusiooni abil kohapeal. Lõiked tuleks võtta väikeajust (keskmiselt pikitasandilt), piklikajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaalosalast ja lumbosakraalosalast. Tuleks võtta lõiked ka tibialnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonispetsiifiliste ainetega.

2.

**ANDMED**

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tava-päraselt täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

**▼B**

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse- või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

### 3. **ARUANDLUS**

#### KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet

#### 3.1. Katseloomad:

- kasutatud aretusliin;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.

#### 3.2. Katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad; vajaduse korral;
- vehiikeli valiku põhjendus;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- doosi valimise põhjendused;
- manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;
- võimalike kaitseainete identifitseerimine ja nende manustamise üksikasjad.

#### 3.3. Tulemused:

- kehakaalu andmed;
- toksilise reaktsiooni andmed vastavalt rühmale, sealhulgas suremus;
- kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
- biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;
- lahkamise tulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

### 4. **VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 418.

**▼B****B.38. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVIS-  
TOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE KORDUSDOOSI  
URING****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uuringutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uurimisobjektideks.

Nende ainete tuvastamiseks, mis võivad põhjustada viivistoimega polüneuropaatiat, tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neurotoksiline.

Käesolev 28päevane viivistoimega neurotoksilisuse katse annab teavet võimalike ohtude kohta tervisele, mis võivad tõenäoliselt tuleneda korduvatest kokkupuudetest piiratud ajavahemiku jooksul. Nimetatud uuringuga saab teavet doosireaktsiooni kohta ning selle abil on võimalik hinnata täheldatava kahjuliku toimeta doosi taset, mis aitaks määrata kokkupuute ohutuskriteeriumeid.

Vt samuti B osa üldist sissejuhatust.

**1.2. MÕISTED**

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosforamidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioamidohapete tioestreid või anhüdriide, mis võivad põhjustada selle aineklassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoes neuropaatia sihtteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

**1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Uuritava aine päevaseid doose manustatakse kanadele suu kaudu 28 päeva jooksul. Loomi vaadeldakse vähemalt kord päevas käitumuslike kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 14 päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtteraasi pidurdamine (NTE), tehakse igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast viimase doosi andmist. Kaks nädalat pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning viiakse läbi valitud närvikude histopatoloogiline uuring.

**▼B**

## 1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Ettevalmistused

Noortel tervetel täiskasvanud kanadel, kellel ei esine takistavaid viirushaigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse põhimõtte alusel katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, võimaldades kanadel vabalt liikuda ja neid kergesti vaadelda.

Doosid tuleks manustada suu kaudu seitsmel päeval nädalas ning eelistatult sondi või želatiinikapslite abil. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

## 1.4.2. Katsetingimused

## 1.4.2.1. Katseloomad

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud munakanu (*Gallus gallus domesticus*). Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

## 1.4.2.2. Arv ja sugu

Üldiselt tuleks kasutada kolme katserühma ja ühte vehiikeli võrdlusrühma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu selleks, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 14päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiuuringu tegemiseks.

## 1.4.2.3. Annused

Annuste valimisel tuleks arvesse võtta kolme viivistoimega neurotoksilisuse ägeda toksilisuse katse tulemusi ja teisi uuritava ühendi toksilisi või kineetilisi andmeid. Tuleks valida kõrgeim doositase, mille eesmärgiks oleks toksilise toime esilekutsumine, eelistatult viivistoimega neurotoksilisus, kuid vältida tuleks doositaset, mis kutsub esile surma või tõsised kannatused. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed doosist tuleneva reaktsiooni ja madalaimal doositasemel täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) demonstreerimiseks.

**▼B**

## 1.4.2.4. Piirsalduskatse

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 1 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Teha võib piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese eeldatav kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

## 1.4.2.5. Vaatlusperiood

Kõiki loomi tuleks kokkupuuteperioodi ajal vaadelda vähemalt kord päevas ja pärast seda 14 päeva jooksul kuni kavandatava lahkamiseni.

## 1.4.3. Katse käik

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 28 päeva jooksul.

*Üldised märkused*

Vaatlused peaksid algama kohe pärast katse algust. Kõiki kanu tuleks põhjalikult vaadelda 28päevase katseaja jooksul vähemalt kord päevas ja seejärel 14 päeva jooksul pärast manustamist või kuni kavandatava tapmiseni. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnemise aeg, liik, raskusaste ja kestus. Vaatluste käigus tuleks vaadelda lisaks muule kõrvalekaldeid käitumises. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Kanad tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamise hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humaanselt ja lahatakse.

*Kehakaal*

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine esmakordset manustamist ning seejärel iga nädala järel.

*Biokeemia*

Kuus juhuslikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajust ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Tavaliselt tapetakse kolm võrdlusrühma ja katserühma kuuluvat lindu 24 tunni pärast ja kolm lindu pärast viimase doosi manustamist. Kui ägeda toksilisuse uuringute või muude uuringute (nt toksikokineetika) andmed osutavad sellele, et loomade tapmine peaks toimuma muul ajal kui pärast viimase doosi andmist, tuleks neid aegu järgida ning põhjendused dokumenteerida.

Vajaduse korral võib nende proovidega läbi viia ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt *in vivo* reaktiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

**▼B***Täielik lahang*

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsatud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

*Histopatoloogiline uuring*

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada kohapeal perfusiooni abil. Lõiked tuleks võtta väikeajast (keskmiselt pikitasandilt), piklikajast, seljaajast ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaalosast ja lumbosakraalosast. Tuleks võtta lõiked ka tibiaalnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonispetsiifiliste ainetega. Alguses tuleks kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud kudesid mikroskoopiliselt uurida. Kui kõrge doosiga rühmade puhul on toime kohta tõendid olemas, tuleks mikroskoopiline uuring viia läbi ka keskmise ja madala doosiga rühmade puhul.

**2. ANDMED**

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tavapäraselt täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

**3. ARUANDLUS****KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

Katseloomad:

- kasutatud aretusliin;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.



**▼B**

## Katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad, kui see on asjakohane;
- vehiikeli valiku põhjendus;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- doosi valimise põhjendused;
- manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;
- teiste biokeemiliste määramiste aegade valimise põhjendus, kui selleks ei ole 24 või 48 tundi.

## Tulemused:

- kehakaalu andmed;
- toksilise reaktsiooni andmed vastavalt doositasemele, sealhulgas suremus;
- täheldatava kahjuliku toimeta doos;
- kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
- biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;
- lahkamise tulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste üle arutlemine.

Järeldused.

4.

**VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 419.

**▼ B**

**B.39. PLAAIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE  
MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO***

**▼ M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide toksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼M8

**B.40. IN VITRO NAHASÖÖVITUS: TRANSKUTAANSE  
ELEKTRITAKISTUSE (TET) MÕÖTMISEL PÕHINEV  
KATSEMEETOD**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 430 (2015). Nahasöövituse all mõistetakse läbi marrasknaha pärisnahani ulatuva nähtava nekroosina avalduva pöördumatu nahakahjustuse tekkimist pärast uuritava kemikaaliga töötlemist, nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) (1) ning Euroopa Liidu (EL) määruses nr 1272/2008, milles käsitletakse ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“) (1). Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.40 näol on tegemist *in vitro* meetodiga, mis võimaldab tuvastada mittesöövitavaid ja söövitavaid aineid ja segusid kooskõlas ÜRO GHSi (1) ja CLP-määrusega.
  
2. Nahasöövituse hindamisel on tavapäraselt kasutatud laboriloomi (katsemeetod B.4, mis on samaväärne algselt 1981. aastal vastu võetud ning aastatel 1992, 2002 ja 2015 muudetud OECD katsejuhendiga nr 404) (2). Peale käesoleva katsemeetodi B.40 on valideeritud ja vastu võetud muudki *in vitro* katsemeetodid kemikaalide võimaliku nahka söövitava toime tuvastamiseks – näiteks katsemeetodid B.40b (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 431) (3) ja B.65 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435) (4), mis võimaldavad vajaduse korral teha kindlaks ka söövitava kemikaali alamkategorooria. Samuti on katsemeetodi B.46 (samaväärne OECD katsejuhendiga nr 439) (5) raames vastu võetud mitu valideeritud *in vitro* katsemeetodit nahaärrituse hindamiseks. OECD juhenddokumendis nahasöövituse ja -ärrituse puhul kasutatava katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühte läheneemisviisi kohta kirjeldatakse mitut moodulit, milles eri teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muid andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja läheneemisviisi juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid (6).
  
3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervisega seotud lõppnäitajana nahasöövitust. Meetod põhineb roti naha transkutaanse elektritakistuse (TET) mõõtmisel ning selle puhul kasutatakse nahakettaid, mille abil tehakse kindlaks söövitavad ained selle järgi, kas need on võimelised kahjustama normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina. Vastav OECD katsejuhend võeti algselt vastu 2004. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et lisada viide eespool nimetatud juhenddokumendile katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühte lähenemisviisi kohta.
  
4. *In vitro* nahasöövituse tuvastamise meetoodika hindamiseks regulatiivsel eesmärgil viidi läbi valideerimiseelsed uuringud (7) ja seejärel roti naha TET mõõtmisel põhineva, nahasöövituse hindamiseks kasutatava katsemeetodi ametlik valideerimisuuring (8, 9, 10, 11). Nende uuringute tulemusena

(1) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

## ▼M8

esitati soovitus, et kõnealust TET mõõtmisel põhinevat katsemeetodit, mis on määratud valideeritud standardmeetodiks (VSM), võiks kasutada regulatiivsel eesmärgil *in vivo* nahasöövituse hindamiseks (12, 13, 14).

5. Enne kui regulatiivsel eesmärgil nahasöövituse hindamiseks saab VSMi kõrval kasutada mõnda muud TET mõõtmisel põhinevat soovitud sarnast või muudetud *in vitro* katsemeetodit, tuleks teha kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja piirangud kavandatava kasutusotstarbe puhul, et tagada selle sarnasus VSMiga kooskõlas tulemuslikkuse standardites sätestatud nõuetega (15). OECD otsuse kohane andmete vastastikune tunnustamine on tagatud üksnes pärast seda, kui tulemuslikkuse standarditele vastav mis tahes välja pakutud uus või ajakohastatud katsemeetod on läbi vaadatud ja asjaomasesse OECD katsejuhendisse lisatud.

## MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on määratletud liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED

7. Valideerimisuringu (10) ja muude avaldatud uuringute (16, 17) andmeil võimaldab roti naha TET mõõtmisel põhinev katsemeetod eristada 122 ainet sisaldavas andmebaasis esindatud teadaolevaid nahka söövitavaid aineid mittesöövitavatest ainetest üldise tundlikkusega 94 % (51/54) ja spetsiifilisusega 71 % (48/68).
8. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse *in vitro* nahasöövitust. Meetod võimaldab teha kooskõlas ÜRO GHSi / CLP-määrusega kindlaks mittesöövitavad ja söövitavad uuritavad kemikaalid. Nagu nähtub valideerimisuringutest (8, 9, 10, 11), piirab selle katsemeetodi kasutamist asjaolu, et see ei võimalda liigitada söövitavaid aineid ja segusid ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategoriasse. Käesoleva katsemeetodi kasutusviis määratakse kindlaks kohaldatava õigusraamistikuga. Ehkki käesolev katsemeetod ei võimalda saada piisavat teavet nahaärrituse kohta, tuleks tähele panna, et tervisemõjuna hinnatavat *in vitro* nahaärritust käsitletakse konkreetselt katsemeetodis B.46 (5). Ühekordse nahakaudse kokkupuute järel nahale avalduva lokaalse toime täielikku hindamist on kirjeldatud OECD juhenddokumendis katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (6).
9. Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks uuriti paljusid eri kemikaale, peamiselt aineid; valideerimisuringu empiirilises andmebaasis on 60 ainet paljudest eri kemikaaliklassidest (8, 9). Kokkuvõetuna nähtub olemasolevatest andmetest, et katsemeetod on kasutatav paljude eri kemikaaliklasside ja eri füüsikalises olekus ainete, sealhulgas vedelike, pooltahkete ja tahkete ainete ning vahade puhul. Tuleks märkida, et kuna teatud kindlate füüsikaliste olekute puhul ei ole sobivate võrdlusandmetega katseained hõlpsalt kättesaadavad, on valideerimise käigus hinnatud suhteliselt väikest arvu vahasid ja tahkeid söövitavaid aineid. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria ainete puhul kasutada, tuleks hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria ainete puhul. Peale selle saab käesolevat katsemeetodit ainete kõrval eeldatavalt kasutada ka segude puhul. Ent kuna segud kuuluvad paljudesse eri kategoriasse ja on eri koostisega ning nende kasutamise kohta katses on praegu piiratud hulgal teavet, tuleks juhul, kui on võimalik tõendada, et katsemeetodit ei saa teatud kindla kategooria segude puhul kasutada (nt strateegia abil, mille on 2012. aastal välja pakkunud Eskes *et al.*) (18), hoiduda selle kasutamisest sellise kategooria segude puhul. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile

## ▼M8

vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuuringutes veel hinnatud (8, 9). Ehkki on võimalik, et neidki saab uurida TET mõõtmisel põhineva katsemeetodiga, ei võimalda praegune katsemeetod gaaside ega aerosoolide uurimist.

## KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav aine kantakse kuni 24 tunniks nahaketaste marrasknahale kahekambriilises katsesüsteemis, milles nahakettad toimivad kambritevahelise eralduskihina. Nahakettad võetakse humaanselt surmatud 28–30 päeva vanustelt rottidelt. Söövitavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi kahjustada normaalse sarvkihi terviklikkust ja selle toimimist kaitsekihina; see ilmneb mõõdetud TET vähenemisena allapoole läviväärtust (16) (vt punkt 32). Roti naha TET läviväärtuseks on valitud 5 kΩ; selle väärtuse valimisel on lähtutud suurest hulgast andmetest paljude eri ainete kohta, millest valdava enamiku puhul on TET väärtus nimetatud väärtusest selgelt suurem (sageli > 10 kΩ) või selgelt väiksem (sageli < 3 kΩ) (16). Üldjuhul ei põhjusta uuritavad kemikaalid, mis on loomadele mittesöövitavad ning kas ärritavad või mitteärritavad, TET vähenemist kõnealusel läviväärtusest allapoole. Muude nahapreparaatide või seadmete kasutamine võib aga tingida selle läviväärtuse muutmise ning sel juhul on vajalik täiendav valideerimine.
11. Käesolev katsemeetod hõlmab värvaine sidumise etappi, et võimaldada katseliselt kinnitada TET mõõtmisel saadud positiivseid tulemusi, sealhulgas juhul, kui saadud väärtus jääb 5 kΩ lähedusse. Värvaine sidumise etapis tehakse kindlaks, kas ioonilise läbitavuse suurenemine on tingitud sarvkihi füüsilisest hävimisest. On tõendatud, et roti naha TET mõõtmisel põhineva meetodiga saab prognoosida katsemeetodi B.4 abil hinnatavat *in vivo* söövitavat toimet küülikul (2).

## PÄDEVUSE TÕENDAMINE

12. Enne käesolevale katsemeetodile vastava, roti naha TET mõõtmisel põhineva katsemeetodi regulaarset kasutamist tuleks labori tehnilise pädevuse tõendamiseks õigesti liigitada kaksteist tabelis 1 loetletud soovitatavat pädevusainet. Kui mõni loetletud ainetest ei ole kättesaadav või kui see on põhjendatav, võib kasutada mõnda muud ainet, mille kohta on olemas piisavad *in vivo* ja *in vitro* võrdlusandmed (nt võrdluskemikaalide loetelust (16) valitud ainet), ent üksnes juhul, kui kohaldatakse samu valikukriteeriume, nagu on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1

## Pädevusainete loetelu (1)

Aine	CASi nr	Kemikaalklass (2)	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> tulemustel põhinev kategooria (3)	VSMga saadud <i>in vitro</i> tulemustel põhinev kategooria	Füüsikaline olek	pH (4)
<i>In vivo</i> söövitavad ained						
<i>N,N'</i> -dimetüüldipropüleentriamiin	10563-29-8	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	Orgaaniline alus	1A	6 × S	V	8,3

## ▼M8

Aine	CASi nr	Kemikaalikklass (2)	ÜRO GHSi / CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> tulemustel põhinev kategooria (3)	VSMga saadud <i>in vitro</i> tulemustel põhinev kategooria	Füüsikaline olek	pH (4)
<i>In vivo</i> söövitavad ained						
Väävelhape (10 %)	7664-93-9	Anorgaaniline hape	(1A/1B/1C)	5 × S 1 × MS	V	1,2
Kaaliumhüdroksiid (10 % vesilahus)	1310-58-3	Anorgaaniline alus	(1A/1B/1C)	6 × S	V	13,2
Oktaanhape (kaprüülhape)	124-07-2	Orgaaniline hape	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,6
2- <i>tert</i> -butüülfenool	88-18-6	Fenool	1B/1C	4 × S 2 × MS	V	3,9
<i>In vivo</i> mittesöövitavad ained						
Isostearhape	2724-58-5	Orgaaniline hape	MS	6 × MS	V	3,6
4-amino-1,2,4-triasool	584-13-4	Orgaaniline alus	MS	6 × MS	T	5,5
Fenetüülbromiid	103-63-9	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	3,6
4-(metüültio)bensaldehüüd	3446-89-7	Elektrofiil	MS	6 × MS	V	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	3,9
Tetrakloroetüleen	127-18-4	Neutraalne orgaaniline aine	MS	6 × MS	V	4,5

Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumber; MS – mittesöövitav; S – söövitav; T – tahkis; V – vedelik; VSM – valideeritud standardmeetod.

(1) Need pädevusained, mis on järjestatud esmalt nii, et söövitavad ained on esitatud enne mittesöövitavaid aineid, ning seejärel söövitavuse alamkategooria ja edasi kemikaaliklassi järgi, on valitud ainete hulgast, mida kasutati Alternatiivsete Meetodite Valideerimise Euroopa Keskuse (ECVAM) uuringus roti naha TET-I põhineva katsemeetodi valideerimiseks (8, 9). Kui ei ole teisiti märgitud, uuriti kõnealuseid aineid sellise puhtusastme juures, nagu need kaubanduslikult allikast osteti (8). Ainete valimisel lähtuti võimalikult suurel määral sellest, et: i) need oleksid VSMi abil mõõdetava või ennustatava eri söövitavusega (nt mittesöövitavad, nõrgalt söövitavad ja tugevalt söövitavad ained), ii) need esindaksid valideerimisuurings kasutatud kemikaaliklasse, iii) VSMi tulemuslikkuse näitajad oleksid arvesse võetud, iv) ainetel oleks täpselt määratletud keemiline struktuur, v) need võimaldaksid saada standardse *in vivo* katsemeetodiga selgepiirilisi tulemusi, vi) need oleksid turul kättesaadavad ning vii) nende kõrvaldamise kulud ei oleks liiga suured.

(2) Kemikaalikklass, mille on kindlaks määranud Barratt *et al.* (8).

(3) ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastele 1A, 1B ja 1C kategooriatele vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühm.

(4) Need pH väärtused on avaldanud Fentem *et al.* (9) ja Barratt *et al.* (8).

**▼M8****KATSE KÄIK**

13. Standardne töökord roti naha TET-I põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi rakendamiseks on leitav kirjandusest (19). Käesoleva katsemeetodi kohases roti naha TET mõõtmise katses peaksid olema täidetud järgmised tingimused.

**Loomad**

14. Tuleks kasutada rotte, sest nende naha tundlikkus ainetele käesoleva katsemeetodi kasutamisel on juba tõendatud (12) ning tegemist on ainsa nahaallikaga, mis on ametlikult valideeritud (8, 9). Väga oluline on roti vanus (naha võtmise hetkel) ja päritoluliin, kuna tuleks tagada, et karvanääpsud on uinuvas olekus ja täiskasvanud looma karvakasv ei ole veel alanud.
15. Noorte, umbes 22 päeva vanuste (Wistari või sellega võrreldavast liinist pärit) emas- või isasrottide selja- ja küljekarv eemaldatakse hoolikalt väikeste kääridega. Seejärel pestakse loomi hoolikalt pühkimise teel ning pügatud piirkond kastetakse üleni antibiootikumilahusesse (mis sisaldab näiteks streptomütsiini, penitsilliini, klooramfenikooli ja amfoteritsiini kontsentratsioonis, mille juures bakterite kasv on pärsitud). Loomi pestakse antibiootikumidega uuesti kolmandal või neljandal päeval pärast esimest pesu ning kasutatakse kolme päeva jooksul pärast teist pesu, kui sarvkiht on karvade eemaldamisest taastunud.

**Nahaketaste ettevalmistamine**

16. Loomad surmatakse humaanselt 28–30 päeva vanuses; see vanus on väga oluline. Seejärel eemaldatakse iga looma selja- ja küljenahk ning tõmmatakse sellelt ettevaatlikult maha liigne nahaalne rasvakiht. Lõigatakse välja nahakettad läbimõelduga umbes 20 mm. Nahka võib enne ketaste kasutamist säilitada, kui on tõendatud, et sellise naha puhul positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud tulemused on samaväärsed värske naha kasutamisel saadud tulemustega.
17. Iga nahaketast asetatakse polütetrafluoroetüleentoru (PTFE-toru) ühele otsale nii, et marrasknaha pind on toruga kontaktis. Toru otsa surutakse naha paigal hoidmiseks kummist rõngastihend ja liigne kude lõigatakse ära. Seejärel tihendatakse kummist rõngastihendi ja PTFE-toru ühenduskoht hoolikalt vaseliiniga. Toru asetatakse vastuvõtunõusse, mis sisaldab MgSO<sub>4</sub> lahust (154 mM), ja kinnitatakse vedruklambriga (joonis 1). Nahaketast peaks jääma üleni MgSO<sub>4</sub> lahusesse. Ühe roti nahast võib saada 10–15 nahaketast. Toru ja rõngastihendi mõõtmed on esitatud joonisel 2.
18. Enne katse algust mõõdetakse iga looma naha kvaliteedi kontrollimiseks kahe nahaketta transkutaanne elektritakistus. Kummagi ketta elektritakistus peaks olema suurem kui 10 kΩ, et ülejäänud kettaid oleks võimalik katses kasutada. Kui takistus on väiksem kui 10 kΩ, tuleks kõik ülejäänud sellest nahast saadud kettad ära visata.

**Uuritavate kemikaalide ja kontrollainetega töötlemine**

19. Katsemudeli piisava töökindluse tõendamiseks tuleks igas mõõtmistsükli (katses) kasutada paralleelset positiivset ja negatiivset kontrolli. Igas eraldi mõõtmistsükli (katses) tuleks kasutada ühelt ja samalt loomalt saadud nahakettaid. Soovitavad positiivse ja negatiivse kontrolli ained on vastavalt 10 M soolhappe ja destilleeritud vesi.

## ▼M8

20. Vedelad uuritavad kemikaalid (150 µl) kantakse ühtlaselt toru sees olevale marrasknahale. Tahke aine uurimisel kantakse see ühtlaselt nahakettale piisavas koguses, et kogu marrasknaha pind saaks kaetud. Tahkele ainele lisatakse deioniseeritud vett (150 µl) ja toru loksutatakse ettevaatlikult. Nahaga maksimaalse kontakti saavutamiseks võib olla vaja uuritavat tahket kemikaali sulatamiseks või pehmemdamiseks kuni 30 °C-ni soojendada või seda teralise materjali või pulbri saamiseks peenestada.
21. Iga uuritava kemikaali ja kontrollaine jaoks kasutatakse igas mõõtmistsüklis (katses) kolme nahakettast. Uuritavat kemikaali hoitakse temperatuuril 20–23 °C nahaga kontaktis 24 tundi. Seejärel pestakse nahka uuritava kemikaali eemaldamiseks toatemperatuuril oleva või jahedama kraanivee joaga, kuni materjali enam ei eraldu.

**TET mõõtmine**

22. Naha impedantsi määramiseks mõõdetakse TETd madalpingel töötava Wheatstone'i vahelduvvoolusilla abil (18). Mõõtesilla üldised tehnilised näitajad on järgmised: tööpinge 1–3 V, siinus- või ristkülikvahelduvvool sagedusega 50–1 000 Hz ja mõõtepiirkond vähemalt 0,1–30 kΩ. Valideerimisuuringus kasutatud mõõtesillaga mõõdeti sagedusel 100 Hz või 1 kHz induktiivsust, mahtuvust ja takistust väärtuseni vastavalt 2 000 H, 2 000 µF või 2 MΩ; seejuures kasutati jada- või rööpühenduse puhul saadud näituseid. TET-põhises söövitavuskatses mõõdetakse takistust sagedusel 100 Hz ning kasutatakse jadaühenduse puhul saadud näituseid. Enne elektritakistuse mõõtmist lisatakse naha pindpinevuse vähendamiseks 70-protsendilist etanooli koguses, millest piisab marrasknaha katmiseks. Mõne sekundi pärast eemaldatakse etanool torust ja koe niisutamiseks lisatakse 3 ml MgSO<sub>4</sub> lahust (154 mM). Nahakettast kummalegi poole paigutatakse mõõtesilla elektrodid, et mõõta nahaketta takistust kilo-oomides (joonis 1). Elektrodide mõõtmed ja hammasklambri allapoole ulatava elektrodiosa pikkus on esitatud joonisel 2. Sisemisele elektrodile kinnitatakse klamber toetatakse takistuse mõõtmise ajaks PTFE-toru otsale, et elektrod ulatuks alati samas pikkuses MgSO<sub>4</sub> lahusesse. Välimine elektrod paigutatakse vastuvõtnõusse nii, et see toetub nõu põhjale. Vedruklambri ja PTFE-toru põhja vahelist kaugust hoitakse konstantsena (joonis 2), sest see kaugus mõjutab saadavat takistuse väärtust. Seega peaks vahemaa sisemise elektroodi ja nahaketta vahel olema konstantne ja minimaalne (1–2 mm).
23. Kui mõõdetud takistuse väärtus on üle 20 kΩ, võib see olla tingitud uuritava kemikaali jääkidest nahaketta marrasknaha pinnal. Võib proovida neid jääke veel kord eemaldada, näiteks sulgeda PTFE-toru kinnastatud pöidlaga ja loksutada seda umbes kümme sekundit; MgSO<sub>4</sub> lahust valatakse ära ja takistuse mõõtmist korratakse värske MgSO<sub>4</sub> lahusega.
24. Katseseadme omadused ja mõõtmed ning katse läbiviimise kord võivad mõjutada saadavaid TET väärtusi. Söövitavuse läviväärtus 5 kΩ on kehtestatud käesolevas katsemetodis kirjeldatud konkreetse seadme ja mõõtmismeetodiga saadud andmete põhjal. Katsetingimuste muutmisel või teistsuguse seadme kasutamisel võivad lävi- ja kontrollväärtused olla teised. Seepärast on vaja selle meetodi ja takistuse läviväärtuste kalibreerimiseks teha mõõtmisi pädevusainetega, mis on valitud valideerimisuuringus kasutatud ainete hulgast (8, 9) või kemikaaliklassidest, mis on sarnased uuritavate ainete klassidega. Sobivate pädevusainete loetelu on esitatud tabelis 1.



## ▼M8

**Värvaine sidumisel põhinevad meetodid**

25. Teatavate mittesöövitavate ainetega kokkupuutumise tulemusena võib takistus muutuda läviväärtusest 5 kΩ väiksemaks, kuna sellised ained võimaldavad ioonidel läbi sarvkihi liikuda ja vähendavad seeläbi elektritakistust (9). Näiteks võivad pindaktiivsed neutraalsed orgaanilised ained ja kemikaalid (sealhulgas detergendid, emulgaatorid ja muud pindaktiivsed ained) eemaldada nahast lipiidid ning muuta kaitsekihi ioonidele paremini läbitavaks. Seepärast tuleks juhul, kui selliste kemikaalide puhul täheldatav TET väärtus on nahaketaste nähtavate kahjustuste puudumise korral umbes 5 kΩ või sellest väiksem, hinnata nii kontroll- kui ka katsekoe puhul värvaine imendumist, et teha kindlaks, kas saadud TET väärtus oli põhjustatud naha suurenenud läbilaskvusest või söövitusest (7, 9). Viimasel juhul tungib värvaine sulforodamiin B nahapinnale kantuna vigastatud sarvkihi kohalt kiiresti naha sisse ja põhjustab sarvkihi kudede värvumise. See konkreetne värvaine on püsiv paljude kemikaalide suhtes ning seda ei mõjuta allpool kirjeldatud ekstraheerimine.

**Värvaine sulforodamiin B pealekandmine ja eemaldamine**

26. Pärast TET määramist valatakse magneesiumsulfaat torust välja ja nahka uuritakse hoolikalt silmanähtavate kahjustuste suhtes. Kui silmanähtavaid suuri kahjustusi (nt perforatsiooni) ei esine, kantakse iga nahaketta marrask-naha pinnale kaheks tunniks 150 µl värvaine sulforodamiin B (happeline punane 52; CI number: 45100; CASi number: 3520-42-1) 10-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) lahust destilleeritud vees. Seejärel pestakse nahakettaid toatemperatuuril oleva või jahedama kraaniveega umbes kümme sekundit liigse/seondumata värvaine eemaldamiseks. Iga nahaketas eemaldatakse ettevaatlikult PTFE-torult ja asetatakse viaali (nt 20-milliliitrisesse klaasist stsintillatsioonivialli), mis sisaldab deioniseeritud vett (8 ml). Viaale loksutatakse ettevaatlikult viis minutit, et eemaldada kogu seondumata värvaine. Loputamist korratakse ning seejärel eemaldatakse nahakettaid ja pannakse viaalidesse, mis sisaldavad 5 ml 30-protsendilist (massiühikutes mahuühiku kohta) naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) lahust destilleeritud vees, ning kettaid inkubeeritakse temperatuuril 60 °C hommikuni.
27. Pärast inkubeerimist nahakettaid eemaldatakse ja visatakse ära ning järelejäänud lahust tsentrifuugitakse kaheksa minutit temperatuuril 21 °C (suhtelise tsentrifugaaljõuga ~175 g). Seejärel lahjendatakse supernatandist võetud 1 ml suurust proovi mahuliselt viis korda (st 1 ml + 4 ml) 30-protsendilise (massiühikutes mahuühiku kohta) SDSi lahusega destilleeritud vees. Lahuse optilist tihedust mõõdetakse lainepikkusel 565 nm.

**Värvaine sisalduse arvutamine**

28. Värvaine sulforodamiin B sisaldus ketta kohta arvutatakse optilise tiheduse väärtuste alusel (9) (sulforodamiin B molaarne ekstinktsioonikoefitsient lainepikkusel 565 nm on  $8,7 \times 10^4$  ja molekulmass 580). Sobiva kaliibrimis-kõvera abil määratakse värvainesisaldus iga nahaketta puhul ning seejärel arvutatakse paralleelproovide keskmine värvainesisaldus.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

29. Saadud TET keskvärtus on vastuvõetav, kui paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud väärtused jäävad katset läbi viivas laboris käesoleva meetodi kasutamise puhul vastuvõetavasse väärtusevahemikku. Vastuvõetavad takistusevahemikud espool kirjeldatud metoodika ja seadme puhul on esitatud järgmises tabelis.

## ▼M8

Kontroll	Aine	Takistusevahemik (kΩ)
Positiivne	10 M soolhape	0,5–1,0
Negatiivne	Destilleeritud vesi	10–25

30. Värvaine sidumist iseloomustavad keskväärtused on vastuvõetavad tingimusel, et paralleelsete kontrollidega saadud väärtused jäävad kõnealuse meetodi puhul vastuvõetavasse vahemikku. Kontrollainete jaoks soovitatavad vastuvõetavad värvainesisalduse vahemikud on eespool kirjeldatud metoodika ja seadme puhul järgmised.

Kontroll	Aine	Värvainesisalduse vahemik (µg ketta kohta)
Positiivne	10 M soolhape	40–100
Negatiivne	Destilleeritud vesi	15–35

**Tulemuste tõlgendamine**

31. TET läviväärtus, mis võimaldab eristada söövitavaid uuritavaid kemikaale mittesöövitavatest, määrati kindlaks katsemeetodi optimeerimise käigus, seda kontrolliti valideerimiseelses etapis ning selle sobivus leidis kinnitust ametlikus valideerimisuurinus.
32. Allpool on esitatud roti naha TET-l põhineva, nahasöövituse hindamist võimaldava katsemeetodi puhul kasutatav prognoosimudel (9, 19), mis on seotud ÜRO GHSi / CLP-määruse kohase klassifitseerimisüsteemiga.

Uuritav kemikaal loetakse nahka mitte söövitavaks, kui:

- i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on suurem kui (>) 5 kΩ või
- ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning
  - nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni) ja
  - nahaketaste keskmine värvainesisaldus on väiksem kui (<) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

Uuritav kemikaal loetakse nahka söövitavaks, kui:

- i) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning nahakettad on silmanähtavalt kahjustatud (nt perforeeritud) või
- ii) uuritava kemikaali puhul saadud TET keskväärtus on sama suur või väiksem kui (≤) 5 kΩ ning
  - nahaketastel ei täheldata silmanähtavaid kahjustusi (nt perforatsiooni), kuid

**▼M8**

- nahaketaste keskmine värvainesisaldus on sama suur või suurem kui ( $\geq$ ) paralleelse positiivse kontrollina kasutatud 10 M HCl-ga töödeldud nahaketaste keskmine värvainesisaldus (positiivset kontrolli iseloomustavad väärtused on esitatud punktis 30).

33. Ühese klassifitseerimistulemuse puhul peaks piisama ühest mõõtmistsüklist (katsest), mille käigus analüüsitakse uuritava kemikaali toimet paralleelselt vähemalt kolmele nahakettale. Ebaselgete tulemuste puhul – näiteks kui paralleelproovidega saadud mõõtmisandmed lahknevad ja/või TET keskvaärtus on  $5 \pm 0,5$  k $\Omega$  – tuleks kaaluda vajadust viia läbi veel üks sõltumatu mõõtmistsükkel (katse) ning esimeses kahes mõõtmistsükli (katses) saadud tulemuste lahknevuse korral veel kolmaski mõõtmistsükkel (katse).

**ANDMED JA ARUANDLUS****Andmed**

34. Uuritava kemikaali ning positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud takistuse väärtused (k $\Omega$ ) ja vajaduse korral värvainesisalduse väärtused ( $\mu\text{g}$  ketta kohta) tuleks esitada tabelina, millesse kantakse igas mõõtmistsükli (katses) iga üksiku paralleelproovina kasutatud kettaga saadud andmed ning samuti keskvaärtused  $\pm$  standardhälve. Esitatakse kõikide korduskatsete tulemused. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks esitada teave nahaketastes täheldatud kahjustuste kohta.

**Katseprotokoll**

35. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Uuritav kemikaal ja kontrollained:*

- ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- allikas ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katsset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

*Katseloomad:*

- kasutatud liin ja sugu;
- loomade vanus doonorloomana kasutamise hetkel;
- päritolu, pidamistingimused, söötmissandmed jne;
- naha ettevalmistamise üksikasjad.

**▼ M8***Katsetingimused:*

- katseseadme kaliibrimiskõverad;
- värvaine sidumise katsed iseloomustavad kaliibrimiskõverad, optilise tiheduse mõõtmiseks kasutatud ribafiltri spektrivahemik ja vajaduse korral mõõteseadmega (nt spektrofotomeetriga) saavutatav optilise tiheduse väärtuste lineaarsusvahemik;
- TET mõõtmise meetodi üksikasjad;
- vajaduse korral üksikasjalik teave värvaine sidumise hindamiseks kasutatud meetodi kohta;
- katses kasutatud annused, kokkupuuteperioodi(de) kestus ja kokkupuute-temperatuur(id);
- kokkupuuteperioodi järgsete pesemistoimingute üksikasjad;
- iga uuritava kemikaali ja kontrollide (positiivse ja negatiivse kontrolli) puhul paralleelproovidenä kasutatud nahaketaste arv;
- kõikide katsemeetodis tehtud muudatuste kirjeldus;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmisi aspekte:
  - i) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, kilo-oomides väljendatud TET väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest takistusevahemikest;
  - ii) positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud, nahaketta kohta mikrogrammides väljendatud värvainesisalduse väärtuste vastuvõetavus lähtuvalt positiivset ja negatiivset kontrolli iseloomustavatest värvainesisalduse vahemikest;
  - iii) katsetulemuste vastuvõetavus lähtuvalt paralleelproovidenä kasutatud nahaketastega saadud varasemate tulemuste varieeruvusest;
- kasutatud otsustuskriteeriumide/prognoosimudeli kirjeldus.

*Tulemused:*

- TET mõõtmise katsetes ja vajaduse korral värvaine sidumise katsetes iga uuritava kemikaali ja kontrolliga saadud, tabelina esitatavad andmed iga mõõtmistsükli (katse) ja iga paralleelproovina kasutatud nahaketta (iga üksiku looma ja nahaproovi) kohta, samuti vastavad keskvaärtused, standardhälbed ja variatsioonikordajad;
- mis tahes täheldatud toime kirjeldus;
- klassifitseerimistulemused lähtuvalt kasutatud prognoosimudelist/otsustuskriteeriumidest.

*Tulemuste arutelu**Järeldused***KIRJANDUS**

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Viies, täiendatud väljaanne. ÜRO, New York ja Genf. Kättesaadav aadressil [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)].

▼ **M8**

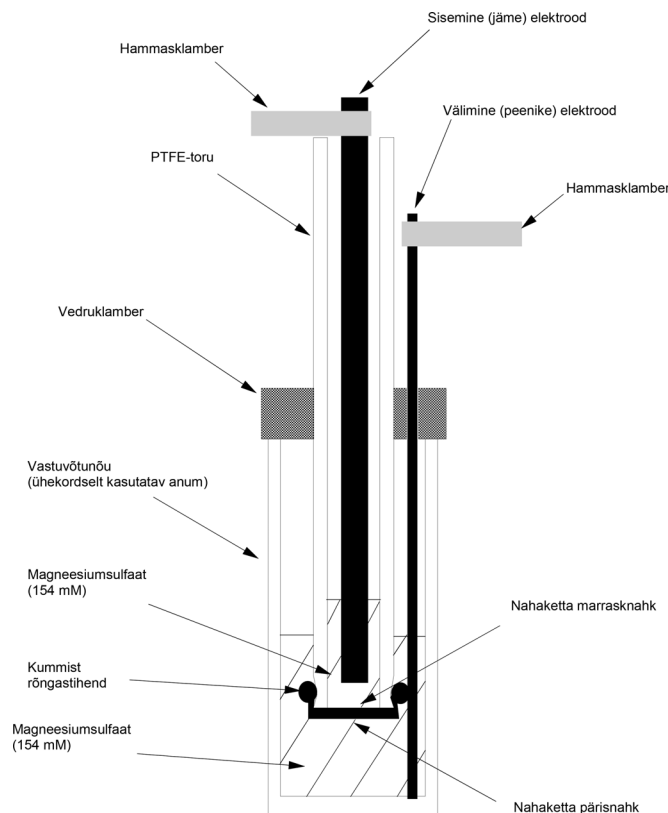
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.4 „Äge nahaärritus/-söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.40b „*In vitro* nahasöövitus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.65 „*In vitro* membraanibarjääri katsemeetod nahasöövituse uurimiseks“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk B.46 „*In vitro* nahaärritus: inimese rekonstrueeritud marrasknahal põhinev katsemeetod“.
- (6) OECD (2014). Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 203. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., ja Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23: 219–255.
- (8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem J. H., Gerner I., Walker A. P., ja Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12: 471–482.
- (9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., ja Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. In Vitro* 12: 483–524.
- (10) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., ja Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23: 129–147.
- (11) Alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee (ICCVAM) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity). Koostanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC10), 3. aprill 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26: 275–280.
- (14) ICCVAM (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion Testing as described in TG 430. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 218. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

## ▼M8

- (16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., ja Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test – Modifications and Validation. *Food Chem. Toxicol.* 24: 507–512.
- (17) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., ja Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6: 191–194.
- (18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüscheiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J. P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V. M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G. C., ja Depallens, O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62: 393–403.
- (19) TET mõõtmise standardne töökord (detsember 2008). Andmebaasi *INVITTOX* katse-eeskiri nr 115 „Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test“.
- (20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

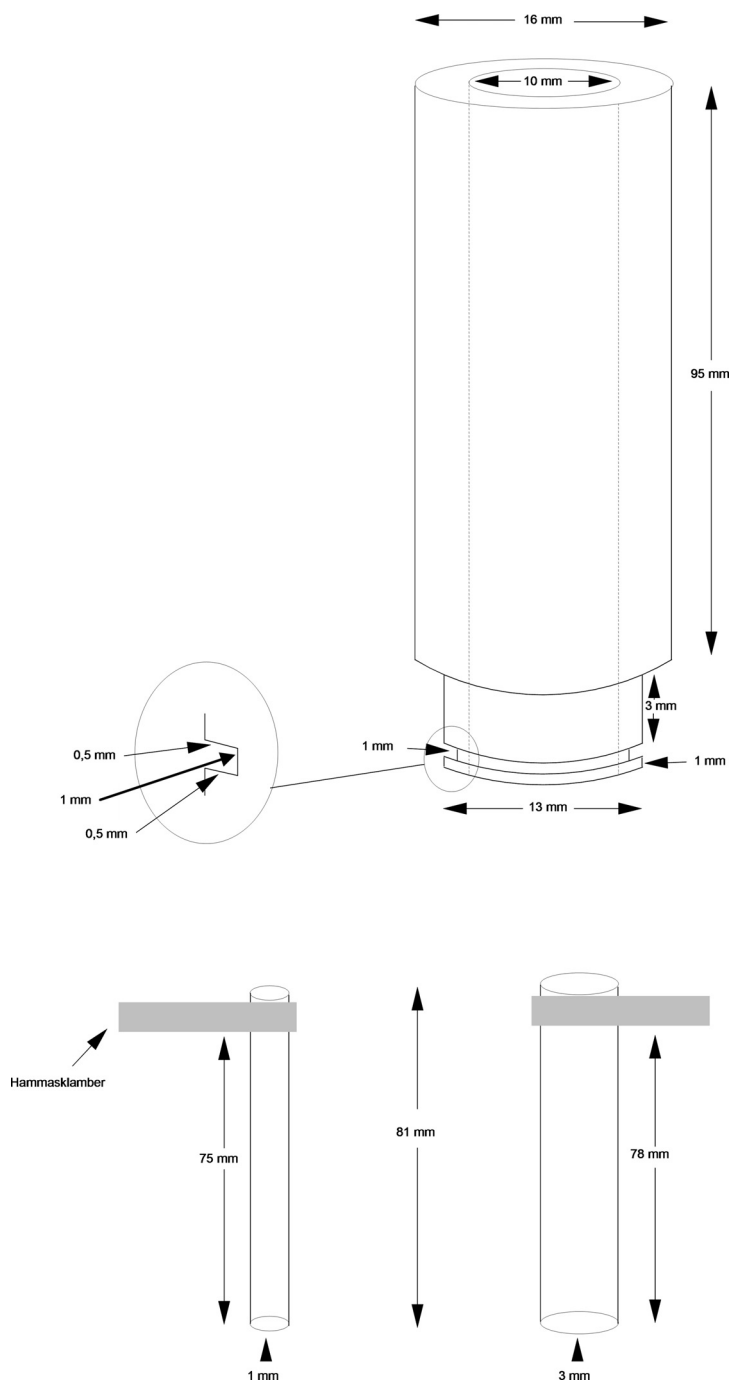
## Joonis 1

## Roti Naha Tet Mõõtmiseks Kasutatav Seade



▼ **M8**

Joonis 2

**Polütetrafluoroetüleentoru (Ptfē-Toru) Ja Vastuvõtunõu Ning Kasutatavate Elektroodide Mõõtmed****Olulised tegurid eespool kujutatud seadme puhul:**

— PTFE-toru siseläbimõõt;

— elektroodide pikkus peaks PTFE-toru ja vastuvõtunõuga võrreldes olema selline, et nahaketas ei puutuks vastu elektroode ja elektroodid oleks teatavas standardpikkuses MgSO<sub>4</sub> lahusega kokkupuutes;

**▼M8**

- $\text{MgSO}_4$  lahuse hulk vastuvõtunõus peaks olema selline, et vedeliku sügavus võrreldes PTFE-torus oleva vedeliku tasemega vastaks joonisel 1 näidatule;
- nahaketas peaks olema kinnitatud PTFE-toru külge piisavalt hästi, et elektritakistus iseloomustaks tõeselt naha omadusi.



▼ **M8***Liide***MÕISTED**

**Aine** – looduslik või mis tahes tootmisprotsessi tulemusena saadud keemiline element või selle ühend koos püsivuse tagamiseks vajalike lisainete ja tootmisprotsessi käigus tekkinud lisanditega, mis ei hõlma siiski lahusteid, mida on võimalik aine püsivust mõjutamata või selle koostist muutmata ainest eraldada.

**Asjakohasus** – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuidas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (20).

**GHS (ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem)** – süsteem, millega nähakse ette kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimine vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud liigile ja tasemele ning mis hõlmab selliseid asjaomaseid teavituselemente nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ning keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku toime kohta (1).

**In vivo nahasöövitav** – pöördumatu nahakahjustuse tekkimine, st läbi marrask-naha pärisnahani ulatava nähtava nekroosi tekkimine pärast uuritava kemikaali pealekandmist kuni neljaks tunniks. Tüüpilised söövitushäired on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Mitme koostisosast koosnev aine** – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja milles enam kui ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 10, kuid väiksem kui 80 massiprotsenti. Mitme koostisosast koosnev aine saadakse tootmisprotsessi tulemusena. Erinevus segu ja mitme koostisosast koosneva aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokkusegamisega, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosast koosnev aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

**MS** – mittesöövitav.

**(Mõõtmis)tsükkel** – ühe uuritava kemikaali analüüsimine üheaegselt vähemalt kolmel paralleelproovina kasutataval nahakettal.

**Positiivne kontroll** – paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida on töödeldud ainega, millega teadaolevalt saadakse positiivne tulemus. Positiivse tulemuse väärtus ei tohiks olla liiga suur, et võimaldada hinnata positiivse kontrolliga saadud tulemuste varieeruvust ajas.

**S** – söövitav.

**Segu** – kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

**Spetsiifilisus** – katsemeetodiga õigesti negatiivseks/reaktsioonivõimetuks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide negatiivsete kemikaalide hulgas. Spetsiifilisus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

**▼ M8**

**Transkutaannelektrikistik (TET)** – naha elektrilise impedantsi näitaja, mida väljendatakse takistusena kilo-oomides. Lihtne ja töökindel meetod kaitsekihina toimimise hindamiseks Wheatstone'i sillana töötava seadme abil, millega registreeritakse naha läbivioonivoog.

**Tulemuslikkuse standardid** – valideeritud katsemeetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse mehhanismilt ja tööpõhimõttelt sarnase kavandatud katsemeetodi võrreldavust. Need hõlmavad: i) katsemeetodi olulisi elemente, ii) valideeritud katsemeetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja iii) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemeetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel.

**Tundlikkus** – katsemeetodiga õigesti positiivseks/reaktsioonivõimeliseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide positiivsete kemikaalide hulgas. Tundlikkus kajastab sellise katsemeetodi täpsust, millega saadakse kategoriseeritav tulemus, ning see on oluline näitaja katsemeetodi asjakohasuse hindamiseks (20).

**Täpsus** – katsemeetodiga saadud tulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohasest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu (20).

**Usaldusväärsus** – näitaja, mis iseloomustab katsemeetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (20).

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**Vastavus** – katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategoriseeritav tulemus; üks asjakohasest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse mõnikord täpsuse tähenduses ja see on määratletud kui õigesti positiivseks või negatiivseks liigitatud kemikaalide osakaal kõikide uuritud kemikaalide seas. Vastavus sõltub väga suurel määral positiivsete tulemuste osakaalust uuritavale kemikaalile vastavat liiki kemikaalide hulgas (20).

**Ühest koostisosast koosnev aine** – aine, mis on määratletud kvantitatiivse koostise alusel ja mille ühe põhikoostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

▼ **M8**

B.40b. ***IN VITRO* NAHASÖÖVITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD  
MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼ B**

**B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE**

**▼ M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼ M3

**B.42. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE**

## SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja nendel põhinevaid ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Varem on vastu võetud originaalkatsemeetod hiire naha sensibiliseerimise määramiseks lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay – LLNA*; OECD katsejuhend 429; käesoleva lisa peatükk B.42) (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Ajakohastatud LLNA põhineb katse- ja teaduslike andmete hindamisel (12). See on teine katsemeetod, mis on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Teise meetodi puhul (OECD katsejuhend 406, käesoleva lisa peatükk B.6) kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNA-l on B.6 ja OECD katsejuhendiga 406 (13) võrreldes loomade heaoluga seotud eeliseid. Käesolev LLNA juhend hõlmab tulemuslikkusnähte (1. liide), mida võib kasutada selliste uute ja/või modifitseeritud katsemeetodite valideerimisolukorra hindamiseks, mis on tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnased LLNAga, vastavalt OECD katsejuhendi nr 34 (14) põhimõtetele.
2. LLNAga uuritakse naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Tuleb märkida, et pehmed/mõõdukad sensibiliseerijad, mida soovitakse sobivate positiivse kontrolli kemikaalidena merisigade katsemeetodite jaoks (need on B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13), sobivad kasutamiseks ka LLNA puhul (6, 8, 15). Vähendatud LLNA-d, mille puhul kasutatakse kuni 40 % vähem loomi, on kirjeldatud ühe võimalusena ka käesolevas katsemeetodis (16, 17, 18). Vähendatud LLNA-d võib kasutada, kui on regulatiivne vajadus kinnitada naha sensibiliseerimise võime negatiivset ennustust; seejuures tuleb järgida kõiki muid LLNA katse-eeskirja üksikasju, nagu on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Negatiivse tulemuse ennustus peab põhinema kogu kättesaadaval teabel, nagu on kirjeldatud punktis 4. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui vähendatud LLNAga saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks. Vähendatud LLNA-d ei tohiks kasutada ainete naha sensibiliseeriva toime ohu uurimiseks sellisel juhul, kui on vaja teavet annuse-immuunvastuse seose kohta, näiteks alakategooriatesse klassifitseerimiseks vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist, ning ÜRO ühtsele ülemaailmsele kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemile.

## MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 2. liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA on alternatiivne meetod võimalike naha sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) asemel LLNA-d, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist. Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine

▼ M3

nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

- LLNA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Siiski võimaldab see vähendada selleks vajalike loomade arvu. Lisaks võimaldab LLNA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi). LLNA põhineb sellel, et uuritakse kemikaalide immunoloogilist mõju sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal. Erinevalt merisigadega tehtavatest katsetest (s.o B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ei eelda LLNA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioonid. Samuti ei eelda LLNA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (13). Seega vähendab LLNA loomadele valu ja kannatuste tekitamist. Hoolimata LLNA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsetega võrreldes tuleks tunnustada, et on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsete kasutamise (nt LLNA valenegatiivid teatavate metallide puhul, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (19, 20) või probleemid uuritavate ainete lahustuvusega). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või selliste ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (21), olla vaja kasutada meriseakatsed (B.6 või OECD katsejuhend 406) (13). Kuna valideerimise andmebaas oli piiratud (eelkõige uuriti pestitsiidivorme), võib LLNA tõenäolisemalt kui meriseakatsed anda positiivse tulemuse sellist tüüpi uuritava aine puhul (22). Vormide uurimisel tuleks kaaluda seda, et võrdlusainena lisatakse samalaadseid aineid, mille tulemused on teada, et tõendada LLNaga saadavate tulemuste õigsust (vt punkt 16). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNaga saadavate tulemuste õigsust.

## KATSE PÕHIMÕTE

- LLNA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 3 selleks, et uuritava aine võiks klassifitseerida võimalikuks naha sensibiliseerijaks. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad radioaktiivse märgise kasutamisel *in vivo*; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvaletta dreenevates lümfisõlmedes. Kuid vohavate rakkude arvu hindamiseks võib kasutada ka muid väljundeid tingimusel, et need täielikult vastavad tulemuslikkusnõuetele (1. liide).

**▼ M3****KATSE KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. Kasutatakse CBA/Ca või CBA/J liini noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

**Pidamis- ja söötmingimused**

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (23), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema  $22 \pm 3$  °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärast labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

**Loomade ettevalmistamine**

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

**Annustamislahuste valmistamine**

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspenderida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

**Usaldusväarsuse kontroll**

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Ka mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) üle kolme korra, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks

## ▼M3

korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeks üle 20 on liiga suur). Eelistatavad positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service'i (CASi) nr 101-86-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v) ja 5 % merkaptobensotiasool (CASi nr 149-30-4) *N,N*-dimetüülformamiidis (vt 1. liide, tabel 1). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNAd ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahe miku (vähem kui aasta) jooksul.
13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.
14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseteni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (12).
15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (24). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.
16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.



## ▼ M3

## KATSE KÄIK

## Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–14). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.
18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 3 ja 5 antud soovitudel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (3, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).
19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliivõli (4: 1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (19), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.
20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 35). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (12). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Mõned reguleerivad asutused peavad vastuvõetavaks katseloomade koondandmeid ja siis võivad meetodi kasutajad valida, kas koguda iga üksiku looma andmeid või koondandmeid

## Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela uuritava aine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

## ▼ M3

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA põhikatse, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA põhikatse jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

*Tabel 1*  
**Punetuse hinne**

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 32, 33, 34).
24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35, 36) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaanselt surmata (37).

## ▼ M3

**Põhiuuringu katse ajakava**

25. Katse ajakava on järgmine.

- 1. päev: määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).
- 2. ja 3. päev: korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.
- 4. ja 5. päev: loomi ei töödelda.
- 6. päev: registreeritakse iga looma mass. Igale katse- ja kontrollrühma hiirele süstitakse sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 20 µCi ( $7,4 \times 10^5$  Bq) tritiumiga märgistatud  $^3\text{H}$ -metüül-tümidini. Asendusvõimalusena süstitakse kõikidele hiirtele sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 2 µCi ( $7,4 \times 10^4$  Bq)  $^{125}\text{I}$ -jododesoksüridiini ja  $10^{-5}$  M fluorodesoksüridiini. Viis tundi hiljem loomad surmatakse humaanselt. Igal katseloomal lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja töödeldakse neid koos fosfaatpuhvriga soolalahuses (üksiku katselooma lähenemisviis); asendusvõimalusena lõigatakse välja iga katseloomade rühma loomade kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja pannakse need kõik koos fosfaatpuhvriga soolalahusesse (iga katserühma ühendatud proovide lähenemisviis). Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (12). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

**Rakuspensioonide valmistamine**

26. Valmistatakse iga üksiku looma mõlemalt poolt (üksiku katselooma lähenemisviis) või katserühma loomadelt (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis) välja lõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakuspensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse muud sobivat võtet üksikrakuspensiooni valmistamiseks. Lümfisõlme-rakke pestakse kaks korda suure koguse fosfaatpuhvriga soolalahusega ja sadestatakse DNA 5 % trikloroäädikhappega 4 °C juures 18 tunni jooksul (3). Põhja tsentrifuugitud sade kas suspendeeritakse uuesti 1 ml trikloroäädikhappes ja kantakse 10 ml stsintillatsioonivedelikku sisaldavasse stsintillatsioonipudelisse  $^3\text{H}$ -loendamiseks või pannakse otse gammaloenduri torru  $^{125}\text{I}$ -loendamiseks.

**Rakkude vohamise määramine imendunud radioaktiivsuse järgi**

27.  $^3\text{H}$ -metüültümidini imendumist mõõdetakse  $\beta$ -stsintillatsiooni loendamise teel lagunemiste arvuna minutis (*disintegrations per minute*, DPM).  $^{125}\text{I}$ -jododesoksüridiini imendumist mõõdetakse  $^{125}\text{I}$ -loendamise teel ning väljendatakse samuti lagunemiste arvuna minutis. Sõltuvalt kasutatavast lähenemisviisist väljendatakse radioaktiivse märgise imendumist DPM-ides katselooma kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või DPM-ides katserühma kohta (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis).

**Vähendatud LLNA**

28. Teatud juhtudel, kui on regulatiivne vajadus kinnitada, et aine ei sensibiiliseeri nahka, võib valikuliselt kasutada vähendatud LLNA eeskirja (16, 17, 18), milleks kulub vähem katseloomi; seejuures tuleb järgida kõiki käesolevas katsemeetodis kirjeldatud muid LLNA katse-eeskirja üksikasju. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks.

▼ **M3**

29. Ainus erinevus LLNA ja vähendatud LLNA katse-eeskirjade vahel on vähendatud annuserühmade arv ja seepärast ei saada vähendatud LLNaga teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Seepärast ei saa vähendatud LLNAd kasutada, kui on vaja teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Nagu paljuannuselise LLNA puhul, nii ka vähendatud LLNA puhul peaks uuritava aine kontsentratsioon olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu selge süsteemne toksilisus hiire jaoks ega ülemäärane paikne nahaärritus (vt punkt 18).

**TÄHELEPANEKUD****Kliinilised tähelepanekud**

30. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmataks valutul hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (37).

**Kehamass**

31. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

**TULEMUSTE ARVUTAMINE**

32. Iga katserühma tulemused väljendatakse stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul tuletatakse SI, jagades iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmise DPMi hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise DPM-iga hiire kohta. Keskmise SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral saadakse SI, jagades iga katserühma ühendatud radioaktiivsuse imendumise ühendatud kandeaine-kontrollrühma imendumisega; selle tulemuseks on keskmine SI.
33. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 3. Kuid piiripealse tulemuse positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (4, 5, 6).
34. Kui saadud tulemust on vaja selgitada, tuleks arvesse võtta uuritava aine omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilsaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites 7.
35. Radioaktiivsuseandmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalajamisega (nn võõrväärtused).

▼ **M3****ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

36. Andmed tuleb koondada tabelisse. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul esitatakse üksiklooma DPMi väärtus, rühma keskmine suhte DPM/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral esitage keskmine DPM / mediaan-DPM ja keskmine SI iga annuserühma jaoks, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

**Katseprotokoll**

37. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

uuritav aine ja kontrollaine:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalised-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus;

katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväärsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli andmed;

▼ M3

- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriprotokoll ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- iga katserühma DPMi väärtused ja SI väärtused tabelina iga üksiku hiire kohta (üksiku katselooma lähenemisviisi) või keskväärtus/mediaan (katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi);
- iga katserühma DPMi/hiire keskväärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

## KIRJANDUS

- 1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165–169.
- 3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13–31.
- 4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- 5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- 6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- 7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.

## ▼ M3

- 8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49–59.
- 9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258–273.
- 10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274–286.
- 11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249–257.
- 12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)
- 13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281–284.
- 16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.
- 17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Vt [http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC26\\_statement\\_rLLNA\\_20070525-1.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf)
- 18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- 19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)

## ▼ M3

- 20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- 21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- 22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- 23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- 24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- 25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Vt [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- 26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- 27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>
- 28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- 29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- 30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- 31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- 32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- 33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- 34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- 35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>



**▼ M3**

- 36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)
- 37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

▼ **M3***1. liide***Naha sensibiliseerimise määramiseks pakutava samalaadse või muudetud LLNA katsemeetodi tulemuslikkusnõuded****SISSEJUHATUS**

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi katsemeetodeid, nii kaitstud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsemata meetodeid, saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude samalaadsete, samadele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (14).
2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemeetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (14).
3. Käesoleva katsemeetodi alusel kavandatud ja kasutamiseks esitatud menetlusi tuleks hinnata, et määrata kindlaks nende usaldusväärsus ja täpsus kõikide ainete puhul, mis esindavad kogu LLNA hinneteskaalat. Katseloomade põhjendamatu kasutamise vältimiseks soovitatakse tungivaltp, et mudelite väljatöötajad peaksid nõu asjaomaste asutustega, enne kui alustavad käesolevas katsemeetodis esitatud tulemuslikkusnõuete ja suuniste kohaseid valideerimisuuringuid.
4. Tulemuslikkusnõuded põhinevad USA alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (US-ICCVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskuse (JaCVAM) ühtlustatud tulemuslikkusnõuetel (12), mille alusel hinnatakse LLNA samalaadsete või muudetud versioonide valideeritust. Tulemuslikkusnõuded koosnevad katsemeetodite olulisematest osadest, soovitatavatest võrdluskemikaalidest ning täpsus- ja usaldatavusnõuetest, millele pakutav meetod peaks vastama või mida ta peaks ületama.

**I. Katsemeetodi olulised osad**

5. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi tööpõhimõttelise ja teostusliku analoogia tagamiseks LLNaga ning sama bioloogilise mõju mõõtmiseks peaksid katse-eeskirjas olema järgmised osad:

— uuritavat ainet tuleks paikseltp kanda hiire mõlemale kõrvalestale;

— tuleks mõõta lümfotsüütide vohamist lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise kohta;

— lümfotsüütide vohamist tuleks mõõta naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal;

**▼ M3**

- uuritavate ainete puhul peaks valitav annus olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus. Positiivsete võrdluskemikaalide puhul peaks suurim annus olema vähemalt sama suur kui asjaomase võrdluskemikaali EC3 väärtus LLNA puhul (vt tabel 1), mille puhul ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus;
- igas uuringus peaks olema paralleelne kandeaine-kontrollrühm ja vajaduse korral ka positiivse kontrolli rühm;
- igas annuserühmas tuleks kasutada vähemalt nelja katselooma;
- võib koguda andmeid kas üksiku katselooma kohta või katseloomade ühendatud andmeid.

Kui mõni neist kriteeriumidest ei ole täidetud, ei saa siin esitatud tulemuslikkusnõudeid kasutada samalaadse või muudetud meetodi valideerimiseks.

**II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu**

6. US-ICCVAMi, EC-ECVAMi ja JaCVAMi ühtlustatud tulemuslikkusnõuetes (12) on esitatud 18 võrdluskemikaali kui miinimumhulk, mida tuleks kasutada, ja neli valikulist võrdluskemikaali (need on ained, mis andsid LLNaga kas valepositiivne või -negatiivne, kui võrrelda neid inimesel ja meriseal saadud tulemustega (B.6 ehk OECD katsejuhend 406) (13), ning seepärast võimaldavad need näidata LLNaga võrreldavat või paremat tulemuslikkust), mis on võetud LLNA tulemuslikkusnõuetesse. Osutatud kemikaalide välja-valimise kriteeriumid olid järgmised:
  - võrdluskemikaalide loendis on esindatud aineklassid, mida tavaliselt uuritakse naha sensibiliseerimise suhtes ja mille immuunvastus on vahemikus, mida LLNaga saab mõõta või ennustada;
  - kõigi ainete keemiline ehitus on hästi teada;
  - iga aine jaoks on olemas meriseal saadud LLNA andmed (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ning (kus võimalik) inimesel saadud andmed ning
  - kõik ained on kaubanduses hästi kättesaadavad.

Soovitatud võrdluskemikaalid on loetletud tabelis 1. Uuringutes, milles soovitatud võrdluskemikaale kasutatakse, tuleks hindamiseks kasutada võrdluskemikaale samades kandeainetes, millega need on loetletud tabelis 1. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid aineid, mis vastavad loetletud valikukriteeriumidele, ja tuleb esitada vajalik põhjendus.

Tabel 1

## LLNA tulemuslikkusnõuete jaoks soovitatud võrdluskemikaalid

Jrk-nr	Kemikaal <sup>(1)</sup>	CASi nr	Vorm	Veh <sup>(2)</sup>	EC3 % <sup>(3)</sup>	N <sup>(4)</sup>	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
1	5-kloro-2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (CMI)/2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (MI) <sup>(5)</sup>	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenüleendiamiin	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	koobalkloriid	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenool	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	tsitraal	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenool	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenüülbensoaat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	kaneelalkohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	metüülmetakrülaad	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	klorobenseen	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/(*)
15	isopropanool	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+

## ▼ M3

Jrk-nr	Kemikaal <sup>(1)</sup>	CASi nr	Vorm	Veh <sup>(2)</sup>	EC3 % <sup>(3)</sup>	N <sup>(4)</sup>	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
16	piimhape	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
17	metüülsalitsülaad	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	salitsüülhape	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-
Valikained, millega saab tõendada LLNaga võrreldes paremat tulemuslikkust										
19	naatriumlaurüülsulfaat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	etüleenglükoolidimetakrülaad	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14–56	NC	+/-	+/+
21	ksüleen	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/(**)	+/-
22	nikkeldikloriid	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Lühendid: AOO = atsetoon: oliiviõli (4: 1, v/v); CASi nr = Chemical Abstracts Service'i number; DMF = *N,N*-dimetüülformamiid; DMSO = dimetüülsulfoksiid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenseen; EC3 = hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on 3; GP = merisea katse tulemus (s.o B.6 või OECD katsejuhis 406) (13); HCA = heksüülkaneelaldehüüd; Liq = vedelik; LLNA = hiire paiksete lümfisõlmede katse tulemus (s.o B.42 või OECD katsejuhis 429) (1); MEK = metüületüülketoon; NA = ei ole kohaldatav, kuna stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3; NC = ei ole arvatud, kuna andmed on saadud üheainsa uuringuga; Sol = tahke aine; Veh = kandeaine.

(\*) Oletatakse, et inimese puhul ei ole sensibilisaator, kuna inimnaha tükikese katsete kliinilisi tulemusi ei ole leitud, kõnealust ainet ei ole inimnaha tükikese allergeniide kompleksis ja ei ole teatatud ühestki juhtumist, kus aine oleks sensibiliseerinud inimest.

(\*\*) Merisea andmed ei ole kättesaadavad.

<sup>(1)</sup> Kemikaalid tuleks valmistada iga päev, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

<sup>(2)</sup> Kuna LLNA tulemuslikkust võib mõjutada erinev kandeaine, tuleb kasutada iga võrdluskemikaali jaoks soovitatud kandeainet (24, 32).

<sup>(3)</sup> Keskväärtus, kui kättesaadav on rohkem kui üks EC3 väärtus. Negatiivsete ainete (st mille stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3) puhul on esitatud kõrgeim uuritud kontsentratsioon.

<sup>(4)</sup> Andmete allikana kasutatud LLNA uuringute arv.

<sup>(5)</sup> Kaubanduses kättesaadav nimetus Kathon CG all (CASi nr 55965-84/9), mis on CMI ja MI segu vahekorras 3: 1. Komponentide suhtelised kontsentratsioonid on vahemikus 1,1–1,25 % CMI ja 0,3–0,45 % MI. Inaktiivsed komponendid on magneesiumisoolad (21,5–24 %) ja vasknitraat (0,15–0,17 %), ülejäänud osa on vesi (74–77 %). Kathon CGd saab osta Sigma-Aldrichi ning Rohm and Haas'i (nüüd Dow Chemical Corporation) kaudu.

▼ **M3****III. Kindlaksmääratud usaldusväärsus- ja täpsusnõuded**

7. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi täpsus peaks vastama 18 kohustuslikult kasutatava võrdluskemikaali puhul LLNA tulemuslikkusnõuetele või ületama LLNA täpsust. Uus või muudetud meetod peaks võimaldama õige klassifitseerimise jah-või-ei-otsuse alusel. Kuid uus või muudetud meetod ei tarvitse võimaldada õigesti klassifitseerida kõiki kohustuslikku miinimumkogumisse kuuluvaid võrdluskemikaale. Kui näiteks üks nõrkadest sensibiliseerijatest klassifitseeritakse valesti, tuleks samaväärsuse tulemuslikkuse tõendamiseks kaaluda vale klassifitseerimise põhjenduse ja sobivate lisaandmete esitamist (näiteks katsetulemused, millega saadakse õige klassifikatsioon muude ainete puhul, mille füüsilised, keemilised ja sensibiliseerivad omadused samanevad valesti klassifitseeritud aine omadega). Sellisel juhul hinnatakse uue või muudetud LLNA-meetodi valideerituse staatust konkreetsete juhtude alusel.

*Laborisisene reprodutseeritavus*

8. Laborisisese reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. Seepärast on LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel aluseks heksüülkaneelaldehüüdi (HCA) korduva mõõtmise tulemuste varieeruvus. Laborisisese usaldusväärtsuse hindamiseks tuleb saada HCA hinnangulise lävikonsentratsiooni (EC<sub>t</sub>) väärtused neljast eraldi katsest, mis tehakse vähemalt nädalase vahega katsete vahel. Laborisisene reprodutseeritavus on vastuvõetav, kui laboris suudetakse iga HCA katse puhul saada EC<sub>t</sub> väärtused vahemikus 5–20 %, mis vastab 10 % HCA jaoks LLNaga kindlaks tehtud EC<sub>3</sub> vahemikule poolest keskväärtsusest kuni kahekordse keskväärtsuseni (vt tabel 1).

*Laboritevaheline reprodutseeritavus*

9. Laboritevahelise reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades kahte sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel on aluseks HCA ja 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) mõõtmise tulemuste varieeruvus eri laborites. EC<sub>t</sub> väärtused tuleks määrata sõltumatult ühest uuringust, mis tehakse vähemalt kolmes eri laboris. Vastuvõetava laboritevahelise reprodutseeritavuse tõendamiseks peaks iga labor saama HCA puhul EC<sub>t</sub> väärtused vahemikus 5–20 % ja DNCB puhul vahemikus 0,025–0,1 %, mis vastab kindlakstehtud EC<sub>3</sub> vahemikule poolest keskväärtsusest kuni kahekordse keskväärtsuseni; LLNaga määratud keskväärtsus on HCA puhul 10 % ja DNCB puhul 0,05 % (vt tabel 1).

▼ **M3**

## 2. liide

**Mõisted**

*Täpsus:* katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (14).

*Võrdlusaine:* sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

*Hinnanguline lävikontsentratsioon (ECt):* uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mis põhjustab sellise stimulatsiooniindeksi, mis tõendab positiivse immuunvastuse olemasolu.

*Hinnanguline SI 3 kontsentratsioon (EC3):* uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on kolm.

*Valenegatiiv:* uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

*Valepositiiv:* uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

*Oht:* kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

*Laboritevaheline reprodutseeritavus:* suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (14).

*Laborisisene reprodutseeritavus:* suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (14).

*Mina-kah-meetod:* kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodiga. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi samalaadsete katsemeetodite puhul (14).

*Võõrväärtus:* võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

*Tulemuslikkusnõuded:* valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnase meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgest valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (14).

*Kaitstud katsemeetod:* katsemeetod, mille kasutamine ja levitamine on piiratud patente, autoriõiguse, kaubamärgi vm sellisega.

**▼ M3**

*Kvaliteedi tagamine:* juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikuteist sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korraist kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

*Võrdluskemikaalid:* valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusvalade puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (14).

*Asjakohasus:* mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalise) kaalutlusi (14).

*Usaldusväärsus:* mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (14).

*Naha sensibiliseerimine:* immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontakt sensibiliseerimiseks.

*Stimulatsioonindeks (SI):* arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

*Uuritav aine (uuritav kemikaal):* iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

*Valideeritud katsemeetod:* katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (14).



**▼B****B.43. NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL****1. MEETOD**

Käesolev meetod on samaväärne OECD TG 424ga (1997).

Käesolev katsemeetod on välja töötatud sellise teabe saamiseks, mis on vajalik kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse kinnitamiseks või täiendavaks iseloomustamiseks täiskasvanud loomadel. Seda saab kombineerida olemasolevate, korduva annusega toksilisuse uuringute katsemeetoditega või sooritatakse eraldi uuringuna. On soovitatav, et OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiaid ja meetodeid käsitleva juhisdokumendi (1) osas peetaks nõu, et aidata välja töötada käesoleval katsemeetodil põhinevaid uuringuid. See on eriti tähtis siis, kui võetakse arvesse käesoleva meetodi rutiinseks kasutamiseks soovitatud vaatluste ja katsemenetluste muudatusi. Juhisdokument on koostatud, et hõlbustada muude, teatavates olukordades kasutatavate katsemenetluste valikut.

Käesoleva meetodi abil ei hinnata arenguga seotud neurotoksilisust.

**1.1 SISSEJUHATUS**

Kemikaalide toksiliste omaduste hindamisel on oluline arvesse võtta võimalikke neurotoksilisi mõjusid. Juba korduvate annustega süsteemset toksilisust uuriv katsemeetod hõlmab vaatlusi, mis skriinivad võimalikku neurotoksilisust. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada sellise uuringu väljatöötamiseks, mille abil saadakse lisateavet või kinnitust täheldatud neurotoksiliste mõjude kohta korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringutes. Kemikaalide teatavate klasside võimaliku neurotoksilisuse arvessevõtmine võib viidata sellele, et neid võib sobivamalt hinnata, kasutades meetodid ilma eelnevalt korduva annusega neurotoksilisuse uuringutest saadud võimalike neurotoksilisuse märkideta. Selliste kaalutluste hulka kuuluvad nt:

— neuroloogiliste märkide või neuropatoloogiliste kahjustuste jälgimine muudes toksilisuse uuringutes kui korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringud või

— struktuuriline samalaadsus või muu teave, mis seob kemikaalid tuntud neurotoksiliste ainetega.

Lisaks sellele võib olla muid näiteid, kui käesoleva katsemeetodi kasutamine on vajalik, vt täiendavad üksikasjad viites (1).

Käesolev meetod on välja töötatud selliselt, et seda saab kohandada vastavalt erilistele vajadustele, mis kinnitavad kemikaalide teatavat histopatoloogilist ja käitumusega seotud neurotoksilisust ning iseloomustavad ja kvantifitseerivad neurotoksilisi reaktsioone.

**▼B**

Varem võrdsustati neurotoksilisust neuropaatiaga, millega kaasnevad neuropatoloogilised kahjustused või neuroloogilised väärtatlitlused nagu atakk, halvatus või värin. Kuigi neuropaatia on neurotoksilisuse tähtis ilming, on nüüd selge, et on palju muid närvisüsteemi mürgistusnähte (nt motoorse koordinaatsiooni kadumine, sensoorsed puudujäägid, õppimis- ja mäluhäired), mida ei pruugita kajastada neuropaatias või muud liiki uuringutes.

Käesolev neurotoksilisust uuriv katsemeetod on välja töötatud närvikäitumis- ja neuropatoloogiliste häirete tuvastamiseks täiskasvanud närilistel. Kuigi käitumishäired, isegi juhul, kui morfoloogilised muutused puuduvad, võivad peegeldada negatiivset mõju organismile, ei ole mitte kõik käitumismuutused närvisüsteemile omased. Seetõttu tuleks täheldatud muutusi hinnata koostoimes nii korrelatiivsete histopatoloogiliste, hematoloogiliste või biokeemiliste andmetega kui ka muud süsteemse toksilisuse liiki käsitlevate andmetega. Käesoleva meetodiga ettenähtud neurotoksiliste reaktsioonide iseloomustamiseks ja kvantifitseerimiseks tehtav uurimine hõlmab histopatoloogilisi ja käitumisega seotud menetlusi, mida võivad toetada elektrofüsioloogilised ja/või biokeemilised uuringud (1, 2, 3, 4).

Neurotoksilised ained võivad toimida närvisüsteemi mitmetele osadele ja paljude mehhanismide kaudu. Kuna ükski katsesari ei ole võimeline põhjalikult hindama kõikide ainete neurotoksilist võimet, võib osutada vajalikuks kasutada muid *in vivo* või *in vitro* katseid, mis on omased täheldatud või ootuspärase neurotoksilisuse liigile.

Käesolevat katsemeetodit võib samuti kasutada koostoimes OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiat ja meetodeid käsitlevas juhisdokumendis (1) sätestatud juhistega, et töötada välja uuringud, mis on ette nähtud täiendavaks kirjeldamiseks või annus-reaktsiooni kvantifikatsiooni tundlikkuse suurendamiseks, et paremini hinnata täheldamata negatiivse mõju määra või kinnitaksid kemikaali teadaolevaid või kahtlustatavaid ohte. Näiteks võib välja töötada uuringud, millega neurotoksilisi mehhanisme identifitseeritakse ja hinnatakse või täiendatakse andmeid, mis on saadud juba põhiliste närvi-käitumis- ja neuropatoloogiliste vaatlusprotseduuride kasutamisel. Sellistes uuringutes ei ole vaja hankida andmeid, mis on saadud juba käesoleva meetodi poolt soovitatud standardmenetluste kasutamisel, kui sellised andmed on juba olemas ja neid ei peeta vajalikuks uuringu tulemuste tõlgendamisel.

Käesolev neurotoksilisuse uuring, kas eraldi või millegagi koos kasutades, annab sellist teavet, mida saab:

— kindlaks teha, kas närvisüsteem on alaliselt või pöörduvalt uuritud kemikaali tõttu kahjustatud;

— aidata kaasa selliste närvisüsteemi muutuste iseloomustamisele, mis on seotud kemikaalidega kokkupuutega ja aluseks oleva mehhanismi mõistmisele;

**▼B**

— kindlaks määrata annuse ja selle reaktsiooni ning aja ja reaktsiooni suhted, et hinnata täheldamata negatiivse mõju määra (mida saab kasutada kemikaalide ohutusksiteeriumide loomisel).

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Võib kasutada ka muid manustamismeetodeid (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitud protseduuride muutmist. Manustamismeetode valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute profiilist ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilistest teabest.

## 1.2. MÕISTED

**Kahjulik mõju** – selline töötlemisega seotud muutus algstasemest, mis vähendab organismi võimet ellu jääda, sigida või kohaneda keskkonnaga.

**Annus** – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse massina (g, mg) või katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg kg kohta) või konstantsete toidukontsentratsioonidega (ppm).

**Annustamine** – üldmõiste, mis hõlmab annust, annustamise sagedust ja kestust.

**Neurotoksilisus** – negatiivne muutus närvisüsteemi struktuuris ja funktsioonis, mis tuleneb kemikaali, bioloogilise või füüsilise mõjuriitega kokkupuutest.

**Neurotoksiline aine** – kemikaal, bioloogiline või füüsiline mõjur, mis võib põhjustada neurotoksilisust.

**NOAEL** – lühend täheldamata-kahjuliku-mõju määra kohta ja see on kõrgeim annusmäär, kus ei ole täheldatud kahjulikke, katsetegemisega seotud leide.

## 1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katsekemikaali manustatakse suu kaudu erinevat annustena laborinäiliste mitmele rühmale. Korduvad annused on tavaliselt eeldatud, ning annustamisrežiim võib olla 28 päeva, subkrooniline 90 päeva või krooniline üks aasta või kauemgi. Käesolevas katsemeetodis sätestatud menetlusi võib samuti kasutada ägeda neurotoksilisuse uurimiseks. Loomi uuritakse, et tuvastata või iseloomustada käitumise ja/või neuroloogilisi kõrvalekaldeid. Igal vaatlusperioodil hinnatakse neurotoksiliste ainete mõjutatud hulka kattumisi. Katse lõpus osale loomadest (igas katserühmast, mõlemast soost) tehakse *in situ* perfusioon ning ajast, seljaajast ja perifeersetest närvidest prepareeritakse lõiked ja neid uuritakse.

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga neurotoksilisuse skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada igast rühmast loomi, keda ei kasutatud perfusioonil ja hiljem histopatoloogilisel uuringul (vt tabel 1), teatavate närvi-käitumis-, neuropatoloogilistel, neurokeemilistel või elektrofüsioloogilistel protseduuridel käesoleva meetodi (1) poolt nõutavatest standarduuringutest saadud andmete täiendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilisuse teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib kasutada allesjäänud loomi sellistel hindamistel, mis on ette nähtud näilistega tehtavate korduva annusega toksilise uuringute katsemeetodites.

**▼B**

Kui käesoleva katsemeetodi protseduure kombineeritakse muude katsemeetodite protseduuridega, on vaja piisavalt loomi mõlemate uuringute vaatluste nõuete rahuldamiseks.

**1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS****1.4.1. Loomaliikide valik**

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib põhjenduse korral kasutada ka näriliste teisi liike. Rakendatakse noorte täiskasvanute ja tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Annustamist tuleks alustada tavaliselt nii kiiresti kui võimalik pärast võõrutamist, soovitatavalt mitte enne, kui loomad on kuuenädalased, ja igal juhul enne, kui loomad on üheksanädalased. Kui käesolevat uuringut siiski kombineeritakse muude uuringutega, on vaja kohandada vanusenõuet. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada  $\pm 20\%$  iga soo keskmisest massist. Kui tehakse korduva annusega lühiajaline uuring pikaajalise uuringu alguuringuna, tuleks kasutada mõlemas uuringus samast liinist ja sama päritolu loomi.

**1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused**

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema  $22\text{ °C}$  ( $\pm 3\text{ °C}$ ). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt  $30\%$  ja soovitatavalt ei ületa  $70\%$ , välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärgiks on seda hoida vahemikus  $50\text{--}60\%$ . Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Valju katkendlikku heli tuleks vältida. Toitmisel võib kasutada tavapärasest labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Toiduvalikut võib mõjutada vajadus tagada katseaine sobiv lisamine, kui katseainet manustatakse käesoleva meetodi abil. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades.

**1.4.3. Loomade ettevalmistamine**

Terved noored loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uuringu alustamist, et võimaldada laboritingimustega kohanemist.

**1.4.4. Manustamisviis ja annuste ettevalmistamine**

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Suu kaudu saab manustada sondi abil, toiduga, joogiveega või kapslitenä. Võib kasutada ka muid manustamisviise (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitatud protseduuride muutmist. Manustamisviisi valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute omadustest ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilisest teabest. Tuleks ära märkida põhjendus manustamisviisi valimiseks ning käesoleva meetodi protseduuride muudatuste tegemiseks.

**▼B**

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse katseaine sobivas kandeaines. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku muude kandealuste lahust/suspensiooni. Kandeaine toksilised omadused peaksid olema teada. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine omadusi: katseaine absorptsiooni, jaotamist, metabolismi või peetumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning loomade toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud.

**1.5. PROTSEDUURID****1.5.1. Loomade arv ja sugu**

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga, tuleks kasutada vähemalt 20 looma (10 emaslooma ja 10 isaslooma) igas annus- ja kontrollrühmas üksikasjalike kliiniliste ja funktsionaalsete vaatluste hindamiseks. Vähemalt viiele isasloomale ja viiele emasloomale, kes on valitud nimetatud 10 isaslooma ja 10 emaslooma hulgast, teha perfusioon in situ ja kasutada neid üksikasjalikus neurohistopatoloogilises uuringus katse lõpus. Juhul, kui vaadeldakse üksnes piiratud arvu antud annusrühmas olevaid loomi neurotoksiliste mõjude tunnuste osas, tuleks arvesse võtta nimetatud loomade lisamist nende hulka, kes valitakse perfusiooniks. Kui uuring tehakse koos korduva annusega toksilisuse uuringuga, tuleks kasutada piisavalt loomi mõlema uuringu eesmärkide täitmiseks. Loomade minimaalne arv iga rühma kohta erinevate uuringute kombinatsioonides on toodud tabelis 1. Kui osa loomades surmatakse uuringu kestel või suunatakse toibuvatest loomadest koosnevasse rühma toksiliste mõjude pöördumise, püsivuse või hilisema esinemise vaatlemiseks katse järel või kui kaalutakse täiendavaid vaatlusi, siis tuleks suurendada loomade arvu, tagamaks, et vaatluseks ja histopatoloogilisteks uuringuteks oleks kättesaadav nõutav arv loomi.

**1.5.2. Katse- ja kontrollrühm**

Tuleks kasutada vähemalt kolme katse- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamisel ei eeldata ühtegi mõju korduva annusega 1 000 mg/kg kehmassi kohta päevas, võib teha piirkatse. Kui puuduvad sobivad andmed, tuleks teha annuse piirkonna määramise katse, et aidata kindlaks määrata kasutatavaid annuseid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet. Kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel, peaks kontrollrühm saama kandeainet suurima kasutatud kogusena.

**1.5.3. Usaldusväärsuse kontroll**

Uuringut teostav labor peaks esitama andmed oma võime kohta teostada uuringut ja kasutatud protseduuride tundlikkuse kohta. Sellised andmed peaksid tõendama võimet tuvastada ja kvantifitseerida muutusi lõpp-punktides, mille vaatlemist soovitatakse. Nendeks on autonoomsed sümptomid, sensoorne reaktiivsus, jäseme haarded ja motoorne aktiivsus. Teave kemikaalide kohta, mis põhjustavad erinevat liiki neurotoksilisi reaktsioone ja mida võib kasutada positiivsete kontrollainetena, võib leida viidetes 2–9. Varasemaid andmeid võib kasutada, kui katsemenetluste olulised aspektid jäävad samaks. Varasemate andmete perioodiline ajakohastamine on soovitatav. Protseduuride jätkuvat tundlikkust tõendavad uued andmed tuleks luua, kui katset sooritav labor on muutnud katsetegemise mõningaid olulisi osasid või menetlusi.

**▼B****1.5.4. Annuse valik**

Annusemäärade valimisel tuleks võtta arvesse kõiki katseühendi või sellega seotud ainete saadaolevaid varem saadud toksilisuse ja kineetilisi andmeid. Kõrgeim annusemäär tuleks valida eesmärgiga põhjustada neurotoksilisi mõjusid või selgeid süsteemseid toksilisi mõjusid. Tuleks valida annusmäärade alanev järjestus, eesmärgiga näidata annusega seotud reaktsiooni ja mittetäheldatud kahjulikku mõju (NOAEL) väikseima annusemäära puhul. Põhimõtteliselt tuleks annusemäärad kehtestada nii, et saaks eristada algseid toksilisi mõjusid närvisüsteemile süsteemse toksilisusega seotud mõjust. Kahe- või kolmekordsed vahemikud on sageli optimaalsed ning sageli on eelistatud neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Kui inimese vastuvõtlikkuse kohta on olemas mõistlik hinnang, tuleks seda arvesse võtta.

**1.5.5. Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 1 000 mg kg kehamassi kohta, kasutades kirjeldatud protseduure, ei põhjusta täheldatavaid neurotoksilisi mõjusid ja kui toksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Inimeste ootuspärane kokkupuude võib viidata piirkatses kasutatavatest suukaudsetest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele. Muude manustamisviiside korral, nagu näiteks sissehingamine või naha kaudu manustamine, võivad katseaine füüsikalised-keemilised omadused tihti viidata suurimale kokkupuutetasemele. Ägeda suukaudse uuringu tegemiseks peaks piirkatse annus olema vähemalt 2 000 mg/kg.

**1.5.6. Annuste manustamine**

Loomadele annustatakse katseainet kord päevas, seitse päeva nädalas, vähemalt 28 päeva; viiepäevase annustamisrežiimi või lühema kokkupuute perioodi kasutamist on vaja põhjendada. Katseainet manustatakse ühekordse annusena sondi abil söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suuruselt. Kogus ei tohiks ületada 1 ml/100 g kehamassi kohta. Vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

Toidu või joogivee kaudu manustatud ainete puhul on oluline tagada, et hõlmatud katseaine kogused ei häiriks tavapärasest toitumist või veetasakaalu. Kui katseainet manustatakse toiduga kas püsiva toidukontsentratsioonina (ppm) või võidakse kasutada püsivat annusemäära looma kehamassi suhtes, siis tuleb täpsustada kasutatud alternatiivi. Sondi kaudu manustatud aine puhul tuleks annus anda samal kellaajal iga päev ja kohandada vähemalt igal nädalal, et säilitada konstantne annusemäär looma kehamassi suhtes. Kui korduva annusega uuringut tehakse pikaajalise uuringu alguuringuga, tuleks kasutada mõlemas uuringus sama toitu. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, manustatakse annust väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

**▼B**

## 1.6. VAATLUSED

1.6.1. **Vaatluste ja katsete sagedus**

Korduva annusega uuringutes peaks vaatlusperiood hõlmama annustamisperioodi. Akuutsetes uuringutes tehakse vaatlusi katse järel 14 päeva. Satelliitrühma kuuluvate loomade puhul, keda hoitakse kokkupuutumise eest katsejärgsel perioodil, peaks vaatlused hõlmama sama perioodi.

Vaatlusi tuleks teha piisavalt sageli, et suurendada mis tahes käitumisega seotud ja/või neuroloogiliste kõrvalekallete tuvastamise tõenäosust. Vaatlusi peaks tegema soovitatavalt sama ajal iga päev, võttes arvesse oodatavate mõjude kõrghetke pärast annustamist. Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus on esitatud kokkuvõtlikult tabelis 2. Kui varasematest uuringutest saadud kineetilised või muud andmed viitavad vajadusele kasutada erinevaid vaatlus-, katse- või vaatlusjärgseid aja hetki, tuleks vastu võtta alternatiivne ajakava maksimaalse teabe saamiseks. Ajakava muudatuste kohta tuleks esitada põhjendus.

1.6.1.1. *Üldise tervisliku seisundi ja suremuse/haigestumuse vaatlused*

Kõiki loomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemal kord päevas nende tervisliku seisundit arvesse võttes ning vähemalt kaks korda päevas haigestumuse ja suremuse osas.

1.6.1.2. *Üksikasjalikud kliinilised vaatlused*

Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha kõikide loomade kohta, kes on valitud sel eesmärgil (vt tabel 1), üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada sama katselooma käsitlevaid võrdlusi) ja seejärel erinevate ajavahemike tagant, sõltuvalt uuringu kestusest (vt tabel 2). Üksikasjalikud kliinilised vaatlused toibuvate loomade satelliitrühmade kohta tuleks teha toibumisperioodi lõpus. Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha looma oma puurist väljaspool standardalal. Neid peaks hoolikalt registreerima, kasutades punktisüsteeme, mis hõlmavad kriteeriume või punktiskaalasid iga vaatluse käigus tehtava mõõtmise kohta. Kasutatavad kriteeriumid või skaalad tuleks selgesõnaliselt määratleda katselabori poolt. Tuleb püüda tagada, et muutused katsetingimustes oleksid minimaalsed (mitte süsteemselt seotud katsega) ning et vaatlusi teeks koolitatud vaatlejad, kes ei ole teadlikud tegelikust käsitlemisest.

On soovitatav, et vaatlusi tehtaks struktuurselt, et täpselt määratletud kriteeriume (kaasa arvatud määratlus „normaalne vahemik“) kohaldatase süsteemselt iga looma suhtes igal vaatlusel. Normaalne vahemik tuleks adekvaatselt dokumenteerida. Kõik täheldatud sümptomid tuleks registreerida. Kui see on teostatav, tuleks registreerida ka täheldatud sümptomite suurus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama, kuid mitte ainult, naha, karvkatte, silmade, limaskestade, eritiste esinemise ja autonoomse aktiivsuse (nt pisaravool, piloereksioon, pupilli suurus, ebatavaline hingamismudel ja/või suu kaudu hingamine (lõõtsutamine), kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid ning uriini värvumine) muutusi.

▼B

Kõik ebatavalised reaktsioonid seoses kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standarddala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordineerimisega tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt kүүrus selg) ning käsitlemise, asetamise või muude keskkonnaga stiimulitega seotud reaktiivsuses ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või väärinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane sugemine, ebatavalised pea liigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või ülemäärane lakkumine, enesesandistamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.

1.6.1.3. *Funktsionaalsed katsed*

Sarnaselt üksikasjalikele kliinilistele vaatlustele, tuleks funktsionaalsed katsed samuti teostada üks kord enne kokkupuudet ja seejärel sageli kõiki loomadega, kes on sel eesmärgil välja valitud (vt tabel 1). Funktsionaalsete katsete tegemise sagedus on samuti sõltuv uuringu kestuses (vt tabel 2). Lisaks tabelis 2 sätestatud vaatlusperioodidele tuleks funktsionaalsed vaatlused toibuvate loomade satelliitühmade suhtes samuti teha võimalikult lähedal lõplikule surmamisele. Funktsionaalsetes katsetes peaks käsitlema sensoorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptoorseid stiimulid (5, 6, 7)), jäseme haardejõu hindamine (8) ja motoorse tegevuse hindamine (9). Motoorset tegevust tuleks mõõta automaatseadme abil, mis on võimeline avastama nii tegevuse vähenemise kui suurenemise. Kui kasutatakse muud kindlaksmääratud süsteemi, peaks see olema kvantitatiivne ning selle tundlikkus ja usaldusväärsus peaksid olema tõendatud. Iga seadet tuleb testida selle usaldusväärsuse tagamiseks aja jooksul ja seadmete vastavuse tagamiseks. Järgitavate protseduuride täiendavad üksikasjad on toodud vastavates viidetes. Kui puuduvad andmed (nt struktuuraktiivsus, epidemioloogilised andmed, muud toksikoloogilised uuringud), mis viitaksid võimalikele neurotoksiilsete mõjudele, tuleks kaaluda sensoorseid ja motoorseid funktsioone või õppimist ja mälu uurivate täpsemate katsete lisamist nimetatud võimalike mõjude uurimiseks üksikasjalikumalt. Viites 1 on esitatud rohkem teavet täpsemate katsete ja nende kasutamise kohta.

Erandkorras, loomad, kel ilmnevad mürgistusnähud sellises ulatuses, et see oluliselt häiriks funktsionaalse katse sooritamist, võib katsest välja jätta. Tuleks esitada loomade funktsionaalsest katsest väljajätmise põhjendus.

1.6.2. **Kehamass ja toidu/vee tarbimine**

Kuni 90päevaste uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kord nädalas ja mõõtmisi tuleks teha toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) vähemalt kord nädalas. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks kaaluda kõiki loomi vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel vähemalt kord iga 4 nädala tagant. Mõõtmisi toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) tuleks teha vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel ligikaudu kolmekuuliste intervallide tagant, välja arvatud juhul, kui tervislik seisundi või kehamassi muutumine näeb ette teisiti.



**▼ B****1.6.3. Oftalmoloogia**

Pikemate kui 28päevaste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring, kasutades oftalmoskoopi või samalaadset sobivat instrumenti, enne katseaine manustamist ja katse lõpetamisel, eelistatavalt kõikide loomadega, kuid vähemalt loomadega, kes on suure annusemääraga või kontrollrühmades. Kui avastatakse muutused silmades või kui kliinilised tunnused viitavad selle vajadusele, tuleks uurida kõiki loomi. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring 13 nädala jooksul. Oftalmoloogilisi uuringuid ei ole vaja teha, kui selle kohta on juba olemas andmed, mis on saadud muudest, sarnase kestusega ja samalaadse annusemääraga uuringutest.

**1.6.4. Hematoloogia ja kliiniline biokeemia**

Kui neurotoksilisuse uuring tehakse koos korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringuga, tuleks teha hematoloogilised uuringud ja kliinilise biokeemia määramised vastavalt süsteemse toksilisuse uuringu asjaomasele meetodile. Proove tuleks koguda selliselt, et vähendatakse kõiki võimalikke mõjusid neuroloogilisele käitumisele.

**1.6.5. Histopatoloogia**

Neuropatoloogiline uuring tuleks välja töötada uuringu *in vivo* etapis tehtud vaatluste täiendamiseks ja laiendamiseks. Proovid vähemalt viie looma kudetest soo ja rühma kohta (vt tabel 1 ja järgmine lõige) fikseeritakse *in situ*, kasutades üldtunnustatud perfusiooni- ja fiksatsioonitehnikat (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Kõik täheldatavad suured muutused tuleks registreerida. Kui uuringut teostatakse eraldi uuringuga neurotoksilisuse skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada ülejäänud loomi kas teatavate neuroloogilise käitumisega seotud (10, 11), neuropatoloogilistes (10, 11, 12, 13), neurokeemilistes (10, 11, 14, 15) või elektrofüsioloogilistes (10, 11, 16 17) protseduurides, mis võivad täiendada siin kirjeldatud protseduure ja uuringuid, või kasutada histopatoloogias uuritavate subjektide arvu suurendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilisuse (2, 3) teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib ülejäänud loomi samuti kasutada rutiinsetes patoloogilistes hindamistes, nagu on kirjeldatud korduvate annustega uuringute meetodis.

Kõik parafiini valatud koeproovid värvitakse üldise värvimisprotseduuri abil, nt hematoksüliin ja eosiin (H&E), ning neid uuritakse mikroskoopiliselt. Kui täheldatakse või kahtlustatakse perifeerse neuropaatia sümptomeid, tuleks uurida plastikusse valatud perifeerse närvikoe proove. Kliinilised tunnused võivad anda põhjust uute kohtade uurimisele või eriliste värvimismenetluste kasutamisele. Viidetes (3) ja (4) on antud juhised täiendavate uuringukohtade kohta. Samuti võivad sobivad erivärvid olla abiks teatud liiki patoloogilistele muutustele viitamisel (18).

**▼B**

Kesk- ja perifeerse närvisüsteemi representatiivsed lõike tuleks uurida histoloogiliselt (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Uuritavad alad peaksid tavaliselt sisaldama järgmist: eesaju, suuraju keskosa, sh hipokampi läbiv lõige, keskaju, väikeaju, ajusild, piklikaju, silm koos nägemisnärvi ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmetüve kohal, spinaalganglion, spinaal- ja ventraalnärvikiud, proksimaalne istmikunärv, proksimaalne säärenärv (põlves) ja säärenärvipoolsed sääremarjalihase harud. Seljaajust ja perifeersest närvist tehtavate lõigete hulka kuuluvad nii rist- kui pikilõiked. Tähelepanu tuleks pöörata närvisüsteemi veresoonestikule. Samuti tuleks uurida skeletilihastest, eelkõige sääremarjalihastest võetud proovi. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kohtadele, mille raku- ja kiustruktuur ja -tüüp on teatavasti eriti mõjutatud neurotoksiliste ainete poolt.

Viidetes 3 ja 4 on toodud selliseid neuropatoloogilisi muutusi käsitlev juhend, mida põhjustab kokkupuude toksiliste ainetega. Etapiviisiline koeproovide uuring on soovitatav, milles võrreldakse esmalt suure annusega rühma lõikeid kontrollrühma lõigetega. Kui ei ole täheldatud neuropatoloogilisi muutusi nimetatud rühmade proovides, ei ole vaja teha hilisemaid analüüse. Kui neuropatoloogilisi muutusi on täheldatud suure annusega rühmas, tuleks seejärel keskmete ja väikese annusega rühma igast võimalikust mõjutatud koest võetud proovid kodeerida ja hiljem neid uurida.

Kui leitakse tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta kvalitatiivses uuringus, siis tuleks teha teine uuring kõikides närvisüsteemi piirkondades, kus nimetatud muutused esinevad. Kõikide annuserühmade igast võimalikust mõjutatud piirkonnast võetud lõiked tuleks kodeerida ja neid tuleks uurida juhuslikult ilma koodi teadmata. Iga kahjustuse sagedus ja raskusaste tuleks registreerida. Pärast seda, kui kõikide annuserühmade kõiki piirkondi on hinnatud, saab koodi murda ja teha statistilise analüüsi annuse ja sellele reageerimise suhte hindamiseks. Erineva raskusastmega kahjustuse näiteid tuleks kirjeldada.

Neuropatoloogilisi leide tuleks hinnata käitumisega seotud vaatluste ja mõõtmiste kontekstis ning katseaine varasematest ja praegustest süsteemse toksilisuse uuringutest saadud muude andmete põhjal.

## 2. TULEMUSED

### 2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katse- või kontrollrühma puhul ära loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaanselt surmatud loomade arvu ning kõikide surmade või humaansete tapmistega aja, mürgistusnähtude arvu, täheldatud mürgistusnähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse, liigi ja raskuse, kahjustustega loomade arvu, sh kahjustus(t)e liik ja raskus.

**▼B**

## 2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Uuringu avastusi peaks hindama neuroloogiliste käitumisega seotud ja neuropatoloogiliste mõjude (neurokeemilised või elektrofüsioloogilised mõjud ning kui lisatakse täiendavad uuringud) esinemissageduse, raskuse ja korrelatsiooni osas ning kõikide muude negatiivsete mõjude osas. Võimaluse korral tuleks hinnata numbrilisi tulemuse sobiva ja üldiselt heakskiidetud statistilise meetodi abil Statistilised meetodid tuleks valida uuringu väljatöötamise ajal.

## 3. ARUANDLUS

## 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsiline laad (sh isomeersus, puhtus ja füüsikaliskemilised omadused);

— tunnusandmed.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendamine.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/liinid;

— loomade arv, vanus ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, kohanemine, toitumine jne;

— iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

— katseaine valmistise/toiduvalmistise üksikandmed, saavutatud kontsentratsioon, valmistise stabiilsus ja homogeensus;

— manustatavate annuste täpsustamine, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;

— katseaine manustamise üksikasjad;

— annusemäärade valiku põhjendus;

— põhjendus kokkupuute viise ja kestuse kohta;

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

Vaatlus ja katsemenetlused:

— üksikasjad igast rühmast loomade määramise kohta perfusiooni alamrühmadesse;

— punktisüsteeme käsitlevad üksikasjad, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste iga mõõtmise kriteeriumid ja punktiskaalad;

**▼B**

- üksikasjad funktsionaalsete katsete kohta, milles uuritakse sensorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptoorseid stiimulid); hinnatakse jäseme haardejõudu; hinnatakse mootorset tegevust (sh üksikasjad auto-maatseadmete kohta, mis avastavad tegevust); ja, muude käsutatavate menetluste kohta;
- üksikasjad oftalmoloogiliste uuringute kohta ja vajadusel hematoloogiliste uuringute ning kliinilise biokeemia katsete kohta ning asjaomase lähtetaseme väärtuste kohta;
- üksikasjad teatavate neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste menetluste kohta.

## Tulemused:

- kehamass/kehamassi muutused, sh kehamass surmamise hetkel;
- toidu ja vee tarbimine vajadusel;
- toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed ja annusemäär, sh toksilisuse või suremuse sümptomid;
- üksikasjalike kliiniliste vaatluste (pöörduvad või pöördumatud) olemuse, raskuse ja kestuse kohta (algusaeg ja edasine käik);
- funktsionaalsete katsete tulemuste üksikasjalik kirjeldus;
- lahangu leiud;
- vajadusel kõikide neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste ja neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta (kui seda on mõõdetud)
- vajadusel tulemuste statistiline töötlemine.

## Tulemuste arutelu:

- teave annuse ja sellele reageerimise kohta;
- muude toksiliste mõjude seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- täheldamata negatiivse mõju tase.

## Järeldused:

- uuritava kemikaali üldist neurotoksilisust käsitlevat erimärget soositakse.

## 4.

**VIITED**

- 1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
- 2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- 3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- 4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

**▼B**

- 5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999–1003.
- 6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691–704.
- 7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- 8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- 9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- 10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- 11) Chang, L.W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- 12) Broxup, B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689–695.
- 13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343–352.
- 14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 445–452.
- 15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368–378.
- 16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299–335.
- 17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726–742.
- 18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tabel 1

**Minimaalne loomade arv rühmas, kui neurotoksilisuse uuringut tehakse eraldi või koos muude uuringutega**

	NEUROTOKSILISUSE UURING, MIS ON TEHTUD:			
	eraldi uuringuna	kombineeritud 28päevase uuringuga	kombineeritud 90päevase uuringuga	kombineeritud kroonilise toksilisuse uuringuga
<i>Loomade koguarv rühma kohta</i>	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	15 isaslooma ja 15 emaslooma	25 isaslooma ja 25 emaslooma
Funktsionaalsete katsete, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste jaoks välja valitud loomade arv	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma
Perfusiooniks <i>in situ</i> ja neurohistopatoloogias valitud loomade arv	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma
Loomade arv, kes on välja valitud korduva annusega/subkroonilise/kroonilise mürgisuse vaatlustes, hematoloogias, kliinilises biokeemias, histopatoloogias jne, nagu on märgitud vastavates juhendites		5 isaslooma ja 5 emaslooma	10 isaslooma † ja 10 emaslooma †	20 isaslooma † ja 20 emaslooma †
Vajadusel täiendavad vaatlused	5 isaslooma ja 5 emaslooma			

† Sii rühma kuulub viis looma, kes on valitud funktsionaalseks katteks ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks neurotoksilisuse uuringu osana.



Tabel 2

## Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus

Vaatluste liik		Uuringu kestus			
		Äge	28päevane	90päevane	Krooniline
Kõikidel loomadel	üldine tervislik seisund	kord päevas	kord päevas	kord päevas	kord päevas
	suremus/haigestumus	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas
<i>Funktsionaalseteks vaatlusteks valitud loomadel</i>	<i>üksikasjalikud kliinilised vaatlused</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim</li> <li>— 7. ja 14. päeval pärast annustamist</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— seejärel kord nädalas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— kord esimese ja teise kokkupuute-nädala jooksul</li> <li>— seejärel kord kuus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— kord esimese kokkupuutekuu lõpus</li> <li>— seejärel iga kolme kuu tagant</li> </ul>
	Funktsionaalsed katsed	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim</li> <li>— 7. ja 14. päeval pärast annustamist</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— neljandal annustamis-nädalal võimalikult lähedal kokkupuute-perioodi lõpule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— kord esimese ja teise kokkupuute-nädala jooksul</li> <li>— seejärel kord kuus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— enne esimest kokkupuudet</li> <li>— kord esimese kokkupuutekuu lõpus</li> <li>— seejärel iga kolme kuu tagant</li> </ul>

**▼B****B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 427 (2004).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Paljude kemikaalidega puututakse kokku peamiselt naha kaudu, samas kui suurema osa toksikoloogiliste uuringute puhul manustatakse uuritavaid aineid katseloomadele suu kaudu. Käesolevas juhendis kirjeldatud *in vivo* nahakaudse imendumise uuring annab vajaliku seose, millega suukaudse manustamise uuringutest saab teha oletusi aine ohutuse kohta naha kaudu kokkupuutumisel.

Aine peab enne vereringesse jõudmist läbima suure hulga naharakude kihte. Enamiku ainete puhul määrab sissetungimise kiiruse sarvkiht (*stratum corneum*), mis koosneb surnud rakkudest. Naha läbilaskvus sõltub kemikaali lipofiilsusest ja epidermise välimise kihi paksusest ning ka sellistest teguritest nagu aine molekulmass ja kontsentratsioon. Üldiselt on rottide ja küülikute nahk kergemini läbitav kui inimnahk, samas kui merisigade ja ahvide naha läbitavus sarnaneb inimnaha omale.

Nahakaudse imendumise mõõtmise meetodeid saab jagada kahte kategooriasse: *in vivo* ja *in vitro*. *In vivo* meetod võib anda usaldusväärset teavet nahakaudse imendumise kohta eri liikide katseloomadel. Viimasel ajal on välja töötatud *in vitro* meetodeid. Nende puhul uuritakse aine tungimist läbi looma või inimese osalise või täispaksusega naha vedelikureservuaari. *In vitro* meetodit on kirjeldatud eraldi teise katsemeetodi all (1). Soovitav on tutvuda OECD juhenddokumendiga nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2); dokument aitab valida kõige sobivama meetodi igas konkreetses olukorras, kuna selles on esitatud rohkem üksikasju nii *in vivo* kui ka *in vitro* meetodi sobivuse kohta.

Käesolevas metoodikas kirjeldatud *in vivo* meetod võimaldab määrata uuritava aine tungimist läbi naha süsteemsesse vereringesse. Kõnealust meetodit on laialdaselt kasutatud palju aastaid (3, 4, 5, 6 ja 7). Kuigi paljudel juhtudel võivad sobida nahakaudse imendumise *in vitro* uuringud, võib esineda ka olukordi, kus ainult *in vivo* uuringuga on võimalik saada vajalikke andmeid.

*In vivo* meetodi eelis on füsioloogia ja metabolismi seisukohast täieliku süsteemi kasutamine, ühe loomaliigi kasutamine paljude toksilisusuuringute läbiviimiseks ja võimalus meetodit modifitseerida teiste loomaliikidega kasutamiseks. Puudusteks on elusloomade kasutamine, vajadus kasutada usaldusväärsete tulemuste saamiseks radioaktiivselt märgistatud materjali, raskused varase imendumise faasi kindlaksmääramisel ning eelistatava loomaliigi (rott) ja inimese naha läbilaskvuse erinevused. Loomade nahk laseb üldiselt aineid paremini läbi ja seetõttu võidakse imendumist läbi inimnaha üle hinnata (6, 8 ja 9). Leeliselisi/söövitavaid aineid ei tohiks elusloomadel katsetada.



**▼B**

## 1.2. MÄÄRATLUSED

**Imendumata kogus** – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

**Imendunud kogus (*in vivo*)** – kogus, mis leitakse uriinis, puuri pesemise vedelikus, roojas, väljahingatud õhus (kui seda mõõdetakse), veres, kudedes (kui neid kogutakse) ja ülejäänud korjuses pärast pealekandmiskoha naha eemaldamist.

**Imenduv kogus** – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

## 1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine, eelistatavalt radioaktiivselt märgistatud, kantakse looma paljaksügatud nahale ühes või enamas sobivas annuses tavaliselt kasutatava preparaadi kujul. Uuritav valmistis jäetakse ettenähtud ajaks nahaga kokkupuutesse sobiva katte all (mis võib kokkupuutekohta lihtsalt katta, pooltihedalt või tihedalt katta), et vältida uuritava valmistise allaneelamist. Kokkupuute lõppedes eemaldatakse kate ja nahk puhastatakse sobiva puhastusainega; kate ja puhastusmaterjal jäetakse analüüsimise jaoks alles ja pannakse uus kate. Loomi hoitakse enne kokkupuudet, selle ajal ja pärast seda metabolismi uurimise üksikpuurides ning nende perioodide väljaheidet ja väljahingatud õhk kogutakse analüüsimiseks. Väljahingatud õhu kogumise võib ära jätta, kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte. Iga uuringu jaoks võetakse tavaliselt mitu rühma loomi, kes viiakse kokkupuutesse uuritava valmistisega. Üks rühm surmatakse kokkupuuteperioodi lõpus. Teised rühmad surmatakse kindlaksmääratud ajavahemike järel pärast seda (2). Proovivõtuaja lõppedes surmatakse allesjäänud loomad, veri kogutakse analüüsimiseks, uuritava aine pealekandmise koht eemaldatakse analüüsimiseks ja korjust analüüsitakse eritumata materjali määramiseks. Proove analüüsitakse sobivate meetoditega ning hinnatakse nahkaudse imendumise taset (6, 8 ja 9).

## 1.4. MEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Loomaliigi valimine

Kõige sagedamini kasutatav loomaliik on rott, kuid kasutada võib ka karvavabasid liine ja liike, kellel nahkaudse imendumise kiirus sarnaneb enam inimese omale (viited 3, 6, 7, 8 ja 9). Kasutada tuleb noori terveid täiskasvanud loomi, kes on ühest soost (tavaliselt isased) ja kuuluvad tavaliselt kasutatavatesse laboriliinidesse. Uuringu alguses ei tohiks katselooma kehakaalu erinevus keskmisest kehakaalust ületada  $\pm 20\%$ . Näiteks on sobivad 200–250 g kaaluvad isasrotid, eriti selle vahemiku ülemisse poolde kuuluvad loomad.

**▼B****1.4.2. Loomade arv ja sugu**

Iga uuritava valmistise ja iga planeeritud lõpetamisaja kohta tuleb kasutada vähemalt nelja ühest soost looma. Iga loomade grupp surmatakse erinevate ajavahemike möödudes, näiteks kokkupuuteperioodi (tavaliselt 6 või 24 tundi) lõppedes ja sellele järgnevate ajavahemike järel (nt 48 ja 72 tunni möödudes). Kui on andmeid, et nahakaudne toksilisus isas- ja emasloomade suhtes on oluliselt erinev, tuleb valida tundlikum sugu. Kui selliseid andmeid ei ole, võib kasutada ükskõik kumba sugu.

**1.4.3. Pidamis- ja söötmingimused**

Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavalist laborisööta ja see peab olema vabalt kättesaadav koos piiramatul joogivee varuga. Uuringu ajal ja eelistatavalt ka aklimatiseerumise ajal on loomad metabolismi uurimise üksikpuurides. Kuna sööda ja vee sattumine puuri põrandale võib tulemusi rikkuda, tuleb püüda seda võimalust minimeerida.

**1.4.4. Loomade ettevalmistamine**

Loomad märgistatakse, et iga looma saaks identifitseerida, ja neid hoitakse enne uuringu algust puurides vähemalt viis päeva, et nad harjuksid laboritingimustega.

Pärast aklimatiseerumisperioodi ja umbes 24 tundi enne uuritava aine pealekandmist pügatakse igal loomal nahk õlgade ja selja piirkonnas paljaks. Kahjustatud naha läbilaskvus erineb terve naha omast, seepärast tuleb olla ettevaatlik ja vältida naha marrastamist. Pärast pügamist ja umbes 24 tundi enne uuritava aine kandmist nahale (vt punkti 1.4.7) puhastatakse naha pinda atsetooniga rasu eemaldamiseks. Lisapesu seebi ja veega ei soovitata, kuna seebi-jäägid võivad soodustada katseaine imendumist. Ala peab olema piisavalt suur, et võimaldada imendunud uuritava kemikaali koguse arvutamist naha cm<sup>2</sup> kohta, eelistatavalt vähemalt 10 cm<sup>2</sup>. Selline ala on saavutatav 200–250 g kaaluvatel rottidel. Pärast loomade ettevalmistamist pannakse nad tagasi metabolismi uurimise puuridesse.

**1.4.5. Uuritav aine**

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

**1.4.6. Uuritav valmistis**

Uuritava aine valmistis (st puhas aine, lahjendatud aine või segu, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peab olema sama, millega inimesed või võimalikud sihtloomaliigid võivad kokku puutuda (või aimama seda tõetruult järele). Kõiki kõrvalekaldeid tegelikult kasutatavast valmistisest tuleb põhjendada. Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas kandjas. Muude kandeainete kui vee puhul peavad olema teada imendumisomadused ja võimalik koostoime katseainega.

**▼B****1.4.7. Nahale kandmine**

Nahapinnal määratakse pealekandmise kohana kindlaks konkreetse suurusega ala. Teadaolev uuritava valmistise kogus kantakse seejärel ühtlaselt sellele alale. See kogus peaks reeglina järele aimama võimalikku kokkupuudet inimesel, tavaliselt 1–5 mg/cm<sup>2</sup> tahkete ainete või kuni 10 µl/cm<sup>2</sup> vedelike puhul. Muid koguseid tuleb põhjendada eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava valmistise füüsiliste omadustega. Pealekandmise järel tuleb seda kohta kaitsta, et loom ei saaks seda puhastada. Tüüpilise vahendi näide on esitatud joonisel 1. Tavaliselt kaitstakse pealekandmiskohta mittetiheda kattega (nt õhku läbilaskev nailonmarlist kate). Ent piiramatu annuse puhul tuleb pealekandmiskoht katta tiheda kattega. Kui pooleldi lenduva uuritava aine aurumine vähendab katseaine määramissaagist liiga palju (vt ka punkti 1.4.10 esimest lõiku), on aurunud aine vaja kinni püüda pealekandmisvahendi aktiivsöest filtrisse (vt joonis 1). On oluline, et vahend ei kahjustaks nahka, seoks katseainet ega reageeriks sellega. Loomad pannakse tagasi metabolismi uurimise üksikpuuridesse väljaheidete kogumiseks.

**1.4.8. Kokkupuute kestus ja proovide võtmine**

Kokkupuute kestus on ajavahemik uuritava aine pealekandmise ja nahalt pesemise teel eemaldamise vahel. Tuleb kasutada sobivat kokkupuuteaega (tavaliselt 6 või 24 tundi), arvestades inimese kokkupuute eeldatavat kestust. Kokkupuuteaja järel hoitakse loomi metabolismi uurimise puurides kuni planeeritud lõpetamisaiani. Loomi tuleb jälgida toksilisuse/ebanormaalsete reaktsioonide suhtes korrapäraste ajavahemike järel kogu uuringu jooksul. Kokkupuuteaja lõpus tuleb nahka vaadelda nähtavate ärritusnähtude suhtes.

Metabolismi uurimise puurid peavad võimaldama uriini ja rooja eraldi kogumist uuringu jooksul. Need peavad võimaldama ka <sup>14</sup>C-süsinikdioksiidi ja lenduvate <sup>14</sup>C-süsinikühendite kogumist, mida tuleb analüüsida, kui neid tekib suures koguses (> 5 %). Uriin, roe ja kogumisseadmesse jäänud gaasid (nt <sup>14</sup>C-süsinikdioksiid ja lenduvad <sup>14</sup>C-süsinikühendid) tuleb koguda eraldi igalt rühmalt igal proovide võtmise ajal. Kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte, võib kasutada avatud puure.

Väljaheidete kogutakse kokkupuuteperioodi ajal, kuni 24 tundi pärast esmast nahakontakti ja seejärel iga päev kuni katse lõpuni. Kolmest väljaheidete kogumise ajavahemikust tavaliselt piisab, ent valmistise uurimise eesmärgi või olemasolevaid kineetikaandmeid arvestades võib valida uuringu jaoks sobivamaid või täiendavaid aegu.

Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igalt loomalt kaitsevahend ja säilitatakse eraldi analüüsimise jaoks. Uuritava valmistisega kokkupuutes olnud nahka pestakse kõikidel loomadel vähemalt 3 korda puhastusvahendiga, kasutades sobivaid tampoone. Tuleb olla ettevaatlik, et mitte saastada teisi kehaosaid. Puhastusaine peab olema tavaline hügieenis kasutatav aine, nt seebi vesilahus. Lõpuks tuleb nahk kuivatada. Kõik tamponid ja pesuvesi tuleb säilitada analüüsimise jaoks. Seejärel tuleb paigaldada värske kate, et kaitsta kokkupuutes olnud pinda neil loomadel, kes kuuluvad hilisemale ajale vastavatesse rühmadesse, enne kui loomad pannakse tagasi üksikpuuridesse.

**▼B****1.4.9. Katse lõpetamine**

Igas rühmas surmatakse loomad planeeritud ajal ja veri kogutakse analüüsimiseks. Kaitsevahend või kate tuleb analüüsimise jaoks eemaldada. Igalt loomalt eemaldatakse analüüsimiseks kokkupuutekoha nahkja sama suur pügatud nahapind, mis uuritava valmistisega kokku ei puutunud. Kokkupuutekoha naha võib jagada osadeks, eraldades sarvkihi selle all olevast epidermisest, et saada rohkem teavet uuritava kemikaali paiknemise kohta. Uuringud, kuidas kemikaali kogused naha osades muutuvad pärast kokkupuuteperiоди mööduva aja jooksul, peaksid andma ettekujutuse sellest, mis juhtub uuritava kemikaaliga sarvkihis. Naha osadeks jagamise hõlbustamiseks (pärast naha lõplikku pesemist ja looma surmamist) eemaldatakse kaitsekate. Kokkupuutekoha nahk koos rõngakujulise tüki ümbritseva nahaga lõigatakse roti seljast maha ja kinnitatakse alusele. Kleeplindiriba vajutatakse ettevaatlikult naha pinnale ja tõmmatakse siis ära koos osaga sarvkihist. Naha pinnale vajutatakse järjest üha uusi kleeplindiribasid ja tõmmatakse ära; kui kogu sarvkiht on eemaldatud, ei jää riba enam nahapinnale kinni. Iga looma kõik ribad võib panna ühte anumasse, kuhu sarvkihi lahustamiseks lisatakse kudesid lahustavat ainet. Võimalikud sihtkoed võib eemaldada eraldi mõõtmisteks, enne kui ülejäänud korjust analüüsitakse imendunud koguse määramiseks. Üksikloomade korjused säilitatakse analüüsimiseks. Tavaliselt piisab üldsisalduse määramisest. Sihtorganid võib eemaldada eraldi analüüsimiseks (kui see on näidustatud teiste uuringute alusel). Planeeritud surmamise ajal põies leiduv uriin tuleb lisada varem kogutud uriinile. Pärast väljaheidete kogumist metabolismi uurimise puuridest planeeritud surmamise ajal pestakse puurid ja kogumisseadmed sobiva lahustiga. Tuleb uurida ka muud varustust, mis võib olla saastunud uuritava ainega.

**1.4.10. Määramine**

Kõigis uuringutes tuleb püüda täieliku määramissaagise poole (st saagis peaks olema keskmiselt  $100 \pm 10$  % radioaktiivsusest). Kui saagis jääb väljapoole seda vahemikku, siis tuleb seda põhjendada. Igas proovis kasutatud kogust tuleb analüüsida sobivalt valideeritud meetoditega.

Statistiliste arvutustega tuleb määrata iga pealekandmiskatse paralleelkatsete dispersioon.

**2. ANDMED**

Iga looma puhul tuleb igal proovide võtmise ajal teha järgmised uuritava kemikaali ja/või metaboliitide mõõtmised. Lisaks individuaalsetele andmetele tuleb esitada ka proovide võtmise aja alusel rühmitatud andmete keskvaartused.

— kaitsevahenditega seotud kogused;

— nahalt eraldatavad kogused;

— kogused nahas/nahal, mida ei saa nahalt ära pesta;

**▼B**

- kogus uurimiseks võetud veres;
- kogus väljaheidetes ja väljahingatud õhus (vajadusel);
- kogus, mis jääb korjusesse ja eraldi analüüsimise jaoks eemaldatud organitesse.

Uuritava aine ja/või metaboliitide kogus väljaheidetes, väljahingatud õhus, veres ja korjuses võimaldab määrata igal ajahetkel imendunud aine üldkoguse. Samuti saab arvutada uuritava kemikaali koguse, mis absorbeerus uuritava ainega kokkupuutunud naha 1 cm<sup>2</sup> kohta kokkupuuteperioodi vältel.

### 3. TULEMUSTE VORMISTAMINE

#### 3.1. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katseüsteemi põhjendus, ning järgmine teave.

Uuritav aine:

- andmed aine määramiseks [nt CASi number, kui see on teada; aine tootja; puhtus (radiokeemiline puhtus); teadaolevad lisandid; partii number];
- füüsikaline iseloomustus, füüsikalised-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus, molekulmass ja log P<sub>ow</sub>).

Uuritav valmistis:

- koostis ja kasutamise põhjendus;
- üksikasjad uuritava valmistise kohta, pealekantud kogus, saavutatud kontsentratsioon, kandeaine, stabiilsus ja homogeensus.

Katseloom:

- kasutatud liik/aretusliin;
- loomade arv, vanus ja sugu,
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- üksikloomade kaal katse alguses.

Katsetingimused:

- uuritava valmistise manustamise üksikasjad (pealekandmiskoht, määramismeetod, katmine tihedalt või mittetihedalt, maht, ekstraheerimine, määramine);
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused:

- kõik toksilisuse nähud;
- tabel imendumisandmete kohta (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina);

**▼ B**

- katse üldised määramissaagised;
- tulemuste tõlgendamine, võrdlus katseaine nahakaudse imendumise seniste andmetega.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4.

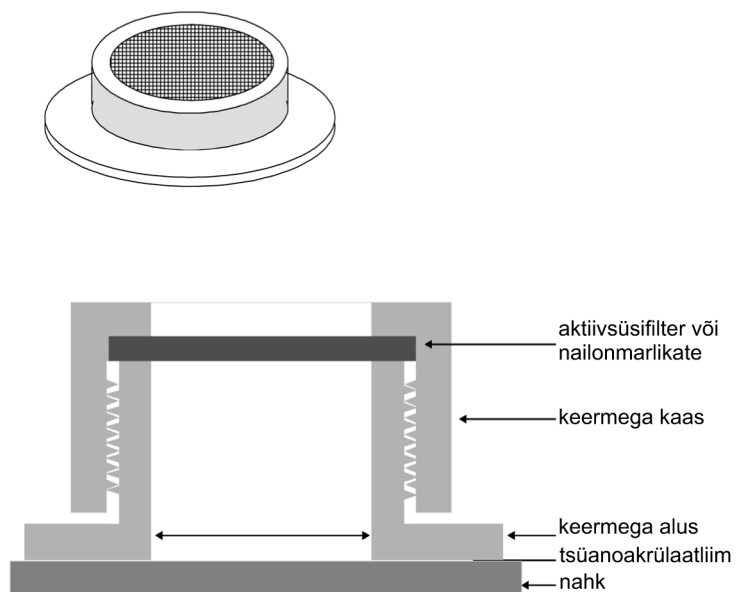
**VIITED**

- 1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
- 4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.
- 5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA
- 6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
- 7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- 8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.
- 9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Joonis 1

Tüüpiline vahend nahakaudse kokkupuute koha määratlemiseks ja kaitsmiseks *in vivo* nahakaudse imendumise uuringute ajal



**▼B****B.45. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 428 (2004).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodiga määratakse väljalõigatud nahatükile kantud uuritava aine imendumist läbi naha. Seda võib kasutada kas koos naha kaudu imendumise *in vivo* meetodiga (1) või iseseisvalt. Sel meetodil põhinevate uuringute kavandamise hõlbustamiseks soovitatakse kasutada OECD juhenddokumenti nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2). Juhenddokument on ette valmistatud, et lihtsustada sobivate *in vitro* protseduuride valimist konkreetsete tingimuste puhul, et tagada selle meetodiga saadud tulemuste usaldusväärsus.

Nahakaudse imendumise ja dermaalse jaotumise mõõtmise meetodid võib jagada kahte kategooriasse: *in vivo* ja *in vitro*. Nahakaudse imendumise *in vivo* meetodeid kasutatakse laialdaselt ja nende abil saadakse farmakoloogilist teavet mitme loomaliigi kohta. *In vivo* meetodit kirjeldatakse eraldi teise katsemeetodi juures (1). Ka *in vitro* meetodeid on juba palju aastaid kasutatud nahakaudse imendumise mõõtmiseks. Kuigi käesoleva katsemeetodiga hõlmatud *in vitro* meetodeid pole ametlikult uuringutega valideeritud, leppisid OECD eksperdid 1999. aastal kokku, et hinnatud andmeid on *in vitro* meetodi toetamiseks piisavalt (3). Täiendavad üksikasjad, mis seda kinnitavad, sealhulgas ka palju *in vitro* ja *in vivo* meetodite otseseid võrdlusi, on esitatud juhenddokumendis (viide 2). Käesolevat teemat on käsitletud mitmes monograafia, milles on üksikasjalikult kirjeldatud *in vitro* meetodi kasutamise tausta (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ja 12). *In vitro* meetoditega mõõdetakse kemikaalide difusiooni nahasse ja läbi naha vedelikureservuaari ning seejuures võib kasutada kas mitteelujõulist nahka ainult difusiooni mõõtmiseks või värsket, metaboolselt aktiivset nahka, et mõõta samaaegselt nii difusiooni kui ka metabolismi nahas. Selliseid meetodeid on kasutatud sõeluuringutes mitmesugustest segudest kemikaalide nahka ja läbi naha imendumise võrdlemisel ning need võivad olla ka kasulikeks mudeliteks läbi naha toimuva imendumise hindamiseks inimesel.

*In vitro* meetod ei pruugi olla kohaldatav igas olukorras ja kõigi kemikaaliklasside puhul. *In vitro* meetod võib sobida naha läbitavuse esialgseks kvalitatiivseks hindamiseks. Mõnikord on neid andmeid vaja täiendada *in vivo* andmetega. Juhenddokumendis (2) on täpsustatud, millal võib kasutada *in vitro* meetodit. Viites 3 on esitatud täiendav üksikasjalik teave sellekohase otsuse põhjendamiseks.

Käesolevas meetodis esitatakse nahakaudse imendumise ja jaotumise mõõtmise üldpõhimõtted väljalõigatud nahatüki kasutamisel. Võib kasutada paljude imetajaliikide, kaasa arvatud inimese nahka. Naha läbitavusega seotud omadused säilivad pärast kehalt eemaldamist, kuna peamiseks difusioonibarjääriks on eluvõimetu sarvkiht (*stratum corneum*); aktiivset kemikaalide transporti läbi naha ei ole täheldatud. On tõendatud, et nahal on võime metaboli seerida teatud kemikaale nahakaudse imendumise ajal (6); see protsess ei ole küll kiirust limiteeriv tegelikult imendunud kemikaalidest seisukohast, kuid võib mõjutada vereringesse sattuva materjali koostist.



**▼B**

## 1.2. MÕISTED

**Imendumata kogus** – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

**Imendunud kogus (*in vitro*)** – katseaine mass, mis jõuab vastuvõtvasse vedelikku või süsteemsesse ringesse konkreetse ajavahe- miku jooksul.

**Imendatav kogus (*in vitro*)** – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

## 1.3. KATSEETODI PÕHIMÕTE

Katseaine, mis võib olla radioaktiivselt märgistatud, kantakse kahte difusiooniraku kambrit eraldava nahatüki pinnale. Kemikaal jääb nahale katseprotokollis näidatud ajaks seal kirjeldatud tingimustes, misjärel see eemaldatakse sobiva puhastamisprotseduuriga. Vastuvõtvasse vedelikust võetakse katse käigus proovid teatud ajahetkedel ja analüüsitakse neid uuritava kemikaali ja/või metaboliitide suhtes.

Kui kasutatakse metaboolselt aktiivseid süsteeme, võib sobivate meetoditega analüüsida uuritava kemikaali metaboliite. Katse lõpus mõõdetakse vajadusel uuritava kemikaali ja selle metaboliitide jaotumine.

Sobivates tingimustes, mis on kirjeldatud käesoleva meetodi juhendis ja juhenddokumendis (2), mõõdetakse uuritava aine imendumine teatava ajavahemiku vältel, analüüsides vastuvõtvat vedelikku ja nahka, millele oli kantud kemikaal. Naha sisse jäävat uuritavat ainet tuleb käsitleda imendununa, välja arvatud juhtudel, kui saab näidata, et imendumist saab määrata ainult vastuvõtva vedeliku väärtuste abil. Teiste komponentide (nahalt maha pestud ja nahakihtidesse jäänud materjal) analüüsimine võimaldab andmeid täiendavalt hinnata, sealhulgas määrata kogu uuritava aine jaotumise ja saagise protsendi.

Katse läbiviimise korrektsuse ja usaldusväärsuse tõendamiseks viiakse laboris läbi katsed asjaomaste võrdluskemikaalidega; saadud tulemused peavad vastama kasutatud meetodi kohta avaldatud kirjandusandmetele. Selleks võib mõõta sobivat võrdlusainet (mille lipofiilsus võiks olla lähedane uuritava aine omale) samaaegselt uuritava ainega või esitada piisav hulk varasemaid andmeid erineva lipofiilsusega võrdlusainete (nt kofeiin, bensoehape ja testosteroon) imendumise mõõtmise kohta.

## 1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.4.1. Difusioonirakk

Difusioonirakk koosneb doonorkambrist ja vastuvõtukambrist, mille vahele paigutatakse nahk (tüüpilise kujundusega rakk on kujutatud joonisel 1). Rakuseina ja nahatüki ühenduskoht peab olema tihe, naha alumise pinnaga kontaktis olevast vastuvõtvasse lahusest peab saama kergesti proove võtta ja seda lahust peab saama korralikult segada ning raku ja selle sisu temperatuur peab olema hästi kontrollitav. Kasutada võib nii staatilist kui ka läbivooluga difusioonirakku. Tavaliselt jäetakse doonorkamber uuritava aine lõpliku kogusega kokkupuute ajal tihedalt sulgemata. Doonorkambri võib aga pideva pealekandmisega katse ja teatavate lõplike kogustega korraldatavate katsete ajal ka tihedalt sulgeda.

**▼B****1.4.2. Vastuvõttev vedelik**

Eelistatakse füsioloogilisele keskkonnale lähedase vastuvõtva vedeliku kasutamist, kuid kasutada võib ka muid vedelikke, kui see on põhjendatud. Tuleb esitada vastuvõtva vedeliku täpne koostis. Tuleb näidata, et uuritav kemikaal on vastuvõtvas vedelikus piisavalt lahustuv, nii et see vedelik ise ei takistaks imendumist. Lisaks ei tohi vastuvõttev vedelik nahatükki kahjustada. Läbivooluga süsteemi puhul ei tohi voolukiirus takistada uuritava aine difusiooni vastuvõtvasse vedelikku. Staatilise rakuga süsteemis tuleb vedelikku pidevalt segada ja sealt regulaarselt proove võtta. Kui uuritakse metabolismi, peab vastuvõttev vedelik toetama naha elutegevust katse ajal.

**1.4.3. Nahapreparaadid**

Võib kasutada inimeselt või loomalt võetud nahka. Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvaheliste eetiliste tõekspidamistele ja tingimustele. Kuigi eelistatakse elusat nahka, võib kasutada ka mitteelusat nahka, kui saab näidata, et see ei ole kahjustatud. Lubatav on kasutada kas epidermaalembraane (ensümaatilisel, kuumusega või keemiliselt eraldatud) või dermatoomi abil saadud õhukest nahakihti (paksusega harilikult 200–400 µm). Võib kasutada täispaksusega nahka, kuid liigset paksust ( $ca > 1$  mm) tuleb vältida, kui eesmärk ei ole määrata uuritavat kemikaali nahakihtides. Loomaliigi, anatoomilise lokaliseerimise ja preparatsioonitehnika valik peab olema põhjendatud. Nõutavad on usaldusväärsed andmed vähemalt neljast paralleelproovist uuritava preparaadi kohta.

**1.4.4. Nahapreparaadi kahjustamatus**

On oluline, et nahk oleks õigesti prepareeritud. Vale prepareerimine võib kahjustada *stratum corneum*'i, seepärast tuleb kontrollida, et prepareeritud nahk ei oleks kahjustatud. Kui uuritakse naha metabolismi, tuleb kasutada värskest lõigatud nahka võimalikult kiiresti pärast lõikamist ja tingimustes, mis teadaolevalt toetavad metaboolset aktiivsust. Üldreeglina tuleb värskest lõigatud nahka kasutada 24 tunni jooksul, kuid vastuvõetav säilitusperiood võib oleneda metaboliseerivast ensüümsüsteemist ja säilitustemperatuuridest (13). Kui nahapreparaate on enne kasutamist säilitatud, tuleb tõendada, et barjäärifunktsioon on alles.

**1.4.5. Uuritav aine**

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

**1.4.6. Uuritav preparaat**

Uuritava aine preparaat (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat ainet) peab olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aseaine). Iga kõrvalekaldumine „kasutusel olevast” preparaadist peab olema põhjendatud.

**▼B****1.4.7. Uuritavate ainete kontsentratsioon ja segud**

Tavaliselt kasutatakse mitut uuritava aine kontsentratsiooni, mis on võrreldavad suurima kontsentratsiooniga, millega inimene võib kokku puutuda. Samuti tuleb kaaluda tüüpiliste segude imendumise uurimist.

**1.4.8. Kandmine nahale**

Inimese harilike kokkupuutetingimuste puhul on tavaliselt tegu lõplike kogustega. Seepärast tuleb nahale kanda kogus, mis modelleerib inimese kokkupuudet ainega, ja see on tavaliselt 1–5 mg/cm<sup>2</sup> naha kohta tahkete ainete ja kuni 10 µl/cm<sup>2</sup> vedelike puhul. Kogus peaks olema põhjendatud eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava preparaadi füüsikaliste omadustega. Näiteks võib naha pinnale kantud koguse lugeda lõpmata suureks, kui uuritavat ainet kantakse pindalaühikule suures mahus.

**1.4.9. Temperatuur**

Temperatuur mõjutab kemikaalide passiivset difusiooni (ja seetõttu nende nahakaudset imendumist). Difusioonikambrit ja nahka tuleb hoida konstantsel temperatuuril, mis on sarnane naha normaalse temperatuuriga 32 ± 1 °C. Erineva kujundusega mõõtmisrakkude puhul on vaja kasutada erinevaid veevanni või soojendatava ploki temperatuure, et tagada vastuvõtva lahuse/naha olek füsioloogilise normi juures. Niiskus peab eelistatavalt olema 30 % ja 70 % vahel.

**1.4.10. Kokkupuute kestus ja proovide võtmine**

Nahk võib uuritava preparaadiga kokku puutuda kogu katse ajal või lühemate ajavahemike jooksul (et modelleerida inimese kokkupuute mõnd konkreetset tüüpi). Liigne uuritava preparaadi kogus pestakse nahalt sobiva puhastusainega ja loputusvesi kogutakse analüüsimeks. Uuritava preparaadi eemaldamise viis sõltub oodatavatest kasutustingimustest ning peab olema põhjendatud. Tavaliselt on imendumisprofiili piisavaks kirjeldamiseks vaja võtta proove 24 tunni jooksul. Kuna naha kvaliteet võib 24 tunni pärast hakata langema, ei tohi proove tavaliselt võtta kauem kui 24 tunni jooksul. Kiiresti naha sisse tungivate uuritavate ainete puhul ei pruugi pikem mõõtmine olla vajalikki, aeglasemalt naha sisse tungivate ainete puhul võib olla vaja kasutada pikemat aega. Vastuvõtvas vedelikus proovide võtmise sagedus peab olema piisav, et uuritava aine imendumise profiili saaks esitada graafiliselt.

**1.4.11. Katse lõpus tehtavad mõõtmised**

Kõik katsesüsteemi komponendid tuleb analüüsida ja määrata uuritava aine kogused. See hõlmab doonorkambrit, naha pinna loputusvedelikku, nahapreparaati ja vastuvõtva vedeliku kambrit. Mõnel juhul võib eraldi analüüsime jaoks jagada naha eksponeeritud nahapinnaks ja nahaks, mis paiknes raku ääre all, ning *stratum corneum*’iks, epidermiseks ja dermiseks.

**1.4.12. Analüüsimine**

Kõigis uuringutes tuleb saavutada piisav saagis (eesmärk peaks olema, et keskmine saagis on 100 ± 10 % radioaktiivsusest ja kõrvalekalded sellest peavad olema põhjendatud). Uuritava aine kogused vastuvõtvas vedelikus, naha pesemise vedelikus ja aparraadi loputamise vedelikus tuleb määrata sobiva meetodi abil.

**▼B**2. **ANDMED**

Esitatakse vastuvõtva vedeliku analüüs, uuritava kemikaali jaotus katsesüsteemis ja imendumisprofiil sõltuvana ajast. Kui kasutatakse lõplikule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, tuleb arvutada kogus, mis pesti nahalt ära, nahaga (sh eri nahakihtidega, kui neid analüüsitakse) seotud kogus ja vastuvõttavas vedelikus olev kogus (kiirus ja kogus või protsent pealekantud kogusest). Mõnikord saab nahakaudset imendumist väljendada ainult vastuvõtva vedeliku andmete kasutamisega. Kui katseaine jääb uuringu lõpus naha sisse, võib siiski olla vajalik arvestada ka see kogus imendunud koguse hulka (vt viide 3, punkt 66). Kui kasutatakse lõpma-tule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, võivad andmed võimaldada läbilaskvuskonstandi ( $K_p$ ) arutamist. Nende tingimuste puhul pole imendumise protsent oluline.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuandes tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katsesüsteemi põhjendus, ning lisaks järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline iseloomustus, füüsikalised-keemilised omadused (vähemalt molekulmass ja  $\log P_{ow}$ ), puhtus (radiokeemiline puhtus);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed (nt partii number);

— lahustuvus vastuvõttavas vedelikus.

Uuritav preparaat:

— koostis ja kasutamise põhjendus;

— homogeensus.

Katse tingimused:

— naha päritolu ja lokaliseerimine, prepeareerimise meetod, säilitus-tingimused enne kasutamist, mis tahes eeltöötlus (puhastamine, antibiootiline töötus jne), naha kahjustamatuse mõõtmised, metaboolne staatus, kasutamise põhjendus;

— difusiooniraku ehitus, vastuvõtva vedeliku koostis, vastuvõtva vedeliku voolukiirus või proovide võtmise ajad ja meetod;

— uuritava preparaadi pealekandmise üksikasjad ja pealekantud kogus;

— kokkupuute kestus;

— uuritava preparaadi nahalt eemaldamise, nt naha loputamise üksikasjad;

— naha analüüsi üksikasjad ja millist fraktsioneerimistehnikat kasutati, et määrata jaotumine nahas;

**▼ B**

- raku ja varustuse pesemise kord;
- analüüsimeetodid, ekstraheerimistehnika, avastamiskiirid ja analüüsimeetodi valideerimine.

## Tulemused:

- uuritava aine üldised määratud kogused katses (pealekantud kogus = naha pesuvedelik + nahk + vastuvõttev vedelik + raku pesuvedelik);
- tabel mõõdetud koguste kohta raku igas kambris;
- imendumisprofiil;
- imendumist iseloomustavate andmete tabel (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina).

## Tulemuste arutelu.

## Järeldused.

## 4.

**VIITED**

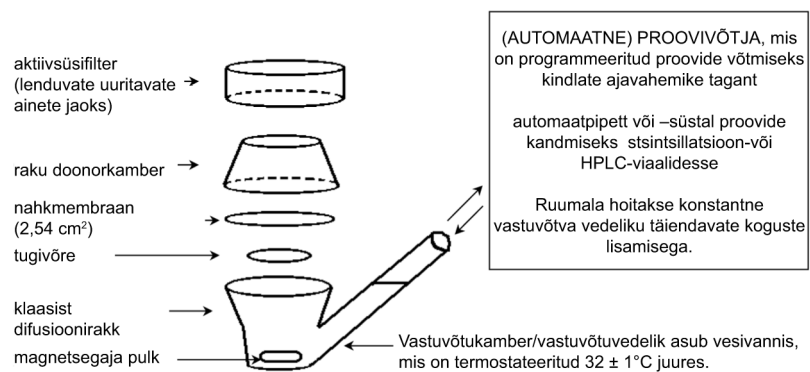
- 1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
- 4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- 5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.
- 6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- 7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- 8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191–205.
- 9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- 10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼ B

- 11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- 12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- 13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Joonis 1

**Tüüpilise staatilise difusiooniraku ehitus nahakaudse imendumise *in vitro* uurin-  
gute puhul**



▼ **M8**

B.46. ***IN VITRO* NAHAÄRRITUS: INIMESE REKONSTRUEERITUD  
MARRASKNAHAL PÕHINEV KATSEMEETOD**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M7

**B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.



▼ M7

**B.48. ISOLEERITUD KANASILMA KATSEMEETOD SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M7**B.49. MIKROTUUMADE TEKKE IN VITRO KATSE  
IMETAJARAKKUDEGA****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 487 (2016). See on osa geneetilise toksikoloogia katsemeetodite sarjast Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (1).

Mikrotuumade tekke *in vitro* katse on genotoksilisuse katse, milles määratakse mikrotuumade esinemist interfaasis olevate rakkude tsütoplasmas. Mikrotuumad võivad tekkida atsentrilistest kromosoomifragmentidest (st tsentromeerita fragmendid) või tervetest kromosoomidest, mis ei suuda liikuda poolustele raku jagunemise anafaasi etapis. Seega on mikrotuumade katse *in vitro* meetod, mis võimaldab *in vitro* terviklikult uurida kromosoomide kahjustamise potentsiaali, sest sellega saab määrata nii aneugeene kui ka klastogeene (2, 3) rakkudes, mis on jagunenud pärast kemikaaliga kokkupuudet või selle ajal (vt üksikasjalikumalt punkt 13). Mikrotuumad on tütarakkudesse edasi kanduv kahjustus, samal ajal kui metafaasis olevates rakkudes sedastatavad kromosoomaberratsioonid tütarakkudesse ei kandu. Mõlemal juhul võivad muutused olla raku elutegevusega kokkusobimatud.

Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada nii selliseid meetodikaid, milles kasutatakse aktiini polümeerisatsiooni inhibiitorit tsütocalasiin B (*cytochalasin B*, *cytoB*), kui ka selliseid, milles seda ei kasutata. *CytoB* lisamine enne mitoosi põhjustab kahetuimaliste rakkude teket ning võimaldab seega mikrotuumi määrata ja analüüsida vaid nendes rakkudes, mis on ühe mitoosi täielikult lõpetanud (4, 5). Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada ka ilma tsütokineesi blokeerimiseta katsemeetodikaid, kui on tõendatav, et analüüsitava rakupopulatsioon on läbinud mitoosi.

Lisaks sellele, et kasutada mikrotuumade tekke *in vitro* katset mikrotuumade teket indutseerivate kemikaalide kindlaks tegemiseks, võib kinetohooride immunokeemilise märgistamise või tsentromeeri/telomeeri piirkonna proovidega hübriidimise kaudu (*in situ* fluorestsentshübriidimine, FISH) saada lisateavet kromosoomikahjustuse ja mikrotuumade tekke mehhanismide kohta (6–17). Märgistamise ja hübriidimise meetodeid võib kasutada, kui mikrotuumade teke on suurenenud ning uurija tahab kindlaks teha, kas nende suurenenud tekke põhjus on klastogeenne ja/või aneugeenne protsess.

Kuna interfaasis olevates rakkudes saab mikrotuumi hinnata suhteliselt objektiivselt, piisab, kui laboripersonal määrab *cytoB* kasutamise korral kahe tuumaga rakkude arvu ning kõigil juhtudel mikrotuumadega rakkude esinemuse. Seepärast saab mikroskoobipreparaate hinnata suhteliselt kiiresti ja analüüsi saab automatiseerida. Seepärast on asjakohane iga töötlemise kohta hinnata sadade rakkude asemel tuhandeid rakke; see suurendab katse statistilist võimsust. Peale selle, kuna mikrotuumad võivad tekkida kromosoomiloive tõttu, on võimalik tuvastada aneuploidsust põhjustavaid kemikaale, mida on keeruline kindlaks teha tavaliste kromosoomaberratsioonkatsetega, nt käesoleva lisa peatükk B.10 (18). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud mikrotuumade tekke *in vitro* katse ei võimalda siiski ilma punktis 4 nimetatud erimeetoditeta (nt FISH), eristada kemikaale, mis põhjustavad kromosoomiarvu ja/või ploidsuse muutusi, klastogeensust tekitavatest kemikaalidest.

Mikrotuumade tekke *in vitro* katse on töökindel ning teostatav paljude rakutüüpidega, nii *cytoB* manulusel kui ka selleta. Väga paljud andmed toetavad mikrotuumade tekke *in vitro* katse kasutatavust eri rakutüüpide puhul (rakuliinid või primaarkultuurid) (19–36). Need hõlmavad eelkõige rahvusvahelisi valideerimisuuringuid, mida koordineeris *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19–23), ja genotoksilisuse uuringuid käsitleval rahvusvahelisel seminaril

▼ M7

*International Workshop on Genotoxicity Testing* esitatud materjale (5, 17). Euroopa Alternatiivsete Meetodite Tõestamise Keskus (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) on tõendite kaalukusel põhineva retrospektiivse valideerimisuringuga olemasolevaid andmeid ka uuesti hinnanud ning katsemetodi teaduslikku usaldusväärsust on kinnitanud ECVAMi teaduslik nõuandekomitee (ESAC) (37–39).

Mikrotoomade tekke *in vitro* katses võib kasutada inimese või näriliste rakuliine või primaarseid rakukultuure. Kuna mikrotoomade foonis esinemise sagedus mõjutab katse tundlikkust, soovitatakse kasutada rakutüüpe, mille puhul mikrotoomade tekke sagedus foonis on stabiilne ja kindlaks määratud. Kasutatavad rakud valitakse rakukultuuris hea kasvuvõime, kartiotüübi (sealhulgas kromosoomiarvu) stabiilsuse ja mikrotoomade spontaanse esinemissageduse alusel (40). Praegu olemasolevad andmed ei võimalda anda kindlaid soovitusi, kuid nende alusel võib eeldada, et keemiliste ohutegurite hindamisel on oluline võtta arvesse katseks valitud rakkude *p53* staatust, geneetilist (kariotüübi) stabiilsust, DNA reparatsiooni võimet ja päritolu (näriliste või inimese rakud). Seega soovitatakse käesoleva katsemetodi kasutajatel indutseeritud mikrotoomade tekke määramiseks võtta arvesse neid ja – valdkonna teadmiste lisandumisel – muid rakuliini toimimist mõjutavaid rakulisi näitajaid.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

*In vitro* katsete puhul tuleb üldjuhul kasutada eksogeenset metaboolse aktivatsiooni allikat, välja arvatud juhul, kui rakud metaboliseerivad uuritavaid kemikaale. Eksogeenne metaboolse aktivatsiooni süsteem ei ole täielikult samastatav *in vivo* tingimustega. Hoolikalt tuleb vältida tingimusi, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, mis ei peegelda uuritavate kemikaalide genotoksilisust. Sellised tingimused hõlmavad pH (41–43) või osmolaalsuse muutusi, söötme koostisosadega reageerimist (44, 45) või liiga suurt tsütotoksilisust (vt punkt 29).

Mikrotoomade tekke induksiooni analüüsimiseks on väga tähtis, et mitoos oleks toimunud nii uuritava kemikaaliga töödeldud kultuurides kui ka töötlemata kultuurides. Mikrotoomade hindamiseks on kõige informatiivsemad sellises faasis rakud, mis on uuritava kemikaaliga töötlemise ajal või pärast seda läbinud täielikult ühe mitoosi. Tehislike nanomaterjalide uurimiseks on käesolevat katsemetodit vaja eraldi kohandada, kuid seda ei ole käesolevas katsemetodis kirjeldatud.

Enne kui kasutada seda meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Sellist kaalumist ei ole vaja, kui regulatiivne nõue eeldabki segu katsetamist.

## KATSE PÕHIMÕTE

Inimrakkude või muud päritolu imetajarakkude kultuurid lastakse uuritava kemikaaliga kokku puutuda nii metaboolse aktivatsiooni eksogeense allika juuresolekul kui ka ilma selleta, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piisava metaboliseerimisvõimega rakke (vt punkt 19).

Uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda kasvatatakse rakke piisava ajavahemiku jooksul, et interfaasis olevates rakkudes saaksid kromosoomikahjustuse või muude toimete tõttu rakutsükli/rakujagunemise protsessidele tekkida mikrotoomad. Aneuploiduse põhjustamiseks peaks kokkupuute uuritava kemikaaliga tavaliselt toimuma mitoosi ajal. Kogutud ja värvitud interfaasirakke uuritakse mikrotoomade esinemise suhtes. Ideaaljuhul tuleks mikrotoomi hinnata üksnes sellistes rakkudes, mis on täielikult läbinud mitoosi kas uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või kokkupuutejärgses perioodis, kui seda kasutatakse. Tsütokineesi blokaatoriga töödeldud kultuurides saavutatakse see lihtsalt, selleks hinnatakse vaid kahetuimalisi rakke. Tsütokineesi blokaatori puudumisel on

▼ **M7**

tähtis tõendada, et analüüsitavad rakud on tõenäoliselt jagunenud; seejuures toetatakse rakupopulatsiooni suurenemisele uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda. Kõigi katsemetoodikate puhul on oluline tõendada, et rakkude paljunemine on toimunud nii kontrolli kultuurides kui ka töödeldud kultuurides, ning tuleb hinnata uuritava kemikaali põhjustatud tsütotoksilisuse või tsütostaasi ulatust kõigis kultuurides, mida hinnatakse mikrotoomade esinemise suhtes.

**MEETODI KIRJELDUS****Rakud**

Kasutada võib rakukultuuris kasvatatud primaarseid inimese või muude imetajate perifeerse vere lümfotsüüte (7, 20, 46, 47) ja mitmeid näriliste rakuliine, nt CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y, või inimese rakuliine, nt TK6 (19–23, 26–29, 31, 33–36) (vt punkt 6). Mikrotoomade tekke katses on kasutatud ka muid rakuliine, nagu HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50, 51), HepG2 rakud (52) (53), A549 ja süüria hamstri primaarseid embrüorakke (54), kuid nendega saadud andmeid ei ole praegu põhjalikult valideeritud. Seepärast tuleb muude rakuliinide ja -tüüpide kasutamist põhjendada nendega saadud tõendatud katsetulemuste põhjal, nagu on kirjeldatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide punktis. *CytoB* kohta on teatatud, et see võib mõjutada L5178Y rakkude kasvu, ning seetõttu ei soovitata selle kasutamist nimetatud rakuliiniga (23). Kui kasutatakse primaarseid rakke, tuleb loomade heaolu huvides kaaluda inimrakkude kasutamist kõigil juhtudel, kui rakkude saamine ei tekita probleeme ja proovid võetakse kooskõlas inimuuringu eetika põhimõtete ja nõuetega.

Inimese perifeerse vere lümfotsüüte tuleks võtta noortelt (umbes 18–35aastastelt) mitesuissetavatelt isikutelt, kellel ei ole teadaolevaid haigusi ning kes ei ole hiljuti kokku puutunud genotoksiliste teguritega (nt kemikaalid, ioniseeriv kiirgus) koguses, mis võiks suurendada mikrotoomadega rakkude esinemist katse foonis. See tagaks, et mikrotoomadega rakkude esinemus foonis on väike ja püsiv. Mikrotoomadega rakkude esinemissageduse lähtetase suureneb vanusega ja see trend on rohkem väljendunud naistel kui meestel (55). Kui eri doonoritelt kogutud rakud kasutamiseks ühendatakse, tuleb esitada doonorite arv. On vaja tõendada, et rakud on pärast uuritava kemikaaliga töötlemise alustamist kuni proovi võtmiseni jagunenud. Rakukultuure hoitakse eksponentsiaalse kasvu faasis (rakuliinid) või stimuleeritakse rakkude jagunemist (lümfotsüütide primaarkultuurid), et saada rakke rakutsükli eri faasidest, sest eri faasides olevate rakkude tundlikkus uuritavate kemikaalide suhtes võib olla teadmata. Primaarsed rakud, mida tuleb jagunemiseks stimuleerida mitogeenidega, ei ole uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal tavaliselt enam sünkroniseeritud (nt inimese lümfotsüüdid pärast 48tunnist stimulatsiooni mitogeeniga). Uuritava kemikaaliga töötamise ajal ei soovitata sünkroniseeritud rakkude kasutamist, kuid see võib olla aktsepteeritav, kui on põhjendatud.

*Söötmed ja kultiveerimistingimused*

Rakukultuuride jaoks tuleb kasutada asjakohast söödet ja asjakohaseid inkubeerimistingimusi (kasvunõud, sobiva niiskusesisaldusega 5 % CO<sub>2</sub> atmosfäär (kui asjakohane), temperatuur 37 °C). Rakuliine tuleb tavapraktika korras kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ja mükoplasmaga saastumise puudumise suhtes, ning saastunud rakke või rakke, mille modaalne kromosoomiarv on muutunud, ei kasutata. Rakuliinide ja primaarsete rakukultuuride puhul tuleb saavutada normaalne rakutsükli kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele.

▼ **M7***Rakukultuuride ettevalmistamine*

Rakuliinid: rakke kasvatatakse tüvikultuurist, külvates neid söötmesse sellise tihedusega, et rakud jätkaksid nii suspensioonis kui ka monokihina eksponentsiaalset kasvamist kuni nende kogumiseni (nt monokihina kasvavate rakkude puhul tuleb konfluentsust vältida).

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisverd või eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse (nt 48 tundi inimese lümfotsüütide puhul) mitogeeni juuresolekul (nt fütohemaglutiniin (PHA) inimese lümfotsüütide puhul), et indutseerida raku jagunemine enne töötlemist uuritava kemikaali ja *cytoB*-ga.

*Metaboolne aktivatsioon*

Eksogeenseid metaboliseerivaid süsteeme tuleb kasutada juhul, kui kasutatavate rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole põhjendatud muu süsteemi kasutamist, soovatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriiline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (56, 57) või fenobarbitaali ja b-naftoflavooni kombinatsiooniga (58–60). Viimane kombinatsioon ei ole vastulus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (61)) ning on mitme funktsiooniga oksüdaaside induktorina osutunud sama tõhusaks kui Aroclor 1254 (58–60). S9-fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid kontsentratsiooni võib suurendada kuni 10 %-ni (mahuprotsent) katse lõplikus söötmes. Ühendeid, mis vähendavad mitoosiindeksit, eriti kaltsiumiga komplekse moodustavaid ühendeid (62), tuleb vältida töötlemise ajal. Uuritavate kemikaalide klass võib mõjutada kasutatava eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi või ensüümi induktori tüübi ja kontsentratsiooni valikut.

*Uuritava kemikaali preparaate valmistamine*

Enne rakkude töötlemist tuleb tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral lahjendada. Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada katsesüsteemile vahetult ja/või lahjendada seda enne katsesüsteemile lisamist. Gaasi või lenduva kemikaalide kasutamiseks katsetes tuleb katsemetoodikat asjakohaselt muuta, näiteks teha töötlustapp suletud anumal (63–65). Uuritava kemikaali preparaadid tuleb valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui nende stabiilsuse andmetest nähtub, et neid võib säilitada.

**Katsetingimused***Lahustid*

Lahusti tuleb valida nii, et uuritava kemikaali lahustuvust saaks parandada, ilma et see moonutaks katse käiku (nt muudaks rakkude kasvukiirust, muudaks uuritavat kemikaali, reageeriks rakkude kasvunõuga, kahjustaks metaboolse aktivatsiooni süsteemi). Kui see on vähegi võimalik, on esimese võimalusena soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid (DMSO). Üldiselt ei tohiks orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent). Kui *cytoB* lahustatakse DMSO-s, ei tohiks uuritava kemikaali ja *cytoB* puhul mõlema lahustamiseks kasutatud orgaanilise lahusti kogus kokku ületada 1 % (mahuprotsent); vastasel juhul tuleb teha lahusti kontrolli katsed ja näidata, et orgaanilise lahusti sisaldusel ei ole kahjulikku toimet. Üldjuhul ei tohiks töötlustapis kasutatavas lõppsöötmes vesilahustuva

▼ **M7**

lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb nende kasutamiseks esitada andmed, millest nähtub nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatud kontsentratsioonil. Tugiandmete puudumisel on oluline lisada lahustiga töötlemata kontrollid (vt 1. liide) ja lahusti kontrollid, et tõendada valitud lahustil kahjuliku või kromosoomse mõjutava (nt aneuploidse või klastogeense) toime puudumist.

*CytoB kasutamine tsütokineesi blokaatorina*

Üks olulisemaid probleeme mikrotoomade *in vitro* katse tegemisel on tagada, et hinnatavad rakud oleksid töötlemise ajal või töötlemisjärgses inkubeerimisperioodis (kui seda kasutatakse) lõpetanud mitoosi. Mikrotoomade hindamisel tuleb seega piirduda üksnes selliste rakkudega, mis on töötlemise ajal või pärast seda läbinud mitoosi. Tsütokineesi blokeerimiseks on enim kasutatud ühendit *cytoB*, sest see inhibeerib aktiini polümeerisatsiooni ja takistab sellega tütarakkude lahkumist pärast mitoosi, mistõttu tekivad kahetuumalised rakud (6, 66, 67). Uuritava kemikaali toimet raku paljunemise kineetikale võib mõõta samal ajal *cytoB* kasutamisega. Kui kasutatakse inimese lümfotsüüte, tuleb *cytoB*-ga tsütokineesi blokeerida, sest rakutsükli kestus on doonoriti erinev ning kõik lümfotsüüdid ei reageeri stimulatsioonile fütohemaglutiniiniga. *CytoB* kasutamine teiste rakutüüpide puhul ei ole kohustuslik, kui tõendatakse, et need on jagunenud, nagu on kirjeldatud punktis 27. Peale selle ei kasutata *cytoB*-d üldiselt juhul, kui mikrotoomade esinemist proovides hinnatakse läbivoolutsütomeetria meetoditega.

Laboril tuleb iga rakutüübi puhul määrata asjakohane *cytoB* kontsentratsioon, millega saavutatakse optimaalne kahetuumaliste rakkude sagedus lahusti kontrolli kultuurides, ning tõendada, et see tagab hindamiseks vajaliku kahetuumaliste rakkude arvu. *CytoB* sobiv kontsentratsioon on tavaliselt vahemikus 3–6 µg/ml (19).

*Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning uuritava kemikaali kontsentratsioonide valimine*

Uuritava kemikaali suurimat kontsentratsiooni määramisel tuleb vältida kontsentratsioone, mis võivad põhjustada valepositiivseid tulemusi, nagu kontsentratsioonid, mis põhjustavad liiga suurt tsütotoksilisust (vt punkt 29), söötmes sadestumist (vt punkt 30) või olulisi pH või osmolaalsuse muutusi (vt punkt 9). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks töötlusetapis kasutatavasse lõppsöötmesse lisada puhvrit, et vältida valepositiivseid tulemusi ja säilitada asjakohased rakkude kasvutingimused.

Rakkude paljunemise mõõtmisega veendutakse, et piisav arv uuritava kemikaaliga töödeldud rakke on katse ajal läbinud mitoosi ja et töötlusi tehakse tsütotoksilisuse sobival tasemel (vt punkt 29). Tsütotoksilisus tuleb määrata põhikatses nii metaboolse aktivatsiooniga kui ka ilma selleta, kasutades asjakohaseid rakusurma ja rakupopulatsiooni kasvu näitajaid (vt punkte 26 ja 27). Kuigi tsütotoksilisuse hindamine esialgses eelkatses võib osutada kasulikuks, et paremini määrata põhikatses kasutatavad kontsentratsioonid, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Kui tsütotoksilisust hinnatakse eelkatses, ei asenda need tulemused tsütotoksilisuse mõõtmist põhikatses.

Rakukultuuride töötlemine *cytoB*-ga ning ühe-, kahe- ja mitmetuumaliste rakkude suhtelise esinemissageduse määramine kultuuris on täpne meetod, millega saab mõõta, kuidas töötlemine mõjutab rakkude paljunemist ning milline on töötlemise tsütotoksiline või tsütostaatiline toime (6); sellega tagatakse, et mikroskoopiliselt hinnatakse ainult töötlemise ajal või pärast seda jagunenud rakke. Rakukultuuri kohta soovitatakse kasutada vähemalt 500 rakku, et määrata proliferatsioonindeksi blokeeritud tsütokineesi korral (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI)

▼ M7

(6, 27, 68) või replikatsiooniindeks (*replication index*, RI) (vt valemid, 2. liide) ning hinnata töötluste tsütotoksilist ja tsütostaatilist toimet, võrreldes nende väärtusi töödeldud ja kontrolli kultuurides. Muude tsütotoksilisuse näitajate kaudu (nt raku terviklikkus, apoptoos, nekroos, metafaasis rakkude arv, rakutsükkel) võib saada kasulikku teavet, kuid neid ei saa kasutada CBPI või RI asemel.

Uuringute puhul, milles *cytoB*-d ei kasutata, on vaja tõendada, et rakud on kultuuris jagunenud, nii et suurem osa hinnatud rakkudest on jagunenud kemikaaliga töötluste ajal või pärast seda, vastasel juhul võib saada valenegatiivseid tulemusi. Soovitatakse mõõta rakupopulatsiooni suhtelist kahekordistumist (*relative population doubling*, RPD) või rakkude arvu suhtelist suurenemist (*relative increase in cell count*, RICC), et hinnata töötluste tsütotoksilist ja tsütostaatilist toimet (17, 68–71) (vt valemid, 2. liide). Proovivõtule eelneva ajavahemiku pikendamise korral (nt kokkupuude kemikaaliga 1,5–2 normaalse rakutsükli kestuse jooksul, mille järel kogutakse rakud täiendava 1,5–2 normaalse rakutsükli möödumisel, millega proovid võetakse normaalse rakutsükli kestusest kokku 3–4 korda pikema aja möödumisel, nagu on kirjeldatud punktis 38 ja 39) võib RPD-ga tsütotoksilisust alahinnata (71). Neil tingimustel võib RICC olla parem mõõdetav näitaja või võib õigema hinnangu anda tsütotoksilisuse hindamine pärast 1,5–2 normaalse rakutsükli kestuse möödumist. Muude tsütotoksilisuse või tsütostaasi näitajate kaudu (nt raku terviklikkus, apoptoos, nekroos, metafaasis rakkude arv, proliferatsiooniindeks, rakutsükkel, nukleoplasmasillad või tuumasopised) võib saada kasulikku teavet, kuid neid ei saa kasutada RPD või RICC asemel.

Lahusti kontrolli ja positiivseid kontrole kaasa arvamata tuleb hinnata vähemalt kolme katsekonsentratsiooni, mis vastavad nõuetekohase kriteeriumidele (asjakohane tsütotoksilisus, rakkude arv jne). Sõltumata rakutiibist (rakuliinid või lümfotsüütide primaarkultuur) võib iga kontsentratsiooniga töödelda kas paralleelselt mitut või ainult ühte rakukultuuri. Kuigi soovitav on kasutada paralleelkultuure, võib ka üksikkultuuride kasutamist aktsepteerida eeldusel, et nii ühe kui ka paralleelkultuuride puhul hinnatakse kokku ühesugune arv rakke. Üksikkultuuride kasutamine on eriti asjakohane, kui hinnatakse rohkem kui kolme kontsentratsiooni (vt punktid 44–45). Konkreetse kontsentratsiooniga sõltumatult paralleelkultuuridest saadud tulemusi võib andmeanalüüsiks kokku arvestada. Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, on tavaliselt sobivad kahe- kuni kolmekordsed kontsentratsiooniintervallid. Tsütotoksilisuse avaldumise korral peavad katseks valitud kontsentratsioonid katma vahemiku alates kontsentratsioonist, millel avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 29), ja hõlmama kontsentratsioonid, millel esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on kontsentratsiooni-toime sõltuvuse kõver järsu tõusuga ja selleks, et saada andmeid väikese või mõõduka tsütotoksilisuse kohta või et uurida annuse-toime seost üksikasjalikult, tuleb kasutada väiksema intervalliga kontsentratsioonid ja/või enam kui kolme kontsentratsiooni (üks kultuur või mitu paralleelkultuuri), eriti olukorras, kui vajatakse korduskatset (vt punkt 60).

Kui maksimumkontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, on suurima kontsentratsiooni puhul eesmärk saavutada  $55 \pm 5\%$  tsütotoksilisusest soovitatavate tsütotoksilisuse näitajate (st RICC ja RPD vähenemine rakuliinide puhul, kui *cytoB*-d ei kasutata, ning CBPI või RI vähenemine kuni  $45 \pm 5\%$ , kui *cytoB*-d kasutatakse, võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga) põhjal (72). Hoollikas tuleb olla positiivsete tulemuste tõlgendamisel, kui need esinevad vaid selle  $55 \pm 5\%$  tsütotoksilisuse vahemiku ülemises osas (71).

**▼M7**

Halvasti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline kontsentratsioonidel, mis on väiksemad kui kõige väiksem kontsentratsioon, millel kemikaal enam ei lahustu, peab suurim analüüsitud kontsentratsioon kemikaaliga töötuse lõpus alati tekitama hägususe või silma või invertmikroskoobiga nähtav sademe. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal kontsentratsioonil kui vähim kontsentratsioon, millel kemikaal enam ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise kontsentratsiooniga, millel tekib hägususe või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Sademe moodustumise kontsentratsioonil tuleb hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse tegemist (nt värvimist või hindamist). Kasulikuks võib osutada kemikaali lahustuvuse määramine söötmes enne katsega alustamist.

Kui ei sadet ega piiravat tsütotoksilisust ei täheldata, peab suurim kontsentratsioon katse vastama vähimale kontsentratsioonile järgmistest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (73–75). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, nt on see tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogiline materjal (UVCB) (76), keskkonnast saadud ekstrakt jne, võib iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks olla vajalik kasutada suuremat maksimaalset kontsentratsiooni (nt 5 mg/ml), kui sellega ei kaasne olulist tsütotoksilisust. Tuleb siiski märkida, et inimravimite suhtes võivad need nõuded olla teistsugused (93).

*Kontrollid*

Iga kogumise kohta tuleb ette näha ka samaaegsed negatiivsed kontrollid (vt punkt 21), milles töötuseks kasutatavale söötmele lisatakse vaid lahusti ja mille rakke käideldakse muus osas samamoodi kui uuritava kemikaaliga töödeldud kultuure.

Samaaegseid positiivseid kontrole on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsete meetodika tingimustel määrata klastogeene ja aneugeene ning (kui asjakohane) eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust. Positiivsete kontrollide näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib kasutada alternatiivseid positiivseid kontrollkemikaale.

Praegu ei teata ühtegi aneugeeni, mille genotoksilisuse avaldumiseks oleks vaja metaboolset aktivatsiooni (17). Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakudega on piisavalt standarditud lühiajaliste töötuste puhul, mis tehakse paralleelkatsetena metaboolse aktivatsiooniga või ilma selleta, kasutades sama kestusega töötust, võib positiivse kontrolli osas piirduda metaboolset aktiveerimist vajava klastogeeni. Sel juhul tõendab üksainus klastogeenne positiivse kontrolli reaktsioon nii metaboolse aktivatsiooni süsteemi aktiivsust kui ka selle toimivust katsesüsteemis. Pikaajalise töötuse puhul (ilma S9-fraktsioonita) peab siiski olema oma positiivne kontroll, sest töötuse kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Kui klastogeen valitakse ainsaks positiivseks kontrolliks lühiajalise töötuse korral, mis tehakse nii metaboolse aktivatsiooniga kui ka ilma selleta, tuleb metaboolse aktivatsioonita pikaajalise töötuse puhul selleks valida aneugeen. Nii klastogeensuse kui ka aneugeensuse positiivseid kontrole tuleks kasutada metaboolselt kompetentsetes rakkudes, mis ei vaja S9-fraktsiooni.

Iga positiivse kontrolli puhul kasutatakse üht või enam kontsentratsiooni, mis eelduse kohaselt põhjustab fooniga võrreldes korratavaid ja määratavaid suurenemisi, et näidata katsesüsteemi tundlikkust (st toime on selge, kuid ei paljasta kodeeritud mikroskoobipreparaatide identsust hindajale kohe), ning reaktsiooni ei tohi moonutada tsütotoksilisus, mis ületab selles katsemeetodis ette nähtud piire.



▼ **M7**

Tabel 1

**Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollide valimiseks soovitatavad võrdluskemikaalid**

Kategooria	Kemikaal	CASi nr
<b>1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid</b>		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin- <i>N</i> -oksiid	56-57-5
	Tsütosiinarabinoosiid	147-94-4
<b>2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid</b>		
	Benso[a]püreen	50-32-8
	Tsüklofosfamiid	50-18-0
<b>3. Aneugeenid</b>		
	Kolhitsiin	64-86-8
	Vinblastiin	143-67-9

**KATSE KÄIK****Töötlemiskeem**

Konkreetsel rakutsükli etapil toimiva aneugeeni või klastogeeni kindlakstegemise tõenäosuse maksimeerimiseks on väga oluline, et rakutsükli igal etapil töödeldaks uuritava kemikaaliga piisav arv rakke. Kõik töötused tuleb alustada ja lõpetada rakkude eksponentsiaalse kasvu faasis ja rakupopulatsioon peab jätkama kasvamist kuni proovivõtuni. Seepärast võib töötlemiskeem rakuliinide ja primaarsete rakukultuuride puhul mõnevõrra erineda sellest, mida kasutatakse mitogeenset stimulatsiooni vajavate lümfotsüütide puhul nende rakutsükli käivitamiseks (17). Lümfotsüütide puhul on kõige tõhusam lähenemisviis alustada töötlemist uuritava kemikaaliga 44–48 tundi pärast stimulatsiooni fütohemaglutiniiniga, kui rakud jagunevad asünkroonselt (6).

Avaldatud andmetest (19) nähtub, et enamik aneugeene ja klastogeene tuvastatakse pärast 3–6 tundi kestvat lühiajalist töötlust, kas S9-fraktsiooni juuresolekul või ilma selleta, misjärel uuritav kemikaal eemaldatakse ja proovid võetakse ajahetkel, kui töötuse algusest on möödunud ligikaudu 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestust (7).

Negatiivse tulemuse kohta järelduse tegemiseks võib vaja minna põhjalikku hindamist, milleks tuleb läbi viia katsed kõigis kolmes eri katsetingimustega olukorras: kasutades lühiajalist töötlust kemikaaliga metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta ning pikaajalist töötlust kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita (vt punktid 56–58).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga ilma metaboolse aktivatsioonita ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (19).

— Rakud tuleb 3–6 tunniks viia kokkupuutesse uuritava kemikaaliga metaboolse aktivatsiooni tingimustes ja koguda need prooviks ajapunktis, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalsele rakutsükli kestusele töötlemise algusest arvates (19).

▼ **M7**

- Rakud tuleb viia kemikaaliga pidevasse kokkupuutesse ilma metaboolse aktiivsioonita kuni proovi kogumise ajani, mis vastab umbes 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestusele.

Juhul kui üks eespool esitatud katsetingimustest andis positiivse tulemuse, võib muude katsetingimuste kohaldamine osutada ebavajalikuks.

Kui on teada või tekib kahtlus, et uuritav kemikaal mõjutab rakutsükli kestust (nt nukleosiidi analoogide puhul), eriti p53-kompetentsete rakkude puhul (35, 36, 77), võib proovivõtuaga nihutada või taastusaega pikendada täiendava 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse võrra (kokku 3,0–4,0 rakutsükli pärast lühiajalise ja pikaajalise töötamise algust). Need valikud on ette nähtud olukordade jaoks, kui võib tekkida uuritava kemikaali ja *cytoB* interaktsiooni probleem. Kui kasutatakse proovi võtmist pikema aja järel (nt kokku 3,0–4,0 rakutsükli kestust kultiveerimiseks), tuleb tagada, et rakud ikka veel aktiivselt jaguneksid. Näiteks võib 96 tunni möödumisel stimulatsioonist lümfotsüütide eksponentsiaalne kasv väheneda ning monokihtrakukultuurid võivad saavutada konfluentsuse.

Võimalikud rakkude töötlemise skeemid on esitatud tabelis 2. Sõltuvalt uuritava kemikaali stabiilsusest või reaktsioonivõimest või kasutatavate rakkude konkreetsest kasvunäitajatest võib üldisi töötlemisskeeme muuta, kuid seda tuleb põhjendada.

Tabel 2

**Rakkude töötlemise ja kogumise ajad mikrotoomade tekke *in vitro* katses**

Cytob-ga töödeldavad lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid	+ S9 Lühiajaline töötlus	Töödeldakse 3–6 tundi S9-fraktsiooni juuresolekul; eemaldatakse S9-fraktsioon ja töötlemiseks kasutatud sööde; lisatakse värske sööde ja <i>cytoB</i> ; kogutakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisel töötamise algusest.
	– S9 Lühiajaline töötlus	Töödeldakse 3–6 tundi; eemaldatakse töötlemiseks kasutatud sööde; lisatakse värske sööde ja <i>cytoB</i> ; kogutakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisel töötamise algusest.
	– S9 Pikaajaline töötlus	Töödeldakse <i>cytoB</i> juuresolekul 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse jooksul; rakud kogutakse töötamise lõpus.

Ilma *cytoB*-ta töödeldavad rakuliinid  
(Kõik toimub eespool esitatud skeemide kohaselt, ainult *cytoB*-d ei lisata.)

Monokihtrakukultuurides võib 3–6 tundi kestnud töötlemise lõpus olla mitootilisi rakke (eristatavad selle järgi, et on ümmargused ja irduvad kasvunõu pinnalt). Kuna mitootilised rakud irduvad kergesti, võib neid uuritavat kemikaali sisaldava söötme eemaldamisel kaotsi minna. Kui on tõendeid, et mitootiliste rakkude arv on kontrolliga võrreldes oluliselt suurem, mis viitab rakutsükli tõenäolisele peatumisele mitoosifaasis, tuleb rakud koguda tsentrifugimisega ja külvata tagasi rakukultuuri, et vältida kogumise ajal mikrotoomade/kromosoomaberratsiooni tekke riskiga mitoosis olevate rakkude kaotamist.

▼ **M7****Rakkude kogumine ja mikroskoobipreparaadi valmistamine**

Iga rakukultuur tuleb koguda ja käidelda eraldi. Rakkude ettevalmistamine võib hõlmata hüpotoonilist töötlust, kuid see etapp ei ole vajalik, kui rakkude piisav laotumine preparaadis saadakse muul viisil. Mikroskoobipreparaadi valmistamiseks võib kasutada muid meetodeid tingimusel, et hindamiseks saadakse kvaliteetsed rakupreparaadid. Tervikliku rakumembraani ja tsütoplasmaga rakud tuleb säilitada mikrotuumade määramiseks ja tsütokineesi blokeerimisega meetodi puhul kahetuimaliste rakkude usaldusväärseks määramiseks.

Mikroskoobipreparaate võib värvida mitmesuguste meetoditega, nagu näiteks Giemsa meetodiga või kasutades DNA-spetsiifilisi fluorestsentsvärvaineid. Sobiva fluorestsentsvärvaine kasutamisega (nt akridiinoranž (78) või Hoechst 33258 koos püroniin-Y-ga (79)) võib välistada mõned väärtulemused, mis on seotud muude kui DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega. Kinetohoorivastaseid antikehi, nii klastogeensete kui ka aneugeensete protsesside suhtes tundlike (pantseentromeersete) DNA-proovidega tehtud FISH-i või praimerite põhised *in situ* märgistamist pantsentromeersete praimeritega koos DNA asjakohase kontrastvärvimisega võib kasutada, et teha kindlaks mikrotuumade sisaldus (tervikkromosoomid värvuvad, samal ajal kui atsentrilised kromosoomifragmendid ei värvu), kui pakub huvi mehhanistlik teave nende tekke kohta (16, 17). Klastogeensete ja aneugeensete eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, kui nende tõhusus on tõendatud ja kui nad on valideeritud. Näiteks teatavate rakuliinide puhul võib väiksema kui 2n-ploidisusega tuumade kui hüpodiploidsete juhtude mõõtmise kaudu selliste meetoditega, nagu pildianalüüs, laserskaneeriv või läbivoolutsütomeetria, saada kasulikke teavet (80–82). Tuumade morfoloogia vaatlusel võib samuti leida viiteid võimaliku aneuploidisuse kohta. Peale selle võib kasulikuks osutada kromosoomaberratsioonide metafasis määramise katse, soovitatavalt sama tüüpi rakkude ja katsetoodika võrreldava tundlikkusega, et teha kindlaks, kas mikrotuumad on põhjustatud kromosoomimurdudest (arvestades, et kromosoomide kadu ei ole kromosoomaberratsioonkatsega määratav).

**Analüüs**

Kõik mikroskoobipreparaadid, sealhulgas lahustiga töödeldud või töötlemata rakkude omad (kui neid kasutati) ning positiivsed kontrollid, tuleb enne mikrotuumade esinemissageduse mikroskoopilist analüüsi sõltumatult kodeerida. Kui kasutatakse automatiseeritud hindamist, näiteks läbivoolutsütomeetriat, laserskaneerivat tsütomeetriat või pildianalüüsi, tuleb kasutada asjakohaseid meetodeid süstemaatilise hälbe või triivi ohjamiseks. Sõltumata sellest, kas mikrotuumade loendamiseks kasutatakse automaatsüsteemi, tuleb samaaegselt hinnata selliseid näitajaid nagu CBPI, RI, RPD või RICC.

*CytoB*-ga töödeldud kultuurides tuleb iga kontsentratsiooni või kontrolli kohta mikrotuumade esinemissageduse hindamiseks analüüsida vähemalt 2 000 kahe-tuumalist rakku (83), mis paralleelproovide kasutamise korral jagatakse nende vahel võrdselt. Juhul kui annuse kohta kasutatakse ühte kultuuri (vt punkt 28), tuleb kultuuri kohta hinnata 2 000 kahe-tuumalist rakku sellest ainsast kultuurist (83). Kui iga kontsentratsiooni kohta on hindamiseks olemas oluliselt vähem kui 1 000 kahe-tuumalist rakku kahe paralleelkultuuri puhul või üheainsa kultuuri kasutamise korral oluliselt vähem kui 2 000 rakku ja kui olulist mikrotuumade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem tsütotoksiliste kontsentratsioonidega, sõltuvalt sellest, mis on asjakohasem. Tuleb hoolega jälgida, et ei hinnataks ebakorrapärase kujuga kahe-tuumalisi rakke või rakke, mille kaks tuuma on väga erineva suurusega. Peale

▼ **M7**

selle ei tohi kahetuimalisi rakke segi ajada preparaadis halvasti laotunud palju-tuumaliste rakkudega. Rakke, mis sisaldavad rohkem kui kahte põhituumat, ei saa mikrotoomade analüüsimisel arvesse võtta, sest neis rakkudes võib mikrotoomade esinemissageduse lähtetase olla kõrgem (84). Ühetuumaliste rakkude hindamine on aktsepteeritav, kui uuritav kemikaal tõendatult segab *cytoB* toimimist. Sellisel juhul võib kasulik olla korduskatse, milles *cytoB*-d ei kasutata. Kasulikku teavet võib saada, kui hinnata lisaks kahetuimalistele rakkudele ka ühetuumalisi rakke (85, 86), kuid see ei ole kohustuslik.

Katsetes, milles rakuliine ei töödelda *cytoB*-ga, tuleb iga katsekontsentratsiooni või kontrolli kohta mikrotoomade esinemissageduse hindamiseks analüüsida vähemalt 2 000 kahetuimalist rakku (83), mis paralleelproovide kasutamise korral jagatakse nende vahel võrdselt. Kui iga kontsentratsiooni kohta kasutatakse ühte rakukultuuri (vt punkt 28), tuleb sellest ühest kultuurist hinnata vähemalt 2 000 rakku. Kui iga kontsentratsiooni kohta on hindamiseks olemas oluliselt vähem kui 1 000 kahetuimalist rakku kahe paralleelkultuuri kasutamise korral või üheainsa kultuuri kasutamise korral oluliselt vähem kui 2 000 rakku ja kui olulist mikrotoomade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem tsütotoksiliste kontsentratsioonidega, sõltuvalt sellest, mis on asjakohasem.

Kui *cytoB*-d kasutatakse, tuleb määrata CBPI või RI (vt 2. liide), kasutades vähemalt 500 rakku kultuuri kohta. Kui töötlemine toimub *cytoB* manulusega, on oluline tõendada, et rakud on kultuuris jagunenud, nagu on kirjeldatud punktides 24–28.

**Labori pädevus**

Labor peab piisava kogemuse saamiseks enne katse rutiinset kasutamist olema teinud katsesarja positiivsete kemikaalidega, mis toimivad eri mehhanismide kaudu (vähemalt üks metaboolse aktivatsiooniga kemikaal ja üks ilma ning üks, mis toimib aneugeense mehhanismi kaudu, ja mis on valitud tabelis 1 loetletud kemikaalide seast), ning erinevate negatiivsete kontrollidega (sealhulgas töötlemata kultuurid ja eri lahustid/vehiikulid). Nende positiivsete ja negatiivsete kontrollidega saadud toimed peavad olema kooskõlas teaduskirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate katsete põhine andmebaas, nagu on määratletud punktides 49–52.

Positiivseks kontrolliks valitud kemikaale (vt tabel 1) tuleb uurida lühi- ja pikaajalise töötusega ilma metaboolse aktivatsioonita ning samuti lühiajalise töötusega metaboolse aktivatsiooni juuresolekul, et tõendada klastogeensete ja aneugeensete kemikaalide tuvastamiseks ja metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhususe määramiseks vajalikku pädevust ja kasutatud hindamismeetodi (mikroskoopiline analüüs, läbivoolutsütomeetria, laserskaneeriv tsütomeetria või kujutise analüüs) asjakohasust. Välja valitud kemikaalide puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise vahemiku tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada foonist suuremaid ning korratavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid väärtusi.

**Varasemad kontrolli andmed**

Labor peab määrama:

- varasemate katsete alusel positiivse kontrolli tulemuste vahemiku ja jaotuse,
- varasemate katsete alusel negatiivse kontrolli (töötlemata proov, lahusti) tulemuste vahemiku ja jaotuse.

Kui hangitakse algandmeid varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsed negatiivse kontrolli andmed olema kooskõlas kontrolli kohta avaldatud andmetega (kui olemas). Kui kontrolli väärtuste jaotusele lisatakse uusi katseandmeid, peaksid negatiivse kontrolli paralleelid ideaaljuhul olema selle jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (87, 88). Labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi koostamisel tuleb algses kasutada vähemalt 10 katse andmeid, kuid eelistatavalt peaks andmebaas sisaldama vähemalt 20 võrreldavat tingimustel tehtud katse andmeid. Laboritel tuleb kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, selliseid nagu kontrollkaardid (nt vastavuskontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (88)), et määrata, kui suures

▼ **M7**

ulatuses positiivse ja negatiivse kontrolli andmed varieeruvad, ja tõendada, et meetodika on laboris „kontrolli all“ (83). Täiendavaid soovitusi selle kohta, kuidas koguda ja kasutada varasemate katsete andmeid (st tulemuste varasemate andmete andmebaasi võtmise või sellest väljajätmise kriteeriumid ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid), võib leida kirjandusest (87).

Katse-eeskirja muudatuste puhul tuleb arvestada, kas need mõjutavad andmete vastavust neile andmetele, mis on labori varem tehtud kontrollide andmebaasis olemas. Oluliste mittevastavuste korral tuleb koostada uus varasemate kontrolli andmete andmebaas.

Negatiivse kontrolli andmed peaksid hõlmama mikrotoomadega rakkude esinemust ühes rakukultuuris või nende summat paralleelkultuuridest, nagu on kirjeldatud punktis 28. Negatiivse kontrolli paralleelide tulemused peaksid ideaaljuhul olema labori varasemate kontrolli tulemuste jaotuse usaldusvahemikus usaldatavustasemel 95 % (87, 88). Kui negatiivse kontrolli paralleelide tulemused jäävad väljapoole usaldusvahemikku usaldatavustasemel 95 %, võivad need olla varasemate kontrolli andmete jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmusliku väärtusega ning on tõendatud, et katsesüsteem on „kontrolli all“ (vt punkt 50), ja ei ole tõendeid, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksitusega.

#### ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

##### Tulemuste esitamine

Kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit, võetakse mikrotoomade teket indutseeriva toime hindamisel arvesse mikrotoomade esinemise sagedust ainult kahetuumalistes rakkudes (sõltumatult mikrotoomade arvust ühe raku kohta). Hindamisel tuvastatud ühe, kahe või enama mikrotoomaga rakkude arvud võib esitada eraldi ja sellest võib saada kasulikku teavet, kuid see ei ole kohustuslik.

Paralleelselt tuleb mõõta kõikides kemikaaliga töödeldud, samuti negatiivse ja positiivse kontrolli kultuurides avalduva tsütotoksilise ja/või tsütostaatilise toime näitajad (16). Kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit, tuleb kõikide töödeldud ja kontrolli kultuuride puhul rakutsükli hiline mist mõõtvate näitajatena arvutada CBPI ja RI. Ilma *cytoB* juuresolekuta katse puhul tuleb kasutada kas RPD-d või RICC-id (vt 2. liide).

Andmed tuleb esitada iga kultuuri kohta eraldi. Lisaks tuleb tabelina esitada kõikide andmete kokkuvõtte.

##### Katse nõuetekohasuse kriteeriumid

Katse nõuetekohasus põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- paralleelse negatiivse kontrolli tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktis 50;
- paralleelsed positiivsed kontrollid (vt punkt 50) peavad tekitama reaktsioone, mis on võrreldavad labori varasemate positiivse kontrolli tulemuste andmebaasi andmetega ning põhjustama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes paralleelse negatiivse kontrolliga;
- lahustiga kontrollis peab olema täidetud rakkude paljunemise kriteerium (punktid 25–27);
- katsed on tehtud kõigi katsetingimustega, välja arvatud juhul, kui ühes neist on saadud positiivseid tulemusi (punktid 36–40);
- rakkude arv on piisav ja kontsentratsioonid on analüüsitavad (punktid 28 ja 44–46);

▼ **M7**

- suurima annuse valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 24–31.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

Tingimused, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt positiivsena, kui uuritud katsetingimustes (vt punktid 36–39):

- vähemalt ühel katsekontsentratsioonil esineb statistiliselt oluline suurenemine paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes (89);
- vähemalt ühe katse tingimustes on see suurenemine asjakohase trendidestimeetodiga hinnatuna annusest sõltuv (vt punkt 28);
- ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotust (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldavustasemel 95 %; vt punkt 52).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, järeldatakse, et kemikaal põhjustab sellel katsemeetodil kromosoomimurde ja/või kromosoomide lisandumist või kadu. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab ka kirjandusest (90–92).

Tingimused, et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali selgelt negatiivsena, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punktid 36–39):

- mitte ühelgi katsekontsentratsioonil ei esine statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrolliga võrreldes;
- asjakohase trendidestimeetodiga hinnates ei esine annusest sõltuvat suurenemist;
- kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrolli tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldavustasemel 95 %; vt punkt 52).

Sel juhul järeldatakse, et kemikaal ei saa sellel katsemeetodil põhjustada kromosoomimurde ja/või kromosoomide lisandumist või kadu. Soovitusi kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta leiab ka kirjandusest (90–92).

Selget positiivset või selget negatiivset toimet ei ole vaja kinnitada.

Juhul, kui kemikaali toime ei ole selgelt negatiivne ega selgelt positiivne, nagu eespool kirjeldatud, või selleks, et teha kindlaks tulemuse bioloogiline olulisus, hinnatakse andmeid eksperdi hinnangu ja/või täiendavate uuringute abil. Kasulikuks võib osutada lisarakkude hindamine (kui see on asjakohane) või korduskatse tegemine võimaluse korral muudetud tingimustel (nt kontsentratsioonivahemik, teistsugused metaboolse aktivatsiooni tingimused (nt S9-fraktsiooni kontsentratsioon või päritolu)).

Harvadel juhtudel ei võimalda andmestik isegi pärast täiendavaid uuringuid positiivsuse või negatiivsuse üle otsustamist ning seetõttu järeldatakse, et tulemus on ebaselge.

Mikrotoomade tekke *in vitro* katses põhjustavad kemikaalid mikrotoomade teket kromosoomide katkemise, kao või nende mõlema kaudu. Täiendavaks analüüsiks võib kasutada kinetohorivastaseid antikehi, tsentromeerispetsiifilisi *in situ* proove või muid meetodeid, et teha kindlaks, kas mikrotoomade tekkemehhanism on seotud klastogeense ja/või aneugeense toimega.

**▼M7****Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumise kuupäev, kui olemas;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kui teada.
- uuritava aine võime reageerida lahusti/vehiikuliga või rakukultuuri söötmega.
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui teada;
- pH, söötme osmolaalsuse ja sademe tekke mõõtmine rakusöötmes, millesse uuritavat kemikaali lisati.

*Ühe koostisosaga aine:*

- välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemilised nimetused vastavalt vajadusele ja praktilise teostatavusele jne.

*Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid ja segud:*

- iseloomustatakse nii palju kui võimalik, lähtudes keemilistest identifitseerimisandmetest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest.

*Lahusti:*

- lahusti valiku põhjendus;
- lahusti protsendiline sisaldus rakukultuuri lõplikus söötmes.

*Rakud:*

- kasutatud rakkude tüüp ja päritolu;
- kasutatud rakutüübi sobivus;
- rakuliinide puhul: mükoplasma puudumine;
- rakuliinide puhul: teave rakutsükli kestuse või proliferatsiooniindeksi kohta;
- kui kasutatakse lümfotsüüte, siis veredoonori sugu, vanus ja muu asjakohane teave doonori, täisvere või eraldatud lümfotsüütide kohta, kasutatud mitogeen;
- normaalse (negatiivse kontrolli) rakutsükli kestus;
- rakuliinide puhul: passaažide arv, kui olemas;
- rakuliinide puhul: rakukultuuride säilitamise meetodid;
- rakuliinide puhul: modaalne kromosoomiarv.

▼ **M7***Katsetingimused:*

- kui kasutatakse, siis tsütokineesi blokeeriva aine (nt *cytoB*) identifitseerimisandmed, selle kontsentratsioon ja rakkude kokkupuute kestus sellega;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg või mg/ml või mM söötmes);
- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sealhulgas tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud;
- söötme koostis, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, kui asjakohane, niiskusesisaldus;
- söötmele lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);
- inkubeerimise temperatuur ja kestus;
- töötamise kestus;
- pärast töötlemist rakkude kogumise aeg;
- rakkude tihedus külvamisel, kui asjakohane;
- metaboolse aktivatsiooni süsteemi tüüp ja koostis (S9-fraktsiooni allikas, S9-fraktsiooni segu valmistamise meetod, S9-fraktsiooni segu ja S9-fraktsiooni kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9-fraktsiooni kvaliteedikontrollid (nt ensümaatiline aktiivsus, steriilsus, metaboliseerimisvõime);
- positiivse ja negatiivse kontrolli kemikaalid, lõppkontsentratsioonid, töötus- ja taastusaja tingimused ja kestus;
- mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;
- mikrotuumadega rakkude hindamise kriteeriumid (analüüsitava rakkude valimine ja mikrotuumade tuvastamine);
- analüüsitud rakkude arv;
- tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;
- muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;
- kasutatud statistilise analüüsi meetod(id);
- vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotuum sisaldab terveid kromosoomide või nende fragmente, näiteks kinetohoorivastaste antikehade või pantsentromeersete DNA-proovide kasutamine.
- pH, osmolaalsuse ja sademe määramiseks kasutatud meetodid.

*Tulemused:*

- analüüsi jaoks sobivate rakkude määratlus;
- *cytoB* juuresolekuta katse puhul töödeldud rakkude arv ja kogutud rakkude arv iga rakukultuuri kohta, kui kasutatakse rakuliine;



▼ M7

- tsütokineesi blokeerimise meetodi kasutamise korral määratud tsütotoksilisuse näitaja, näiteks CBPI või RI; kui tsütokineesi blokeerimise meetodeid ei kasutatud, siis RICC või RPD; muud vaatlustulemused (näiteks rakkude konfluentsus, apoptoos, nekroos, metafaaside arv, kahetuumaliste rakkude esinemissagedus);
- sademe tekke tunnused ja määramise aeg;
- andmed söötme pH ja osmolaalsuse kohta, kui need on määratud;
- ühe-, kahe- ja paljutuumaliste rakkude jaotus, kui kasutatakse tsütokineesi blokeerimise meetodit;
- mikrotuumadega rakkude arv iga töödeldud ja kontrollkultuuri kohta eraldi; vajaduse korral tuleb määratleda, kas see on määratud kahe- või ühetuumalistest rakkudest;
- kontsentratsiooni-toime vaheline seos, kui võimalik;
- paralleelse negatiivse (lahusti) ja positiivse kontrolli andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli katsete andmed, sh vahemik, keskvärtused, standardhälbed ja jaotuse usaldusvahemik usaldatavustasemel 95 %, samuti mõõtepunktide arv;
- statistiline analüüs; p-väärtused, kui need on asjakohased.

*Tulemuste arutelu.*

*Järeldused.*

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997), „Towards a validation of the micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 392/1–2, pp. 1–4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993), „The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project“, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3–15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985), „Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay“, *Cytobios*, Vol. 43/172–173, pp. 233–246.
- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000), „Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35/3, pp. 167–172.
- (6) Fenech, M. (2007), „Cytokinesis-block micronucleus cytome assay“, *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084–1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986), „Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation“, *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193–198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), „Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34–43.

▼ M7

- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), „Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe“, *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9–20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991), „Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA“, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297–302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), „The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes“, *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329–334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993), „Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe“, *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205–213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), „Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization“, *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519–525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), „Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes“, *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9–20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996), „Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy“, *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233–245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996), „Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 211–219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003), „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153–163.
- (18) Käesoleva lisa peatükk B.10, „*In vitro* kromosoomaberratsioonkatse imetajarakudega“.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006), „SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13–36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37–60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61–87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88–124.
- (23) Oliver, J. *et al.* (2006), „SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125–152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997), „Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience“, *Mutation Research*, Vol. 392/1–2, pp. 187–208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997), „Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience“, *Mutation Research*, Vol. 392/1–2, pp. 45–59.

▼ M7

- (26) Miller, B. *et al.* (1998), „Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test“, Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81–116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999), „Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches“, *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183–190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999), „The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity“, *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55–71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000), „*In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances“, *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137–163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002), „A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity“, *Mutation Research*, Vol. 517/1–2, pp. 123–134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999), „Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU)“, *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569–580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006), „Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1–152.
- (33) Kirkland, D. (2010), „Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial“, *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139–147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011), „Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28–36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011), „Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/5, pp. 373–384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995), „A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test“, *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3–4, pp. 105–115.
- (37) ECVAM (2006), „Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing“, ESAC 25<sup>th</sup> meeting, 16.–17. november 2006. Kättesaadav aadressil: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, „Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel“. Kättesaadav aadressil: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008), „ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT)“, *Mutagenesis*, Vol 23/4, lk 271–283.
- (40) ILSI paper (käsikiri), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. „Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing“, *Mutation Research*.

▼ M7

- (41) Scott, D. *et al.* (1991), „International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147–205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992), „Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells“, *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297–305.
- (43) Brusick, D. (1986), „Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations“, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789–886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007), „Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium“, *Mutation Research*, Vol. 634/1–2, pp. 177–183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrotri-acetic Acid“, *Environmental and Molecular Mutation*, Vol. 49, pp. 439–452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985), „Measurement of micronuclei in lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol. 147/1–2, pp. 29–36.
- (47) Fenech, M. (1997), „The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method“, *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11–18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010), „Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis“, *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825–840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010), „Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51/3, pp. 251–259.
- (50) Le Hagarat, L. *et al.* (2010), „Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays“, *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555–560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012), „An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay“, *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295–304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002), „Fumonisin B<sub>1</sub> is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells“, *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257–260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004), „Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge“, *Toxicology*, Vol. 198/1–3, pp. 315–328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997), „Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals“, *Mutation Research*, Vol. 392/1–2, pp. 61–70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001), „Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31–45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), „Revised methods for the Salmonella mutagenicity test“, *Mutation Research*, Vol. 113/3–4, pp. 173–215.
- (57) Ong, T.-M. *et al.* (1980), „Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver“, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55–65.

▼ M7

- (58) Elliot, B.M. *et al.* (1992), „Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* genotoxicity assays“, *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175–177.
- (59) Matsushima, T. *jt* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), „Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51–59.
- (61) UNEP (2001), „Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP)“ (Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP)). Kättesaadav aadressil: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), „Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes“, *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225–8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91–103.
- (64) Zamora, P.O. *jt* (1983), „Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay“, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795–801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008), „An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay“, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122–130.
- (66) Fenech, M. (1993), „The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations“, *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35–44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002), „A protocol for the *in vitro* micronucleus test. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity“, *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103–112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004), „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research*, Vol. 564, pp. 97–100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008), „Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects“, *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1–3.
- (70) Surralles, J. *et al.* (1995), „Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures“, *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169–184.
- (71) Honma, M. (2011), „Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86–87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011), „*In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop“, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101–107.
- (73) OECD (2014), „Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)“, ENV/JM/TG(2014)17. Nõude esitamisel kättesaadav.

## ▼ M7

- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012), „Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity“, *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32–56.
- (75) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54/1, pp. 36–43.
- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), „Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances“, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012), „Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells“, *Mutation Research*, Vol. 746/1, pp. 29–34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), „An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test“, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241–247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), „A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y“, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269–275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011), „Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/4, pp. 280–286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011), „*In vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52/5, pp. 355–362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010), „Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies“, *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33–40.
- (83) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment*, nr 198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003), „HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures“, *Mutation Research*, Vol. 534/1–2, pp. 65–75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), „Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay“, *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193–8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011), „The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance“, *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873–99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010), „Compilation and use of genetic toxicity historical control Data“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87–90.
- (88) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), „*In vitro* micronucleus test“, *väljaandes Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463–467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987), „Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1–175.

**▼M7**

- (92) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.
- (93) USFDA, „International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use“.

▼ **M7**

## 1. liide

## MÕISTED

**Aneugeen** – iga kemikaal või protsess, mis põhjustab interaktsiooni kaudu mitootilise või meiotilise rakujagunemise tsükli komponentidega rakkude või organismide aneuploidust.

**Aneuploidus** – iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidus).

**Apoptoos** – programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida etappe, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosiga või osakeste raku membraanilt koorumise teel (*shedding*).

**Genotoksiline** – üldtermin, mis hõlmab kõiki DNA- või kromosoomikahjustuse tüüpe, sealhulgas murde, deletsioone, adukte, nukleotiidide modifikatsioone ja sidemete teket, ümberpaigutusi, geenimutatsioone, kromosoomaberratsioone ja aneuploidust. Kõik genotoksiliste toimete tüübid ei põhjusta mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

**Interfaasirakud** – rakud, mis ei ole mitoosifaasis.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kinetohoor** – valguline struktuur, mis moodustub kromosoomi tsentromeersel piirkonnal ja millele kinnituvad raku jagunemise ajal kääviniidid, võimaldades tütar-kromosoomide korrastatud liikumist tütar-rakkude poolustele.

**Klastogeen** – iga aine või protsess, mis tekitab rakkude või eukarüootsete organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomaberratsioone.

**Kontsentratsioonid** – tähendavad uuritava kemikaali lõppkontsentratsioone söötmes.

**Kromatiidide lahknematus** – paardunud kromatiidid ei eraldu teineteisest ega jaotu normaalselt tekkivate tütar-rakkude vahel, mille tulemusena on tütar-rakkude kromosoomiarvud ebanormaalsed.

Käesoleva katsemeetodiga ilma *cytoB* juuresolekuta tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus töödeldud rakkude RPD (rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine) või RICC (rakkude arvu suhteline suurenemine) vähenemisenähtena negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 27 ja 2. liide).

**Lahusti kontroll** – üldtermin, millega tähistatakse kontrollikultuure, kuhu lisatakse ainult uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahusti.

**Maksa S9-fraaktsioon** – maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifugimist 9 000 g juures, st maksa torekstrakt.

**Mikrotoomad** – raku põhituumast eraldi ja lisaks sellele esinevad väikesed tuumad, mis on tekkinud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

**Mitoos** – rakutuuma jagunemine, mis tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

**Mitoosiindeks** – suhtarv, mis saadakse, kui vaatlusaluse rakupopulatsiooni metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakkude koguarvuga; näitab rakkude proliferatsioonitaset kõnealuses populatsioonis.



▼ **M7**

**Mutageenne** – tekitab päriliku muutuse geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomaberratsioonid).

**p53 staatus** – p53 on valk, mis on seotud rakutsükli, apoptoosi ja DNA reparatsiooni reguleerimisega. Teoreetiliselt peaksid geenimutatsioonid või kromosoomaberratsioonid kergemini tekkima rakkudes, milles puudub funktsionaalne p53 valk ja mis seetõttu ei ole võimelised rakutsükli peatama või kõrvaldama kahjustunud rakke apoptoosi või teiste DNA kahjustuse vallandatud ja p53 funktsioonidega seotud mehhanismide kaudu (nt DNA reparatsiooni indutseerimine).

**Polüploidus** – rakkude või organismi genoommutatsioon, mis hõlmab terveid kromosoomistikke, erinevalt sellisest genoommutatsioonist, mis hõlmab üksikute kromosoomide arvu muutust (aneuploidus).

**Proliferatsiooniindeks (*Proliferation Index, PI*)** – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

**Proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral (*cytokinesis-block proliferation index, CBPI*)** – teise rakujagunemise rakkude osakaal töödeldud rakupopulatsioonis, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt valem, 2. liide).

**Rakkude arvu suhteline suurenemine (*Relative Increase in Cell Count, RICC*)** – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

**Rakkude paljunemine** – rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

**Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (*Relative Population Doubling, RPD*)** – tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui *cytoB*-d ei kasutata (vt valem, 2. liide).

**Replikatsiooniindeks (*Replication Index, RI*)** – täielikult läbitud rakujagunemistsükli osakaal töödeldud rakukultuuris kemikaaliga kokkupuute ja taastumise ajal, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt valem, 2. liide).

**S9-fraaktsiooni segu** – S9-fraaktsiooni ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse jaoks vajalike kofaktorite segu.

**Tsentromeer** – kromosoomi DNA-piirkond, kus mõlemad kromatiidid on teineteisega seotud ja mille külge kinnituvad kõrvuti mõlemad kinetohoorid.

**Tsütokinees** – mitoosile vahetult järgnev rakujagunemise protsess, mille tulemusel tekivad kaks tütarrakku, milles mõlemas on üksainus tuum.

**Tsütostaas** – rakkude kasvu inhibeerumine (vt valem, 2. liide).

**Tsütotoksilisus** – käesoleva katsemeetodiga *cytoB* juuresolekul tehtud katsetes määratletakse tsütotoksilisus kui töödeldud rakkude CBPI (proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral) või RI (replikatsiooniindeks) vähenemine negatiivse kontrolliga võrreldes (vt punkt 26 ja 2. liide).

**Töötlemata kontroll** – paralleelsed rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M7

## 2. liide

## TSÜTOTOKSILISUSE HINDAMISE VALEMID

***Kui kasutatakse cytoB-d***, tuleb tsütotoksilisust hinnata **CBPI (proliferatsiooniindeks blokeeritud tsütokineesi korral)** või **RI (replikatsiooniindeks)** alusel (17, 69). CBPI näitab tuumade keskmist arvu raku kohta ja seda võib kasutada rakkude paljunemise arvutamiseks. RI näitab rakutsükli keskmist arvu raku kohta *cytoB*-ga kokkupuute ajavahemiku jooksul töödeldud kultuurides kontrollkultuuridega võrreldes ning seda saab kasutada tsütostaasi osakaalu (%) arvutamiseks.

$$\text{tsütostaasi \%} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

ning:

T = uuritava kemikaaliga töödeldud kultuur

C = kontrollkultuur

kus:

$$\text{CBPI} = \frac{((1\text{tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times 2\text{tuumaliste rakkude arv}) + (3 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv}))}{(\text{Rakkude üldarv})}$$

Seega vastab CBPI väärtus 1 (kõik rakud on ühetuumalised) 100 % tsütostaasile.

Tsütostaas = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((2\text{tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv})) / (\text{Rakkude üldarv})_T}{((2\text{tuumaliste rakkude arv}) + (2 \times \text{paljutuumaliste rakkude arv})) / (\text{Rakkude üldarv})_C} \times 100$$

T = töödeldud kultuurid

C = kontrollkultuurid

RI = 53 % tähendab seega, et võrreldes kontrollkultuuris jagunenud rakkude arvuga, mille puhul moodustusid kahe- ja enamatuumalised rakud, on töödeldud kultuuris jagunenud kõigest 53 % sellest arvust, see tähendab 47 % rakke on tsütostaasis.

***Kui cytoB-d ei kasutata***, soovitatakse (69) tsütotoksilisust hinnata **RICC (rakkude arvu suhteline suurenemine)** või **RPD (rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine)** alusel, sest mõlema näitaja puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{rakkude arvu suurenemine töödeldud kultuurides}(\text{lõplik} - \text{alguses}))}{(\text{rakkude arvu suurenemine kontrolli kultuurides}(\text{lõplik} - \text{alguses}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv kontrolli kultuurides})} \times 100$$

kus:

**populatsiooni kahekordistumine** =  $[\log(\text{rakkude arv pärast töötlust} \div \text{rakkude algarv})] \div \log 2$

Seega tähendab 53 % RICC või RPD, et 47 % esines tsütotoksilisust/tsütostaasi.

**▼ M7**

Kasutades **proliferatsiooniindeksit (PI)**, võib tsütotoksilisust hinnata ühest rakust koosnevate kloonide (c11), kahest rakust koosnevate kloonide (c12), 3–4 rakust koosnevate kloonide (c14) ja 5–8 rakust koosnevate kloonide (c18) arvu loendamise abil.

$$PI = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$$

Proliferatsiooniindeksit (PI) on kasutatud tsütotoksilisuse väärtusliku ja usaldusväärse näitajana *in vitro cytoB* juuresolekuta kultiveeritud rakuliinides (35–38) ja seda võib käsitada kasuliku lisaparameetrina.

Igal juhul peab rakkude arv enne töötlust olema töödeldud kultuurides ja negatiivse kontrolli kultuurides ühesugune.

Kuigi varem on tsütotoksilisuse näitajana kasutatud RCC-d (st rakkude arv töödeldud kultuuris / rakkude arv kontrollikultuuris), ei ole see enam soovitatav, sest sellega võib tsütotoksilisust alahinnata.

Kui kasutatakse automatiseeritud hindamissüsteemi, näiteks läbivoolutsütomeetriat, laserskaneerivat tsütomeetriat või pildianalüüsi, võib valemis rakkude arvu asendada tuumade arvuga.

Negatiivse kontrolli kultuurides peab rakupopulatsiooni kahekordistumine või replikatsiooniindeks olema kooskõlas nõudega võtta rakukultuurist proov ajahetkel, mis vastab ligikaudu 1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestuse möödumisele.

## ▼ M3

**B.50. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: DA**

## SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlmede katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidiini või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: DA (mille töötas välja Daicel Chemical Industries, Ltd.) on LLNA variant, mis on vaba radioaktiivsusest ja milles lümfotsüütide paljunemise näitajana kasutatakse adenosinotriifosfaadi (ATP) sisalduse määramiseks bioluminestsentsi abil. Katsemeetod LLNA: DA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline eksperdihinnangu komisjon soovib seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerimise põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10, 11, 12, 13). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (14). LLNA-d (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhendis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamise versiooni, need on LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhendis 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhendis 442 B), tuleb eelistada meriseakatsetele peatükis B.6, OECD katsejuhendis 406 (14), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.
2. Nii nagu LLNA puhul, uuritakse LLNA: DA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhendis 406) (14) selleks otstarbeks.

## MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: DA on muudetud LLNA-meetod võimalike naha sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (14) asemel LLNA: DA-d, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10, 11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine

## ▼ M3

kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: DA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: DA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

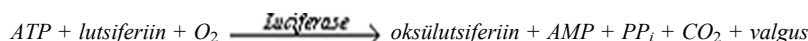
- LLNA: DA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhised 406) (14). Lisaks võimaldab LLNA: DA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi), kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: DA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Hoolimata LLNA: DA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (14) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi kohaste katsete 406 kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaalikklasside või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivad funktsionaalseid rühmi (16), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhendit 406 (14)). LLNA puhul kindlaks tehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: DA puhul (10). Lisaks ei tarvitse LLNA: DA kasutamine olla sobiv selliste ainete uurimiseks, mis mõjutavad ATP taset (näiteks ATP inhibiitorina toimivad ained) või segavad rakusise ATP täpset määramist (nt ATPd lagundavate ensüümide juuresolek, rakuvälise ATP olemasolu lümfisõlmes). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: DA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: DAga saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,8–2,5 (vt punktid 31–32). See tugineb 44 ainest koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi  $\geq 1,8$  (vt punkt 6), millest LLNA: DA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kolme aine puhul 12st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainest, mille SI oli 1,8–2,5 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

## KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

- LLNA: DA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud

▼ **M3**

rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine-kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,8 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetod põhineb sellel, et bioluminestsentsi järgi mõõdetakse ATP sisaldust ja (kuna see korreleerub elusrakkude arvuga) (17) hinnatakse selle järgi paljunevate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenivates lümfisõlmedes (18, 19). Bioluminestsentsi meetodis kasutatakse ensüümi lutsiferaasi, mis katalüüsib valguse tekkimist ATPst ja lutsiferiinist vastavalt järgmisele reaktsioonile:



Eralduva valguse intensiivsus on lineaarselt seotud ATP kontsentratsiooniga ja seda mõõdetakse luminomeetriga. Lutsiferiini-lutsiferaasi katse on tundlik meetod ATP kvantitatiivseks mõõtmiseks ja seda kasutatakse paljudes meetodites (20).

**KATSE KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: DA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/J-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (12, 13). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: DA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

**Pidamis- ja söötmingimused**

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (21), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema  $22 \pm 3$  °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

**Loomade ettevalmistamine**

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

**Annustamislahuste valmistamine**

10. Tahke uuritava aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiini-seadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

▼ **M3****Usaldusväärse kontroll**

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: DA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katsed, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: DA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,8 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 10 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneealdehüüd (Chemical Abstracts Service (CASi) number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.
  
12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNA: DAd ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: DA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.
  
13. Paralleelselt positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: DA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija), ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.
  
14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katse saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (22).

▼ **M3**

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (23). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.
16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:
- struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;
  - teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;
  - varasemad toetavad LLNA: DA andmed;
  - toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja annusemäärad**

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.
18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 24 antud soovitusel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (24, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).
19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüüleetüülketoon, propüleenglükool ja dimetüül-sulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.



▼ **M3**

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (22). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamise), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

**Esialgne sõelkatse**

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: DA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: DA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela katseaine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.
22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: DA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse keha-kaal enne katset ja enne katse lõppu (8. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust), 7. päeval (24 tundi enne katse lõpetamist) ja 8. päeval. Lisaks võib 8. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA: DA põhikatses jaoks valitud suurim annus on järgmine väiksem annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), mille puhul ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemääraast nahaärritust.

Tabel 1

**Punetuse hinne**

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2

## ▼ M3

Nähud	Hinne
Möödukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkinine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurendamine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 31, 32, 33, 34).
24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: DA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordineerimise kadu, värin ja krampid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1.–8. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (36).

**Põhiuuringu katse ajakava**

25. Katse ajakava on järgmine.

- *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse naatriumlaaurüülsulfaadi (SLS) 1 % vesilahust, kasutades SLSi lahusesse kastetud pintslit ja kattes kogu kõrvalesta väliskülje nelja-viie pintslitõmbega. Üks tund pärast SLSiga töötlemist kantakse kummagi kõrvalesta välisküljele 25 µl sobivalt lahjendatud uuritava ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või hiljutine perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).
- *2., 3. ja 7. päev:* korratakse 1. päeval tehtud eeltöötlust SLSi 1 % vesilahusega ja uuritava aine pealekandmist.
- *4., 5. ja 6. päev:* loomi ei töödelda.
- *8. päev:* määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Ligikaudu 24–30 tundi pärast 7. päeval toimunud uuritava aine pealekandmise algust surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (22). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

▼ **M3****Rakususpensioonide valmistamine**

26. Valmistatakse iga hiire mõlemalt küljelt välja lõigatud lümfisõlmerakkude üherakuline suspensioon, milleks lümfisõlmed pannakse kahe objektiklaasi vahele ja purustatakse klaaside kerge surumisega üksteise vastu. Pärast selle kontrollimist, kas kude on jaotunud õhukese kihina, eraldatakse objektiklaasid teineteisest. Mõlemal objektiklaasil olev kude suspendeeritakse fosfaatpuhvriga soolalahuses, milleks kumbagi objektiklaasi hoitakse kaldu Petri tassi kohal ja loputatakse puhverlahusega, kraapides samal ajal rakukaabitsaga kudet klaasi küljest lahti. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väikesed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Kokku tuleks mõlema objektiklaasi loputamiseks kasutada 1 ml fosfaatpuhvriga soolalahust. Lümfisõlmerakkude suspensioon Petri tassil tuleb rakukaabitsaga kergelt homogeniseerida. Seejärel võetakse mikropipetiga 20 µl alikvoot lümfisõlmerakkude suspensioonist, püüdes mitte võtta silmaga nähtavat membraani, ja segatakse siis 1,98 ml fosfaatpuhvriga soolalahusega, nii et kokku saadakse 2 ml proovi. Samal viisil valmistatakse siis teine 2 ml proov, nii et iga looma kohta saadakse kaks proovi.

**Rakkude vohamise määramine (lümfotsüütide ATP-sisalduse mõõtmine)**

27. Lümfisõlmede ATP-sisalduse suurenemine määratakse lutsiferiin-lutsiferaasi meetodiga, kasutades ATP mõõtmise komplekti, millega bioluminestsents määratakse suhtelistes luminesentsi ühikutes (RLU). Katse tegemise aeg looma tapmisest kuni ATP-sisalduse mõõtmiseni peaks iga üksiku looma puhul olema ühesugune, umbes 30 minuti piires, kuna ATP-sisaldus pärast looma tapmist möödunud ajaga järk-järgult väheneb (12). Seega tuleks kogu tegevus kõrvalesta lümfisõlmede väljalõikamisest kuni ATP mõõtmiseni lõpetada 20 minuti jooksul vastavalt ettemääratud ajakavale, mis on kõikide loomade puhul ühesugune. ATP luminesents tuleks mõõta kummaski 2 ml proovis, nii et kokku saadakse iga looma kohta kaks ATP mõõtmist. Seejärel määratakse kindlaks keskmine ATP luminesents ja kasutatakse seda edasistes arvutustes (vt punkt 30).

**TÄHELEPANEKUD****Kliinilised tähelepanekud**

28. Vähemalt kord päevas tuleks iga loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (36).

**Kehamass**

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

**TULEMUSTE ARVUTAMINE**

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine RLU hiire kohta lahusti-/kandaine-kontrollrühma keskmise RLU-ga hiire kohta. Keskmine SI kandaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

▼ **M3**

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,8 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,8–2,5) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (2, 3, 37).
32. Kui SI on vahemikus 1,8–2,5, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse lisateavet, nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või tugeva nahaärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibiilsaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on üksikasjalikult arutatud mujal (4).
33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paari- või kolme-annuserühmade ja paralleelsete lahuse-/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paari- või kolme-annuserühmade testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikke dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma RLU väärtused, rühma keskmine suhte RLU/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

**Katsearuanne**

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalised-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus;

**▼ M3**

katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

- ATP määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed ATP määramise komplekti kohta;
- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväarsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväarsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- iga katselooma surmamise aeg ja tema proovidest ATP mõõtmise aeg;
- tabelina iga üksiku hiire RLU väärtused ja iga katserühma SI väärtused;
- iga katserühma RLU/hiire keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;

## ▼ M3

- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

## KIRJANDUS

- 1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- 3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- 4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- 5) Van Oeh, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- 6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)
- 7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
- 8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- 9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- 10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>

## ▼ M3

- 11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf).
- 12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.
- 13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.
- 14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- 16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- 17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81–88.
- 18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127–132.
- 19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.
- 20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346–370.
- 21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- 22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)
- 23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- 24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13–31.
- 25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

## ▼ M3

- 26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- 27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>.
- 28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- 29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- 30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- 31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- 32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- 33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- 34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- 35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm)
- 36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.
- 38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>



▼ **M3**

## 1. liide

## MÕISTED

*Täpsus*: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (38).

*Võrdlusaine*: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

*Valenegatiiv*: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

*Valepositiiv*: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

*Oht*: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

*Laboritevaheline reprodutseeritavus*: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (38).

*Laborisisene reprodutseeritavus*: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (38).

*Võõrväärtus*: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

*Kvaliteedi tagamine*: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

*Usaldusväärsus*: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärssuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (38).

*Naha sensibiliseerimine*: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontakt sensibiliseerimiseks.

*Stimulatsiooniindeks (SI)*: arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

*Uuritav aine (uuritav kemikaal)*: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M3**

**B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE  
KATSE: BRDU-ELISA**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ **M4****B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE  
KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 436 (2009). Esimene sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal ja see on hiljem läbi vaadatud (vt käesoleva lisa peatükk B.2 (1)). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi (*Acute Toxic Class*, ATC) määramise meetodi koostamist (2, 3, 4) peeti asjakohaseks pärast läbivaadatud ägeda suukaudse mürgisusastme meetodi vastuvõtmist (käesoleva lisa peatükk B.1b) (5). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetodi tulemuslikkuse tagantjärele hindamine näitas, et kõnealune meetod on sobiv kasutamiseks klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil (6). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetod võimaldab kasutada kindlaksmääratud sihtkontsentratsioonide mitut etappi, et määrata uuritava kemikaali mürgisuse klass. Peamise näitajana kasutatakse letaalsust, kuid suurtes valudes, kannatustes, piinlevad või suremas olevad loomad tuleks kannatuste minimeerimiseks humaansel viisil surmata. Humaansete lõpetamiskriteeriumide suunised on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (7).
2. Käesoleva katsemeetodi kasutamise ja tõlgendamise suunised on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katset käsitlevas juhenddokumendis nr 39 (8).
3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud 1. liites ja juhenddokumendis nr 39 (8).
4. Katsemeetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida uuritava kemikaali vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale määrusele (EÜ) nr 1272/2008 (9). Kui on vajalik LC<sub>50</sub> punktväärtuste hinnangud või mõju kontsentratsioonist sõltuvuse analüüsid, on asjakohane kasutada käesoleva lisa peatükis B.2 (1) esitatud meetodit. Täpsemad suunised katsemeetodi valiku kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8). Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetriselised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

## LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud, mille andmete abil oleks võimalik täiendada katse tegemisel loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuri ainete kohta. Kontsentratsioone, mis eeldatavasti tekitavad söövitava<sup>(1)</sup> või tugevasti ärritava toime tõttu tugevat valu ja kannatusi, ei tohiks käesoleva katsemeetodiga katsetada (vt juhenddokument nr 39 (8)).

<sup>(1)</sup> Söövitavuse hindamiseks võib kasutada eksperdiarvamust ja järgmisi tõendeid: inimeste ja loomadega saadud kogemused, olemasolevad (*in vitro*) andmed, näiteks käesoleva lisa peatükk B.40 (10), B.40a (11) või OECD katsejuhend nr 435 (12), pH-väärtused, teave samalaadsete kemikaalide kohta või mis tahes muud asjakohased andmed.

▼ **M4****KATSE PÕHIMÕTE**

6. Katse seisneb selles, et astmelise meetodiga kogutakse neljatunnise kokkupuute jooksul uuritava kemikaali sissehingamisel tekkiva ägeda mürgisuse kohta piisavalt teavet aine klassifitseerimiseks. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Igal ettenähtud kontsentratsiooni etapil tehakse katse kolme loomaga kummastki soost. Olenevalt loomade suremisest ja/või sellest, kas loomad on suremas, võib uuritava kemikaali ägeda mürgisuse hindamiseks piisata kahest etapist. Kui esitatakse tõendid, et üks sugu on tundlikum kui teine, võib katset jätkata ainult sellest soost loomadega, kumb on tundlikum. Järgmine etapp määratakse kindlaks eelmise etapi tulemusega, nii et
  - a) lisakatseid ei ole vaja teha;
  - b) katse tehakse kolme loomaga kummagi soo kohta või
  - c) kuue sellest soost loomaga, kumb on tundlikum, s.o mürgisusklassi alampiiri hinnangud peaksid põhinema kuuel loomal uuritava kontsentratsiooni rühma kohta nende soost olenemata.
7. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaansed lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhenddokumendis nr 19 (7).

**MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

8. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

**Loomade ettevalmistamine**

9. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 20$  % selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

**Pidamistingimused**

10. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema  $22 \pm 3$  °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuute toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele üleareseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise

▼ **M4**

minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohane mine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatul koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

**Inhalatsioonikambriid**

11. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu eesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuute kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (8).

**KOKKUPUUTETINGIMUSED****Kontsentratsioonide manustamine**

12. Soovitatakse kasutada fikseeritud neljatunnist kokkupuuteaega, arvestamata tasakaalustamisega. Muu kestus võib olla vajalik erinõuete täitmiseks, kuid selle kasutamist tuleks uuringuprotokollis põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kogukehakambri uuritava kemikaaliga kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu selle suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.
13. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

**Osakeste suurusjaotus**

14. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 µm ning geomeetriline standardhälve ( $\sigma_g$ ) on 1,5–3,0 (8, 13, 14). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügrokoopseid materjalid (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

▼ **M4****Uuritava kemikaali preparaat kandaines**

15. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saaks sisse hingata. Materjali hõõrumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitlemisel ei teki sissehingatavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingatavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

**Loomade kontrollrühm**

16. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandainet kui vesi, tuleks kandaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringus mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandaine kontrollrühm vajalik.

**KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE****Kambri õhuvarustus**

17. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambri ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutesüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas meetodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (8, 15). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisaldust mõõta.

**Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus**

18. Kambri temperatuur tuleks hoida  $22 \pm 3$  °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni neljatunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

▼ **M4****Uuritav kemikaal – nimikontsentratsioon**

19. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katseüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

**Uuritav kemikaal – tegelik kontsentratsioon**

20. Tegelik kontsentratsioon on proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon loomade hingamistsoonis inhalatsioonikambri. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelstatult lenduvas olekus) kordusanalüüsi korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.
21. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsides või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).
22. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljatunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuväruuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui  $\pm 10\%$  gaaside ja aurude puhul või  $\pm 20\%$  vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg ( $t_{95}$ ) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse  $t_{95}$  saavutamiseks vajalikku ajavahemikku. Juhendid  $t_{95}$  hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8).

## ▼ M4

23. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoodet või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (8).

**Uuritav kemikaal – osakeste suurusjaotus**

24. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrisel filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veeenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katset ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool, või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 14).

**KATSE KÄIK****Põhikatse**

25. Igal etapil kasutatakse kolme looma kummagi soo kohta või kuut looma sellest soost, mis on tundlikum. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliselgi kui roti korral, võib suurimat kokkupuudet kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Lähtedoosina kasutatavaks kontsentratsiooniks valitakse üks nelja kindlaksmääratud taseme hulgest ning lähtekontsentratsioon peaks olema selline, mis tekitab kõige tõenäolisemalt mürgistuse mõnele loomale, kellele doos manustatakse. Gaaside, aurude ja aerosoolide katseskeemid (mis on lisatud 2.–4. liites) seisnevad katsetamises CLP-määruse ((EÜ) nr 1272/2008) 1.–4. kategooria piirväärtustega (9) gaaside puhul (100, 500, 2 500, 20 000 ppm nelja tunni jooksul) (2. liide), aurude puhul (0,5, 2, 10, 20 mg / l nelja tunni jooksul) (3. liide) ja aerosoolide puhul (0,05, 0,5, 1,5 mg / l nelja tunni jooksul) (4. liide). 5. kategooria, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, on seotud vastavaid piirkontsentratsioone ületavate kontsentratsioonidega. Iga lähtekontsentratsiooni puhul kohaldatakse vastavat katsetamise skeemi. Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale, kuni on võimalik määrata kategooria.
26. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katses kasutatud loomad ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. Enne iga järgmise kontsentratsiooniga kokkupuudet soovitatakse oodata kolm või neli päeva, et oleks võimalik jälgida hiljem avalduvat mürgisust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.



▼ **M4****Piirsalduskatse**

27. Piirsalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid aineid või samalaadseid segusid käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse (täpsemad suunised on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8)).
28. Tavalise meetodi kasutamisel viiakse kolm looma kummagi soo kohta või kuus looma sellest soost, kumb on tundlikum, kokkupuutesse vastavalt kontsentratsiooniga 20 000 ppm gaaside puhul, 20 mg/l aurude korral ja 5 mg/l tolmu/udu puhul (kui see on saavutatav), mis on käesoleva katsemeetodi piirsalduskatse. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakese suurus (st osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on 1–4 µm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemi (GHS) (16) kohaselt ei ole katsetamine suuremal kui piirkontsentratsioonil loomade heaolu kaalutlustel soovitatav. GHSi 5. kategooria (16) kohast katsetamist, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemused on otseselt seotud inimeste tervise kaitsega, ning seda tuleks sel juhul uuringuprotokollis põhjendada. Plahvatusohliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

**VAATLUSED**

29. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Uuringute tegemisel tuleks olla hoolikas, et mürgistuse kliinilisi tunnuseid kindlaks tehes vältida kokkupuutest põhjustatud esialgse halva välimuse ja hingamise ajutiste muutuste pidamist töötlemisega seotud mõjudeks. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmatakse humaansel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

**▼M4**

30. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

**Kehamassid**

31. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt > 20 % võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmatakse humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

**Patoloogia**

32. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritählepanu hingamisteede mis tahes muutustele.
33. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võib kaaluda uuringu kavasse eelnevalt ettenähtud täiendavate uuringute lisamist, nagu ellujäänud rottide kopsude kaalu mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise teel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamistee mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügrooskoopse kemikaali kohta.

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

34. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserrühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud.

▼ **M4****Katseprotokoll**

35. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

*Katseloomad ja pidamistingimused*

- Puuringimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.
- Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.
- Loomade arv, vanus ja sugu.
- Randomiseerimismeetod.
- Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).
- Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

*Uuritav kemikaal*

- Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).
- Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

*Kandeaine*

- Kandeaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).
- Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

*Inhalatsioonikamber*

- Inhalatsioonikambri kirjeldus, sh selle mõõtmed ja maht.
- Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.
- Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.
- Õhuallikas ja kambrisse suunatud / kambrist välja lastud õhu töötlemiseks ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.
- Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kalibreerimisel kasutatud meetodid.
- Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).
- Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.
- Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonna proovide võtmine kambris.
- Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.

**▼ M4**

- Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg ( $t_{95}$ ).
- Kogu kambri oleva õhu vahetuste arv tunnis.
- Mõõteseadmed (vajaduse korral).

*Andmed kokkupuute kohta*

- Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.
- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambri suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse analüüsida iga faasi eraldi.
- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (mg/l, mg/m<sup>3</sup> jne), kontsentratsioonid mahuühikutes (ppm, ppb jne) võib teatada sulgudes.
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve ( $\sigma_g$ ) ning nende arvutusmeetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

*Katsetingimused*

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).
- Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

*Tulemused*

- Tabelitena andmed katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelitena andmed kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse andmete kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja  $\sigma_g$  arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise andmete (st mürgistustunnustega loomad, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, raskus ja kestus) ja annusemäärade kohta.
- Uuringupäeval registreeritud iga looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöördumus iga looma puhul.

▼ **M4**

- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.
- CLP-määruse kohane kategooria klassifikatsioon ja LC<sub>50</sub> piirväärtus.

*Tulemuste arutelu ja tõlgendamine*

- Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõllalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (7) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaanseil viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

*KIRJANDUS*

- 1) Käesoleva lisa peatükk B.2 „Äge mürgisus (sissehingamisel)“.
- 2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.
- 3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.
- 4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC<sub>50</sub> Tests. *ALTEX* 1: 129–134.
- 5) Käesoleva lisa peatükk B.1b „Äge suukaudne mürgisus – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod“.
- 6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 9) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

**▼ M4**

- 10) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine”.
- 11) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.
- 12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2<sup>nd</sup> Edition) Informa Healthcare, New York.
- 14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.
- 15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
- 16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_welcome\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html)]

▼ M4

*1. liide*

MÕISTE

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**▼ M4***2. liide***Toimimine gaasi iga lähtekontsentratsiooni juures (ppm nelja tunni kohta)**Üldised märkused <sup>(1)</sup>

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

2.a liide: lähtekontsentratsioon on 100 ppm.

2.b liide: lähtekontsentratsioon on 500 ppm.

2.c liide: lähtekontsentratsioon on 2 500 ppm.

2.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 000 ppm.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

<sup>(1)</sup> Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

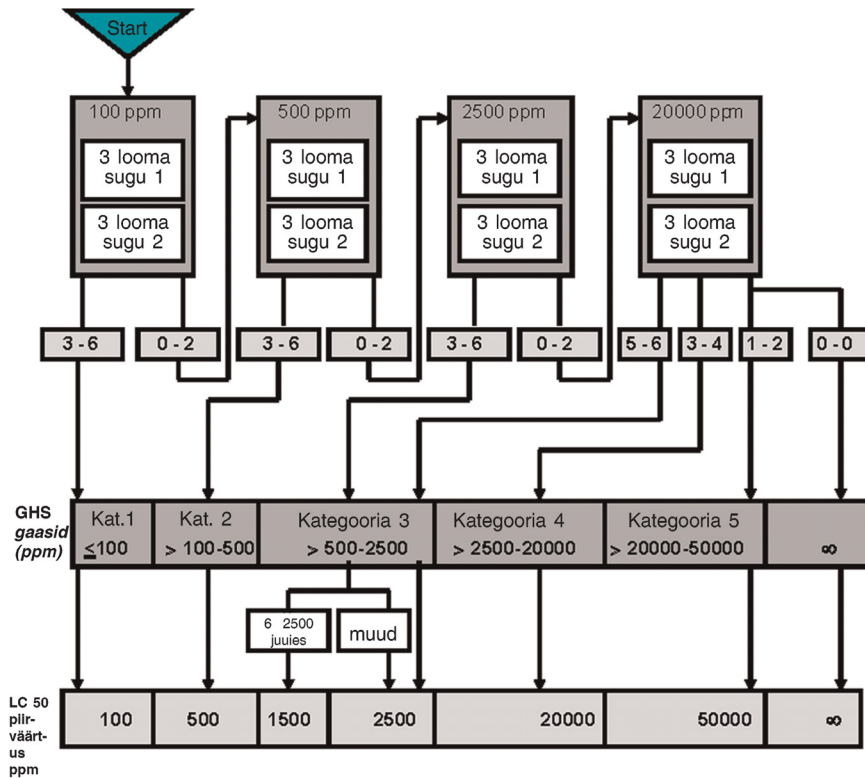


## ▼ M4

## 2.a liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 100 ppm  
4 tunni jooksul



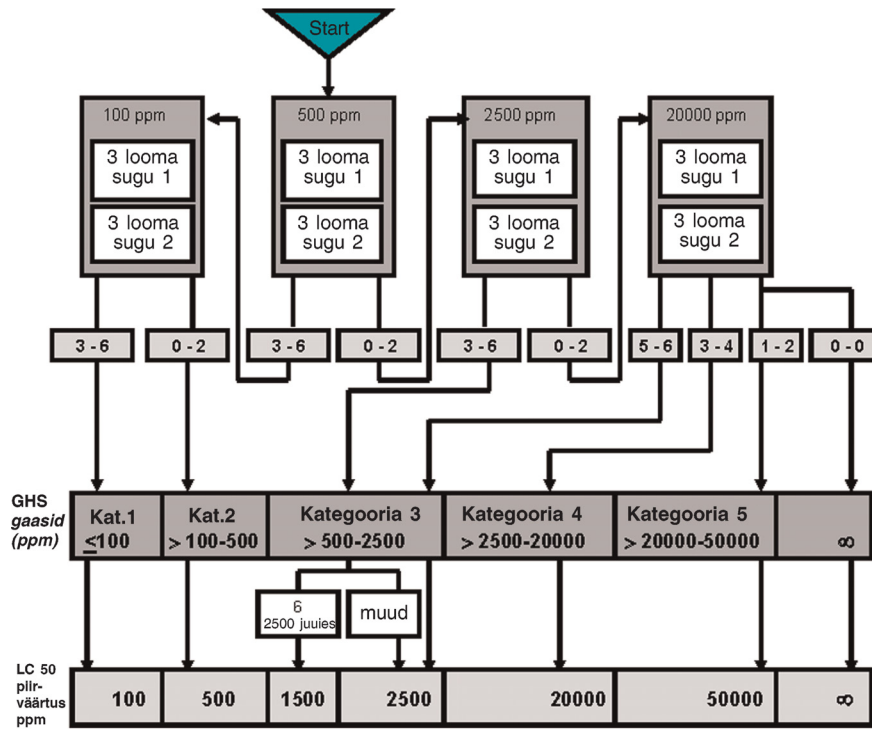
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

## ▼ M4

## 2.b liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 500 ppm  
4 tunni jooksul



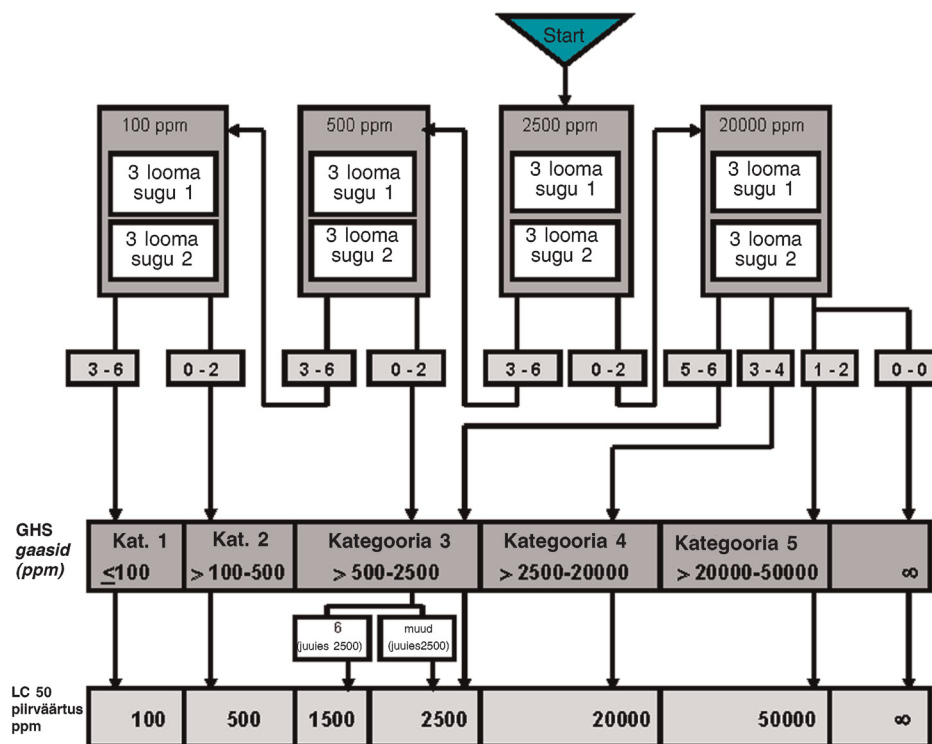
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8).

## ▼ M4

## 2.c liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist  
2 500 ppm 4 tunni jooksul



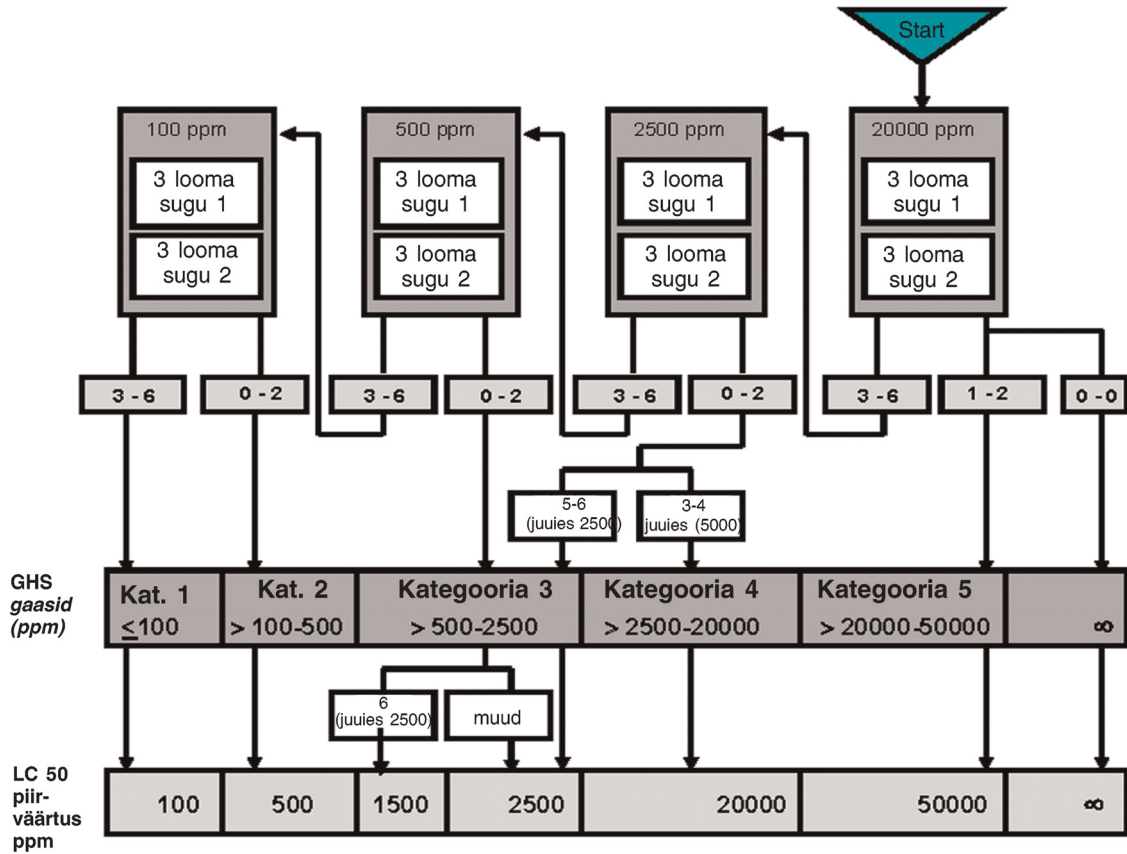
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0–6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

## ▼ M4

## 2.d liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 000 ppm 4 tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

**▼ M4***3. liide***Toimimine auru iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)**Üldised märkused <sup>(1)</sup>

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

3.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

3.b liide: lähtekontsentratsioon on 2,0 mg/l.

3.c liide: lähtekontsentratsioon on 10 mg/l.

3.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

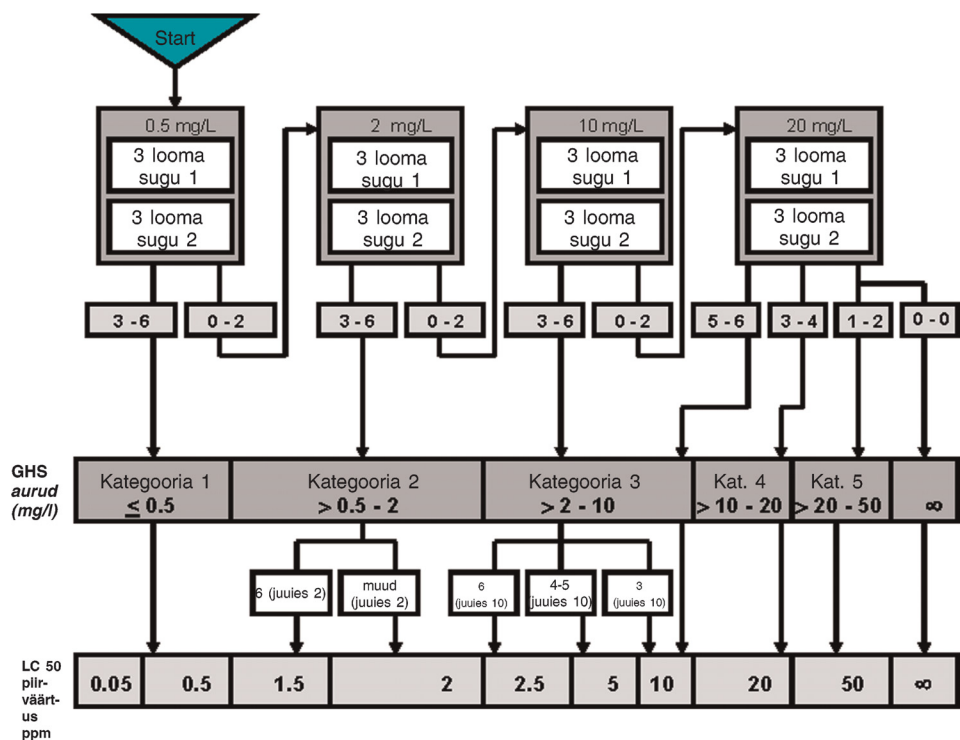
<sup>(1)</sup> Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

## ▼ M4

## 3.a liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l 4 tunni jooksul



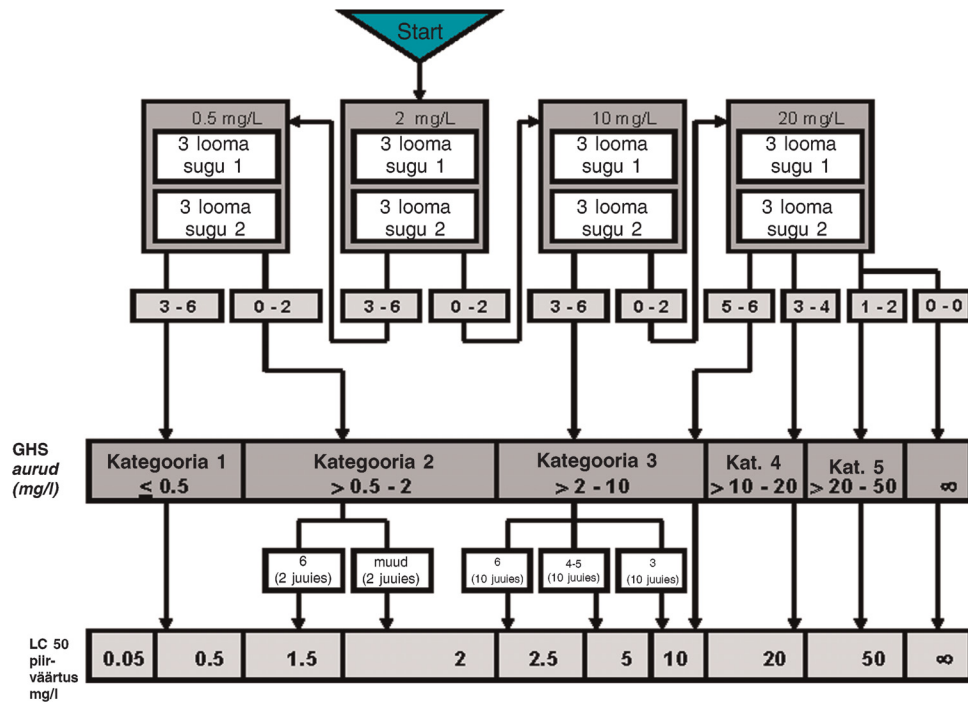
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

## ▼ M4

## 3.b liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 2 mg/l 4 tunni jooksul



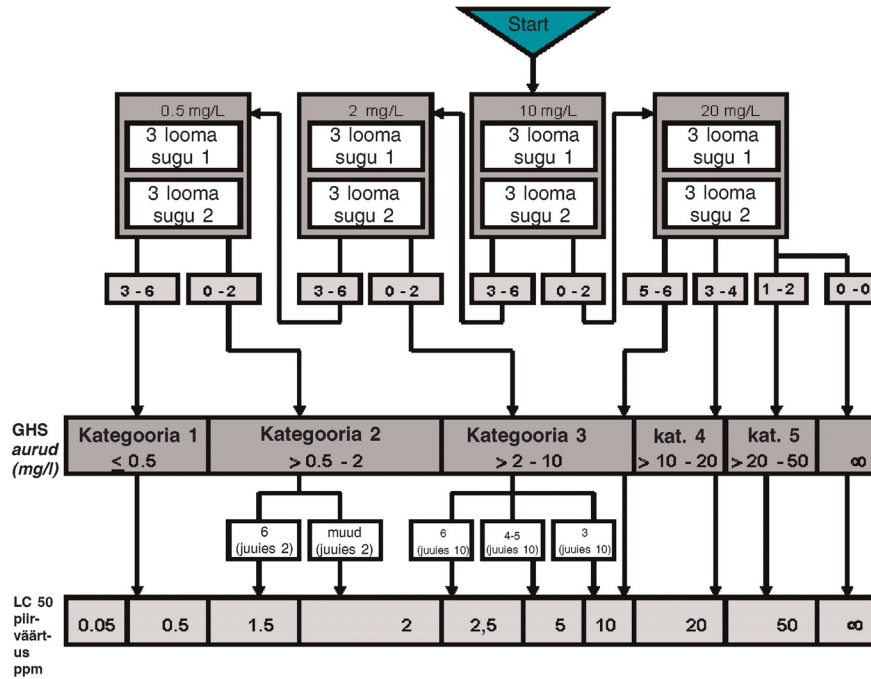
- $3\sigma + 3\varphi$  või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

## ▼ M4

## 3.c liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 10 mg/l 4 tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

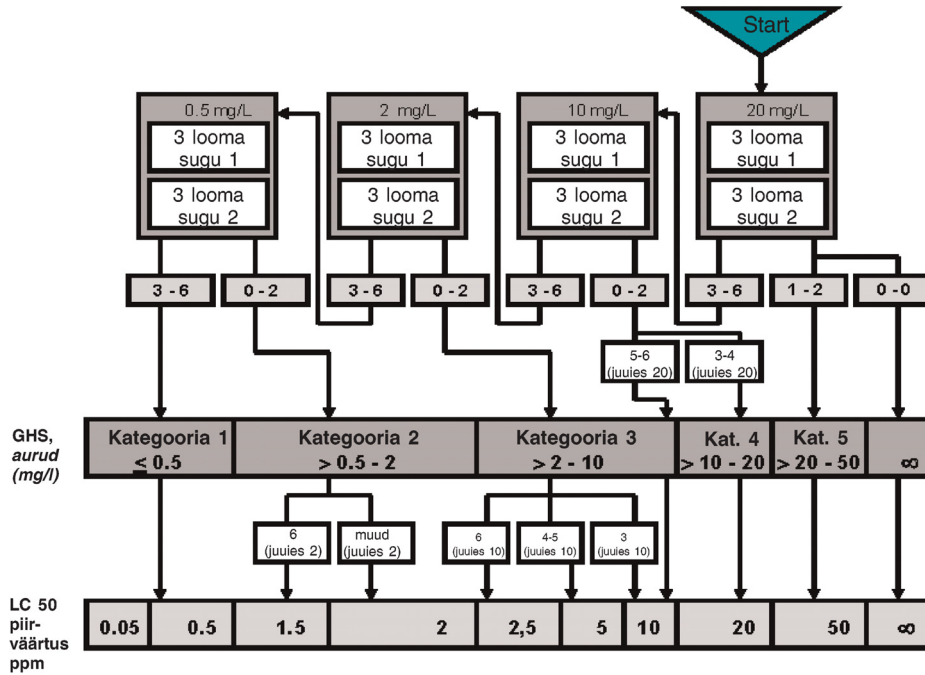


## ▼ M4

## 3.d liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 mg/l 4 tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

**▼M4***4. liide***Toimimine aerosooli iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)**Üldised märkused <sup>(1)</sup>

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

4.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,05 mg/l.

4.b liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

4.c liide: lähtekontsentratsioon on 1 mg/l.

4.d liide: lähtekontsentratsioon on 5 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

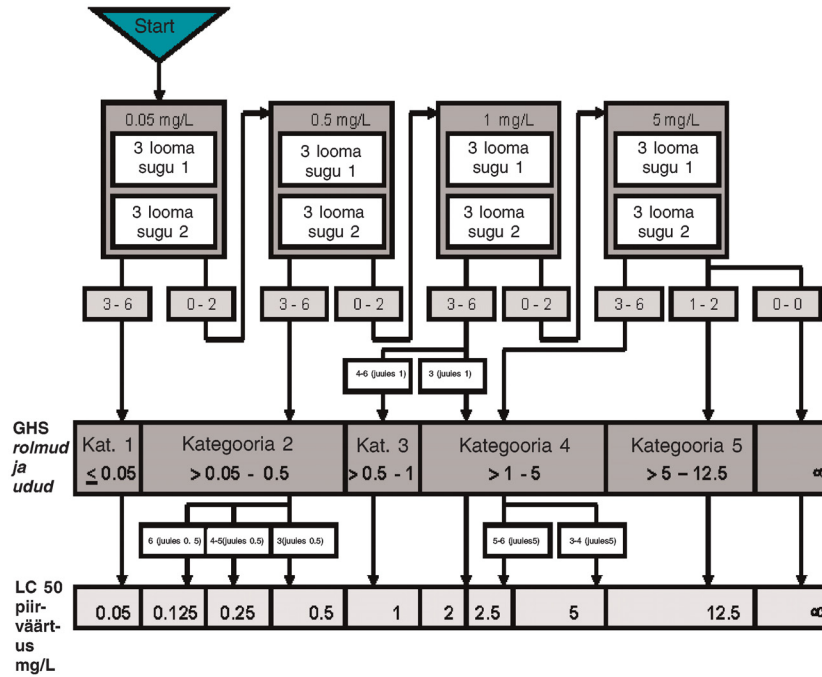
<sup>(1)</sup> Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

## ▼M4

## 4.a liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist  
0,05 mg/l 4 tunni jooksul



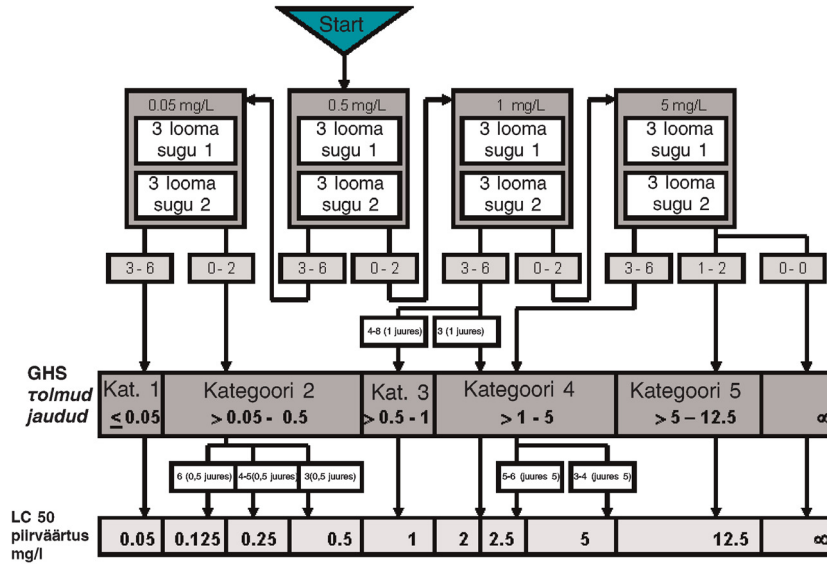
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

## ▼ M4

## 4.b liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l  
4 tunni jooksul



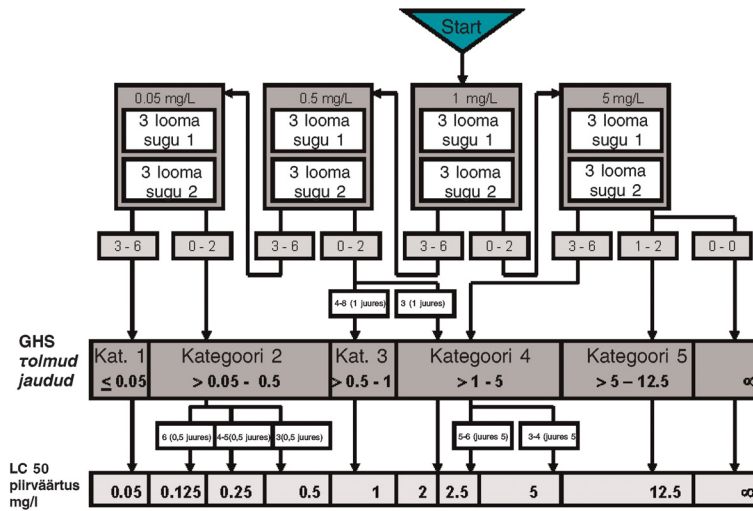
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

## ▼ M4

## 4.c liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 1 mg/l 4 tunni jooksul



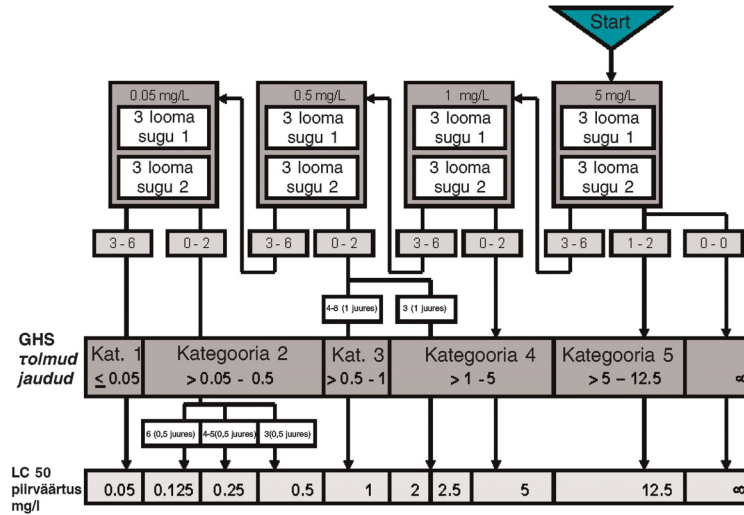
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

## ▼M4

## 4.d liide

## Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 5 mg/l  
4tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8)."

▼ **M5****B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 426 (2007). OECD paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse töörihma koosolekul Kopenhaagenis 1995. aasta juunis arutati, kas on vaja ajakohastada olemasolevaid OECD katsejuhendeid paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse määramiseks ja töötada välja uusi katsejuhendeid seni veel hõlmamata näitajate määramiseks (1). Töörühm soovitas koostada katsejuhendi arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse määramiseks, võttes aluseks USA keskkonnakaitseameti (EPA) katsejuhendi, mis on hiljem läbi vaadatud (2). 1996. aasta juunis toimus Kopenhaagenis teine arutelu selleks, et koostada sekretariaadis suunised uue, arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse juhendi peamiste küsimuste kohta, sealhulgas näiteks loomaliigi valimise, doseerimisperioodi, hinnatavate näitajate ja tulemuste hindamise kriteeriumide kohta. Ameerika Ühendriikide suunised neurotoksilisuse riski hindamiseks avaldati 1998. aastal (3). Oktoobris 2000 toimusid üksteise järel OECD ekspertide koosolek ja ILSI (International Life Science Institute) riskihindamise seminar ning Tokyos peeti 2005. aastal ekspertide koosolek. Koosolekutel arutati seoses käesoleva katsemeetodi väljatöötamisega seniste katsejuhenditega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi ning koosolekute soovitusi (4, 5, 6, 7). Lisateavet käesoleva katsemeetodi kasutamise, tulemuste tõlgendamise ja kasutatud terminite kohta võib leida OECD juhenddokumendist nr 43 „Reproduktiivtoksilisuse määramine ja hindamine” (8) ning nr 20 „Neurotoksilisuse määramine” (9).

## LÄHTEKAALUTLUSED

2. Paljud kemikaalid avaldavad inimesele ja muudele liikidele arenguhäireid põhjustavat neurotoksilist mõju (10, 11, 12, 13). Kemikaali toksiliste omaduste hindamisel võib olla vaja määrata arenguhäireid põhjustava neurotoksilise mõju võimalikkust. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu eesmärk on koguda andmeid mõju kohta, mida emakasisene või sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga avaldab järglaste arenevale närvisüsteemile; andmeid kogutakse doosi ja toime vahelise sõltuvuse, võimalike funktsionaalsete ja morfoloogiliste mõjude kohta.
3. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu võib teha eraldi või reproduktiivtoksilisuse ja/või neurotoksilisuse uuringu raames (nt katsejuhendid B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) või lisaks sünnieelseid arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringule (nt katsejuhend B.31 (17)). Kui arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust uuritakse muu uuringu raames, on tingimata vaja säilitada kummagi uuringutüübi terviklikkus. Kõik katsed peaksid olema kooskõlas kohaldatavate õigusaktidega või valitsuse ja institutsiooniliste suunistega katseloomade kasutamise kohta teadusuuringutes (nt 18).
4. Katselabor vaatab enne uuringu tegemist läbi ja võtab arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta. Selline teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali nimetus ja struktuur, füüsikalised-keemilised omadused, muud sama kemikaaliga *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemused, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilised andmed ning kemikaali eeldatav(ad) kasutusala(d). Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähtedooši.

▼ **M5****KATSE PÕHIMÕTE**

5. Katsekemikaali manustatakse loomadele tiinuse ja imetamise ajal. Katseid tehakse emasloomadega, et hinnata mõju tiinus- ja imetamisperioodil, ning katsed võivad hõlmata ka võrdleva teabe (emasloomad vs. nende järglased) hankimist. Järglased valitakse neurotoksilisuse hindamiseks pesakondadest juhuslikult. Hindamine hõlmab vaatlusi, et teha kindlaks suuri neuroloogilisi ja käitumuslikke kõrvalekaldeid; seejuures hinnatakse füüsilist arengut, käitumise ontogeneesi, motoorset aktiivsust, motoorseid ja sensoorseid funktsioone, õppimist ja mälu; samuti hinnatakse aju massi ja neuropatoloogiat sünnijärgse arengu käigus ja pärast täiskasvanuikka jõudmist.
  
6. Kui katsemetodi alusel tehakse eraldi uuring, võib igas rühmas kasutada täiendavaid loomi, et teha konkreetseid neurokäitumuslikke uuringuid, neuropatoloogiat, neurokeemiat või elektrofüsioloogiat uuringuid, millega võidakse täiendada käesoleva katsemetodi kasutamisega saadavaid andmeid (16, 19, 20, 21). Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimemehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilisuse tüübile. Nende täiendavate katsete jaoks võib kasutada emasloomi ja poegi. Lisaks võib kasutada ka *ex vivo* või *in vitro* katseid, kui need katsed ei muuda *in vivo* katsete usaldusväärsust.

**KATSE ETTEVALMISTAMINE****Loomaliigi valimine**

7. Eelistatud liigiks on rott; sobivuse korral võib kasutada muid liike. Siiski tuleb silmas pidada, et lootelise ja sünnijärgse arengu kohta käesolevas katsemetodis osutatud päevad kehtivad rottide sagedamini kasutatavate liinide puhul, ning kui kasutatakse muud loomaliiki või ebatavalist rotiliini, siis tuleb valida võrreldavad päevad. Muu liigi kasutamist tuleks põhjendada toksikoloogiliste, farmakokineetiliste ja/või muude andmete alusel. Põhjenduses tuleks viidata olemasolevatele liigispetsiifilise käitumise sünnijärgse arengu neuroloogia ja neuropatoloogia hinnangutele. Kui varasemad katsed andsid muret tekitavaid tulemusi, tuleks kaaluda sama liigi/aretusliini kasutamist. Kuna erinevate liinide rottidel on erinevad omadused, tuleks tõendada, et kasutamiseks valitud liini rotid on piisava sigivuse ja reageerimisvõimega. Kui arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringus kasutatakse muud liiki, tuleb dokumentidega tõendada selle liigi tundlikkust ja saadavate tulemuste usaldusväärsust.

**Pidamis- ja söötmingimused**

8. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema  $22 \pm 3$  °C. Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Valgusttsükli võib enne paaritamist ja uuringu kestuse ajaks muuta ka vastupidiseks, et funktsionaalseid ja käitumise näitajaid saaks hinnata pimedal perioodil (punase valguse juures), kui loomad on tavaliselt aktiivsed (22). Kui valguse ja pimeduse vaheldumise tsüklit muudetakse, tuleb ette näha vajalik kohanemisperiood, et loomad kohaneksid uue tsükliga. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Katseprotokollis esitatakse sööda ja vee tüüp ning nii sööda kui ka vee kohta tuleks teha saasteainete analüüs.



## ▼ M5

9. Loomi võib hoida puurides eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmadena. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Pärast toimunud paarituse tõendamist või hiljemalt tiinuse 15. päeval tuleks paaritatud loomad paigutada eraldi poegimispuuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Paaritunud emasloomadele antakse poegimisaja lähenemisel sobivad ja kindlaksmääratud pesaehitusmaterjalid. On hästi teada, et ebasobiv kohtlemine või stress tiinuse ajal võib teha kahju, sealhulgas põhjustada loote surma enne poegimist või loote ja vastsündinud poegade arengu häireid. Selleks, et ära hoida loote surma kemikaali manustamisega mitte seotud tegurite mõjul, tuleb loomi tiinuse ajal kohelda hoolikalt ja vältida välistest teguritest, näiteks müra, tingitud stressi.

**Loomade ettevalmistamine**

10. Tuleks kasutada terveid loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem katses kasutatud, välja arvatud juhul, kui uuring toimub muu uuringu raames (vt punkt 3). Katseloomad tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Igale loomale tuleb määrata ja märkida kordumatu identifitseerimisnumber. Kõikide katserühmade loomad peaksid olema võimalikult ühesuguse kaalu ja vanusega, ning need peaksid olema kasutatava liigi ja liini tavapärase vahemikus. Iga doosimäära juures tuleks kasutada noori täiskasvanud poegimata emasloomi. Ödesid ja vendi ei tohiks lasta omavahel paarituda ja tuleb hoolitseda, et seda ei juhtuks. Tiinuse 0-päevaks (tiinestumispäevaks, *gestation day*, GD) loetakse päev, millal märgati spermat tupes ja/või vaginaalkorki. Kui tarnijalt osetakse teadaoleva tiinestumispäevaga tiined loomad, nähakse ette sobiv kohanemisaeg (nt 2–3 päeva). Paaritatud emasloomad jagatakse erapooletul viisil ja võimalikult ühtlaselt kontrollrühmadesse ja katserühmadesse (nt soovitatavalt stratifitseeritud juhusliku meetodiga, et tagada rühmade vahel loomade ühtlane jaotus, näiteks kehamassi järgi). Sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad tuleks jaotada võrdselt eri rühmade vahel.

**KATSE KORRALDUS****Loomade arv ja sugu**

11. Tiinete emasloomade arv igas kontrollrühmas ja katserühmas, mille liikmed puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaks olema piisav, et sünniks piisav arv järglasi neurotoksilisuse hindamiseks. Iga doosimäära puhul soovitatakse kasutada kokku 20 pesakonda. Kui iga sellise rühma kohta saavutatakse nõutav pesakondade arv, on lubatud paralleelsed ja vahelduvad rühmadega manustamiskavad; paralleelproovide arvessevõtmiseks kasutatakse sobivaid statistilisi mudeleid.
12. Hiljemalt 4. sünnijärgsel päeval (*post-natal day*, PND 4) (sünni päev on PND 0) tuleks kõikide pesakondade suurus ühtlustada; selleks surmatakse juhusliku valiku alusel liigsed pojad, et kõikide pesakondade suurus oleks võrdne (23). Pesakonna suurus ei tohiks ületada keskmist pesakonna suurust kasutatava näriliste liini puhul (8–12). Pesakonda tuleks alles jätta võrdne arv isas- ja emasloomi, kuivõrd see on võimalik. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Pärast pesakondade standardimist (liigsete poegade surmamist) ja enne edasiste funktsionaalsete näitajate määramist tuleks kõik võõrutuseelsete või võõrutusjärgsete katsete jaoks ettenähtud pesakonna liikmed varustada individuaalse kordumatu märgisega, kasutades sobivat humaanset meetodit (nt 24).

## ▼ M5

**Loomade jagamine rühmadesse funktsionaalsete ja käitumuslike testide tegemiseks, aju massi määramiseks ja neuropatoloogiliseks hindamiseks**

13. Meetodis lubatakse kasutada eri lähenemisviise selleks, et jagada loomad rühmadesse, kes puutuvad kemikaaliga kokku *in utero* ja imetamise kaudu ning kellele tehakse funktsionaalsed ja käitumuslikud testid, kellel jälgitakse suguküpsuse saabumist ja määratakse aju massi ning keda hinnatakse neuropatoloogia seisukohast (25). Vajaduse korral võib üksikjuhtudel määrata muid käitumuslike neuroloogilisi funktsioone (nt sotsiaalset käitumist), uurida neurokeemilisi või neuropatoloogilisi aspekte, kui sellega ei kahjustata algselt nõutud testide usaldusväärsust.
14. Pojad valitakse igast doosirühmast ja iga näitaja hindamiseks alates 4. sünnijärgsest päevast (PND 4). Poegade valimine rühmadesse peaks toimuma nii, et iga doosirühma iga pesakonna kummastki soost pojad oleksid võimalikult ühtlaselt esindatud kõikides testides. Motoorse aktiivsuse katsetes tuleks poegade hulgast ühtesid ja samu isas- ja emasloomapaare uurida igas võõrutuseelses vanuses (vt punkt 35). Kõikide muude käitumuslike testide tegemiseks võib määrata sama või erineva isaslooma ja emaslooma paari. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud loomade kognitiivse talitluse hindamisel võib osutada vajalikuks määrata rühmadesse erinevad pojad, et vältida tulemuste sõltumist erineva vanuse või eelneva õppimise mõjust (26, 27). Võõrutamise ajal (PND 21) võib pojad, keda katsete tegemiseks ei valita, humaansel viisil surmata. Kõik muudatused poegade rühmadesse jagamisel tuleks katseprotokollis fikseerida. Statistiline mõõtmisühik peaks olema pesakond (või poeginud emasloom), aga mitte poeg.
15. Poegade jagamiseks rühmadesse, millega tehakse võõrutuseelseid ja -järgseid vaatlusi, kognitiivseid katseid, patoloogiavaatlusi jne, on mitmeid võimalusi (vt üldkava (joonis 1) ja rühmadesse jagamise näide (1. liide)). Soovitatav minimaalne loomade arv igas doosirühmas võõrutuseelsete ja -järgsete uuringute puhul on järgmine:

Kliinilised vaatlused ja kehamass	Kõik loomad
Üksikasjalikud kliinilised vaatlused	20/sugu (1/sugu/ pesakond)
Aju mass (pärast fikseerimist) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Aju mass (fikseerimata) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine immersiooni või perfusiooniga) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine perfusiooniga) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Suguküpsuse saabumine	20/sugu (1/sugu/ pesakond)
Muud olulised arengunäitajad (soovi korral)	Kõik loomad
Käitumise ontogenees	20/sugu (1/sugu/ pesakond)
Motoorne aktiivsus	20/sugu (1/sugu/ pesakond)
Motoorne ja sensoorne funktsioon	20/sugu (1/sugu/ pesakond)
Õppimine ja mälu	10/sugu (*) (1/pesakond)

(\*) Kognitiivse talitluse katsed: tundlikkusest olenevalt tuleb kaaluda suurema arvu loomade kasutamist, nt kuni 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast (loomade rühmadeks jagamine, vt 1. liide) (täiendavad juhised valimi suuruse kohta on esitatud OECD juhenddokumendis 43 (8)).

## ▼ M5

**Dooside manustamine**

16. Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja näha ette paralleelsed kontrollrühmad. Doosimäärad tuleks määrata nii, et tekkivad toksilised mõjud tugevneksid järk-järgult. Kui seda ei piira kemikaali füüsikalise-keemilised või bioloogilised omadused, tuleks kõrgeim doosimäär valida nii, et tiinel emasloomal ilmneksid mürgistusnähud (nt kliinilised sümptomid, kehamassi väiksem (mitte üle 10 %) suurenemine ja/või tõendid mürgisuse kohta sihtorganile, mis ei luba doosi piirmäära suurendada). Suurima doosi piiriks võib teatavate eranditega olla 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Näiteks võib inimese oodatava kokkupuute ulatus sundida kasutama suuremat doosi. Teise võimalusena tuleks teha prooviuuring või esialgsed doosivahemiku määramise katsed, et leida suurim doos, mis põhjustaks tiinel emasloomal vaid minimaalseid mürgistusnähtusid. Kui standardse arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringu või prooviuuringuga on näidatud, et uuritav kemikaal põhjustab arenguhäireid, peaks kõrgeim doosimäär olema selline, mis ei oleks järglaste jaoks väga mürgine, näiteks ei põhjusta järglaste surma juba emaülas või kohe pärast sündi, samuti ei põhjusta selliseid väärtuseid, mis ei võimalda mõistlikult hinnata arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust. Väikseim doos tuleks valida nii, et see ei põhjustaks mingeid toksilisuse sümptomeid ei tiinel emasloomal ega järglastel, samuti mitte neurotoksilisuse sümptomeid. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et saaks näidata toime sõltuvust doosist ja leida täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldatav doosi (*No-Observed-Adverse Effect Level*, NOAEL) või jälgitava toime piiri lähedase doosi, mis lubaks määrata võrdlusdoosi. Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate doosimäärade kehtestamisel ja neljanda doosirühma lisamine on sageli eelistatav väga suurte doosidevaheliste vahemike (nt üle kümne korra) puhul.
  
17. Doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad andmed mürgisuse kohta ning ka lisateavet uuritava kemikaali või samalaadse aine metabolismi ja toksiko-kineetika kohta. Kõnealune teave aitab ehk ka näidata, et dooside manustamise režiim on valitud õigesti. Dooside otsest manustamist vastsündinud poegadele tuleks kaaluda kokkupuudet ja farmakokineetikat käsitleva teabe põhjal (28, 29). Enne dooside otsest manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (30).
  
18. Paralleelseks kontrollrühmaks peaks olema kahjutut ainet saav kontrollrühm või kandainet saav kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandainet. Kõigile loomadele tuleks kehamassist lähtudes manustada ühesugune kogus kas uuritavat kemikaali või kandainet. Kui dooside manustamise hõlbustamiseks kasutatakse kandainet või muud lisainet, tuleks pöörata tähelepanu järgmistele aspektidele: kandaine mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele kehas, metabolismile või peetumisele; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumisele. Kandainel ei tohiks olla mõju, mis võiks häirida uuringu tulemuste tõlgendamist; samuti ei tohiks kandaine neurotoksilisuse tõttu põhjustada käitumishäireid, mõjutada paljunemist või embrüo arengut. Uudse kandaine puhul tuleks lisaks kandaine kontrollrühmale kasutada veel võltskontrollrühma. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katses rühma loomi.

▼ **M5****Dooside manustamine**

19. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks manustada viisil, mis on kõige asjakohasem inimese kokkupuute puhul, võttes arvesse metabolismiga ja katselooma kehas jaotumisega seotud teavet. Manustamisviis on tavaliselt suukaudne (näiteks sundsöötmise sondiga või sööda või joogivee kaudu), kuid kasutada võib ka muid manustamisviise (nt naha kaudu, sissehingamise teel), sõltuvalt kemikaali omadustest ning eeldatavast või teadaolevast kokkupuuteteest inimese puhul (täiendavad juhised on esitatud juhenddokumendis 43 (8)). Valitud manustamisviisi tuleks põhjendada. Uuritavat kemikaali tuleks manustada igal päeval ligikaudu samal ajal.
20. Iga looma doos peaks tavaliselt põhinema looma kõige viimasel individuaalselt kindlaksmääratud kehamassil. Tiinuse viimasel kolmandikul tuleks doosi määramisega olla siiski ettevaatlik. Kui emasloomadel, kellele manustati kemikaali, avalduvad liigse mürgistuse sümptomid, tuleks need loomad humaanselt tappa.
21. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks paaritatud emasloomadele manustada vähemalt kord päevas alates loodete implantatsioonist (GD 6) kogu imetamise aja jooksul (kuni PND 21), nii et pojad puutuksid kemikaaliga kokku närvisüsteemi sünnieelse ja -järgse arengu jooksul. Nii dooside manustamise algust kui ka kestust ja sagedust võib muuta, kui tõendid osutavad, et katse teistsugune korraldus võiks inimese kokkupuudet arvestades olla asjakohasem. Muu liigi puhul tuleks dooside manustamise kestust kohandada, et tagada kokkupuude kemikaaliga aju arengu kõikidel varastel järkudel (s.o järkudel, mis vastavad inimaju sünnieelsele ja varasele sünnijärgsele kasvule). Dooside manustamine võib alata kohe tiinuse algusest (GD 0), kuigi tuleks silmas pidada võimalust, et kemikaal võib põhjustada embrüo hukkumise juba enne implantatsiooni. Manustamise alustamisega GD 6-st saaks seda riski vältida, kuid arengujärgud GD 0 — GD 6 jäävad siis kemikaaliga mõjutamata. Kui labor ostab teadaoleva tiinestumispäevaga tiineid loomi, on raske alustada dooside manustamist GD 0-st ja seega oleks hea päev alustamiseks GD 6. Katselabor peaks kehtestama dooside manustamise korra vastavalt uuritava kemikaali mõju käsitlevale asjakohasele teabele, varasematele kogemustele ja logistilistele kaalutlustele; see võib hõlmata dooside manustamist ka pärast võõrutamist. Doosi ei manustata poegimise päeval sellistele loomadele, kes ei ole veel kõiki järglasi sünnitanud. Üldiselt eeldatakse, et järglaste kokkupuude kemikaaliga toimub emapiima kaudu; kuid kui järglaste jätkuva kokkupuute kohta puuduvad tõendid, tuleks kaaluda kemikaali manustamist otse poegadele. Tõendeid järglaste katkematu kokkupuute kohta võib leida näiteks farmakokineetilistest teabest, teabest mürgisuse kohta järglastele või biomarkerite muutustest (28).

**VAATLUSED****Emasloomade jälgimine**

22. Kõiki emasloomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et hinnata nende tervises seisundit, sealhulgas haigestumust ja suremust.
23. Dooside manustamise ja vaatluste perioodil tuleks korrapäraselt teha üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi (vähemalt kahel korral poegimiseelisel manustamisperioodil ja kahel korral imetamisaegsel manustamisperioodil), kasutades vähemalt kümnet emaslooma iga doosimäära puhul. Loomi peaksid väljaspool kodupuuri vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada loomade stressi ja vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et ühe uuringu puhul teeks vaatlusi sama spetsialist.

▼ **M5**

24. Tähelestatud sümptomid tuleks registreerida. Võimaluse korral tuleks registreerida ka tähelestatud sümptomite intensiivsus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama vähemalt järgmist: naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine ja/või suu kaudu hingamine, kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid).
25. Kõik kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordineerimise muutused tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt kükorus selg) ning reageerimises kättevõtmisele, mahapanemisele või muudele keskkonna stiimulitele ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või värinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane karvkatte eest hoolitsemine, ebatavalised pealiigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või enda ülemäärane lakkumine, enesevigastamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.
26. Toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.
27. Dooside manustamise ajal tuleks loomi kogu uuringu kestel kaaluda vähemalt üks kord nädalas, sünnituse päeval või selle läheduses ja päeval PND 21 (võõrutamine). Emasloomade sundsöötmise uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kaks korda nädalas. Doose tuleks sobivaks kohandada vastavalt igale kehamassi määramise tulemusele. Sööda tarbimist tuleks tiinuse ja imetamise ajal mõõta vähemalt iga nädal. Kui kemikaali manustatakse joogivee kaudu, tuleks vee tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas.

**Järglaste jälgimine**

28. Kõiki järglasi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et teha kindlaks mürgistusnähud, haigestumus ja suremus.
29. Dooside manustamise ja vaatluste ajal tuleks teha järglaste üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi. Järglasi (vähemalt üks loom kummastki soost ja igast pesakonnast) peaksid vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et vaatlusi teeks sama spetsialist. Iga vaadeldava arengujärgu kohta tuleks jälgida vähemalt punktides 24 ja 25 kirjeldatud näitajaid.
30. Kõik järglaskonnas ilmnevad toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.

**Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad**

31. Võõrutuseelse arengu näitajate (kõrvalesta tipu eemaldumine peast, silmade avanemine, lõikehammade ilmumine) muutused korreleeruvad hästi kehamassiga (30, 31). Kehamass võib olla parim füüsilise arengu taseme näitaja. Arengu põhinäitajate mõõtmist soovitatakse seepärast ainult siis, kui on olemas varasemad tõendid selle kohta, et kõnealused näitajad annavad täiendavat teavet. Kõnealuste näitajate hindamise ajakava on esitatud tabelis 1. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

## ▼ M5

32. Füüsilise arengu hindamise korral on soovitatav kasutada paaritusjärgset, mitte sünnijärgset vanust (33). Kui poegadega tehakse katseid võõrutamise päeval, on soovitatav teha katsed enne võõrutushetke, et vältida võõrutamisega seotud stressi segavat mõju. Katseid ei tuleks teha ka kahel võõrutamisjärgsel päeval.

Tabel 1

**Füüsiliste ja arengut iseloomustavate näitajate ning funktsionaalsete või käitumuslike näitajate hindamise ajakava <sup>(a)</sup>**

Vanusejärgud Näitajad	Võõrutuseelne <sup>(b)</sup>	Noorukiiga <sup>(b)</sup>	Noored täiskasvanud <sup>(b)</sup>
--------------------------	------------------------------	---------------------------	------------------------------------

**Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad**

Kehamass ja kliinilised vaatlused	iga nädal <sup>(c)</sup>	vähemalt iga kahe nädala tagant	vähemalt iga kahe nädala tagant
Aju mass	PND 22 <sup>(d)</sup>		katse lõpetamisel
Neuropatoloogia	PND 22 <sup>(d)</sup>		katse lõpetamisel
Suguküpsuse saabumine	—	vajaduse korral	—
Muud arengunäitajad <sup>(e)</sup>	vajaduse korral	—	—

**Funktsionaalsed või käitumuslikud näitajad**

Käitumise ontogeneesis	vähemalt kaks mõõtmist		
Motoorne aktiivsus (sh harjumine)	1–3 korda <sup>(f)</sup>	—	üks kord
Motoorne ja sensoorne funktsioon	—	üks kord	üks kord
Õppimine ja mälu	—	üks kord	üks kord

<sup>(a)</sup> Selles tabelis on esitatud minimaalne mõõtmiskordade arv. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu (näiteks vanad loomad) või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

<sup>(b)</sup> Poegadega ei soovitata teha katseid kahel võõrutusjärgsel päeval (vt punkt 32). Soovitatav vanus noorloomadega katsete tegemiseks on järgmine: õppimine ja mälu — PND 25 ± 2; motoorne ja sensoorne funktsioon — PND 25 ± 2. Soovitatav vanus katsete tegemiseks noorte täiskasvanutega on PND 60–70.

<sup>(c)</sup> Poegadele dooside otse manustamise korral tuleks kehamassi mõõta vähemalt kaks korda nädalas, et kohandada doose vastavalt kehamassi kiirele suurenemisele.

<sup>(d)</sup> Aju massi ja neuropatoloogiat võib hinnata varasemal ajal (nt PND 11), kui see on sobiv (vt punkt 39).

<sup>(e)</sup> Muud arengu näitajaid lisaks kehamassile (nt silmade avanemine) tuleb registreerida sündmuse toimumise ajal (vt punkt 31).

<sup>(f)</sup> Vt punkt 35.

33. Elusad järglased tuleb üle lugeda ja määrata nende sugu, nt visuaalse vaatluse või anogenitaalse vahemaa määramisega (34, 35), ning iga poega pesakonnas tuleks kaaluda kohe pärast sündi või varsti selle järel, vähemalt kaks korda nädalas imetamise ajal ja vähemalt iga kahe nädala tagant pärast seda. Suguküpsuse saabumise määramiseks tuleks igas pesakonnas vähemalt ühel isasloomal ja ühel emasloomal määrata vanus ja kehamass, kui neil toimub tupe avanemine (36) või eesnaha eraldumine (37).

## ▼ M5

**Käitumise ontogenees**

34. Valitud käitumisviisinäitajate arengut tuleks mõõta sobivas vanuses vähemalt ühel pojal kummastki soost igas pesakonnas, kusjuures kõigil katsepäevadel kasutatakse kõikide käitumisviisinäitajate määramiseks samu loomi. Mõõtmispäevad jaotatakse ühtlaselt üle vaatluste aja, et määrata normaalsete käitumisjoonte areng või nende muutused, mis on seotud dooside manustamisega (38). Hinnata võiks näiteks järgmiste käitumisjoonte kujunemist: õige kehaasendi taastamise refleks, negatiivne geotaksis ja motoorne aktiivsus (38, 39, 40).

**Motoorne aktiivsus**

35. Motoorset aktiivsust tuleks jälgida (41, 42, 43, 44, 45) võõrutuseelses vanuses ja täiskasvanuvanus. Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Katsete periood peab olema piisavalt pikk, et näidata kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist. Käitumise ontogeneesi hindamiseks on väga soovitatav kasutada motoorse aktiivsuse hindamist. Kui seda kasutatakse käitumise ontogeneesi hindamiseks, tuleks kõikides võõrutuseelsetes katsetes kasutada samu loomi. Katseid tuleks teha piisava sagedusega, et demonstreerida katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist (44). Selleks võib kuluda kolm sessiooni enne võõrutamist ja võõrutamise päeval (nt päevad PND 13, 17, 21). Samu ühe pesakonna loomi tuleks vaadelda ka täiskasvanueas enne katse lõpetamist (nt päevad PND 60–70). Katseid võib vajaduse korral teha ka lisapäevadel. Motoorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automatiseeritud aparadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt baastegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada võimalikkuse piires eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Iga loomaga tuleks katseid teha eraldi. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei esineks süstemaatilist viga. Paljude käitumisnäitajate mõõtmist mõjutavad sellised muutujad nagu müratase, katsepuuri kuju ja suurus, temperatuur, suhteline õhuniiskus, valgustustingimused, lõhnad, kodupuuri või uue katsepuuri kasutamine ja tähelepanu häirivad keskkonningimused.

**Motoorne ja sensoorne funktsioon**

36. Motoorset ja sensoorset funktsiooni tuleks üksikasjalikult uurida vähemalt üks kord noorukieas ja üks kord noore täiskasvanu eas (nt PND 60–70). Katsete tegemise kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Tuleb teha piisavalt katseid, et koguda vajalikud kvantitatiivsed andmed sensoorsete funktsioonide kohta (nt somatosensoorsed ja vestibulaarfunktsioonid) ja motoorsete funktsioonide kohta (nt jõud, koordineerimine). Mõned motoorsete ja sensoorsete funktsioonide näited on tõukerefleks (tallarefleks) (46), õige kehaasendi taastamise refleks (47, 48), ehmatava helisignaali harjumine (40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) ja esilekutsutud võimed (55).

▼ **M5****Õppimise ja mälu katsed**

37. Assotsiatiivse õppimise ja mälu katse tuleks teha pärast võõrutamist (nt päeval  $25 \pm 2$ ) ja noorte täiskasvanutega (PND 60 ja vanemad). Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Nende kahe arengutaseme puhul võib kasutada sama või eraldi katset. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud rottide õppimise ja mälu katse(te) valimisel lubatakse teatavat paindlikkust. Katse(d) tuleks siiski kavandada selliselt, et oleksid täidetud kaks kriteeriumi. Esiteks, õppimist tuleks hinnata mitme korduva õppimiskatse või -sessiooni jooksul ilmnevate muutuste kaudu või ühtainukest ülesannet hõlmava katsega ja võrrelda seda kontrollkatsega, milles kontrollitakse õpetamiskatse võimalikke mitteassotsiatiivseid mõjusid. Teiseks peaksid katsed hõlmama mingil määral (lühiajalise või pikaajalise) mälu kasutamist, lisaks algele äraõppimisele (omandamine), kuid seda mälu näitajat ei saa registreerida, kui sama katsega ei ole mõõdetud omandamise näitajat. Kui õppimise ja mälu katsetest ilmneb kemikaali mõju, tuleb kaaluda lisakatsete korraldamist, et jätta kõrvale alternatiivsed tõlgendused, mille aluseks on sensoorsed või motivatsioonilised muutused ja/või motoorse suutlikkuse muutumine. Lisaks eespool nimetatud kahele kriteeriumile on soovitatav, et õppimise ja mälu katse tuleks valida nii, et katse oleks tõendatult tundlik uuritava kemikaali suhtes, kui kirjandusest on kättesaadav kõnealune teave. Kui sellist teavet ei ole, võiksid selliste katsete näideteks, mida võib teha eespool kirjeldatud kriteeriumide täitmiseks, olla passiivne vältimine (43, 56, 57), viivitusega reageerimine asendile täiskasvanud roti (58) või rotipoja (59) puhul, haistmise kaudu mõjutamine (43, 60), Morrise veelabürindi katse (61, 62, 63), Bieli või Cincinnati labürindi katse (64, 65), radiaallabürindi katse (66), T-labürindi katse (43) ning ajakavast sõltuva käitumise omandamine ja säilitamine (26, 67, 68). Kirjanduses on kirjeldatud veel muid katseid võõrutatud rotipoegade (26, 27) ja täiskasvanud rottide jaoks (19, 20).

**Surmamisjärgne uurimine**

38. Emaloomad võib pärast järglaste võõrutamist surmata.
39. Järglaste neuropatoloogiliseks uurimiseks kasutatakse kudesid, mis on saadud loomadelt, kes on humaanselt surmatud päeval PND 22 või varem (PND 11 — PND 22) või katse lõpetamisel. Päeval PND 22 surmatud järglaste puhul tuleks hinnata ajukudesid; katse lõpetamisel surmatud loomade puhul tuleks hinnata nii kesknärvisüsteemi kudesid kui ka perifeerse närvisüsteemi kudesid. Päeval PND 22 või varem surmatud loomad võib fikseerida immersiooni või perfusiooniga. Katse lõpetamisel surmatud loomad tuleks fikseerida perfusiooniga. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — loomade perfusioon, kudede väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikrokoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Täiendavad suunised neuropatoloogia kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 20 (9), vt ka (103).

**Koeproovide töötlemine**

40. Kõik lahkamise ajal märgatavad suured kõrvalekalded tuleks üles märkida. Võetud koeproovid peaksid esindama kõiki peamisi närvisüsteemi piirkondi. Koeproove tuleks säilitada sobivas fiksaatoris ja neid tuleks töödelda vastavalt avaldatud standardsetele histoloogijuhenditele (69, 70, 71, 103). Parafiinis konserveerimine on sobiv kesk- ja perifeerse närvisüsteemi



## ▼ M5

kudede puhul, kuid osmiumi kasutamine järelfikseerimiseks koos epoksü-konserveerimisega võib olla sobiv, kui on vaja saavutada parem lahutusvõime (nt perifeerset närvid naha, kui kahtlustatakse perifeerset neuropaatiat ja/või perifeerset närvi morfomeetriliseks analüüsiks). Morfomeetriliseks analüüsiks kogutav ajukude tuleks kõikide doosirühmade puhul paigutada sobivasse säilituskeskkonda samal ajal, et vältida kokkutõmbumisest tingitud artefakte, mis võivad kaasned pikaajalise säilitamisega fiksaatoris (6).

**Neuropatoloogiline uuring**

41. Kvalitatiivse uuringu eesmärgid on järgmised:

- i) teha kindlaks närvüsteemi piirkonnad, milles esineb nähtavaid neuropatoloogilisi muutusi;
- ii) teha kindlaks, millist tüüpi neuropatoloogilised muutused tulenevad kokkupuutest uuritava kemikaaliga, ning
- iii) määrata neuropatoloogiliste muutuste ulatus raskusastme järgi.

Koeproovidest saadud representatiivseid histoloogilisi lõikeid peaks mikroskoobiga uurima nõuetekohaselt koolitatud patoloog, et leida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta. Igale neuropatoloogilisele muutusele tuleks subjektiivse hindamiskaala alusel omistada raskusaste. Värvimine hematoksüliini ja eosiiniga võib olla piisav, et hinnata päeval PND 22 või varem humaanselt surmatud loomade aju lõikeid. Katse lõpetamisel surmatud loomade kesknärvüsteemi ja perifeerse närvüsteemi lõigete uurimiseks soovistatakse kasutada aga müeliinivärve (nt *Luxol fast blue*/kresüülviolet) ja hõbedapõhiseid värve (nt Bielschowsky või Bodiani värv). Vastavalt patoloogi eksperthinnangule ja võttes arvesse täheldatud muutusi, võib kasutada muid sobivaid värve, et teha kindlaks ja iseloomustada teatavat tüüpi muutusi (nt gliiafibrillide happelise proteiini (GFAP) või lektiini histokeemia, et hinnata gliia ja mikroglia muutusi (72), fluorojodeit-värv nekroosi tuvastamiseks (73, 74) või närvi degeneratsiooni suhtes spetsiifiline hõbedapõhine värv (75)).

42. Tuleks teha morfomeetiline (kvantitatiivne) hindamine, kuna need andmed võivad aidata tuvastada kokkupuutega seotud mõju ja on väärtuslikud kemikaaliga kokkupuutest tingitud ajumassi või aju morfoloogia erinevuste tõlgendamisel (76, 77). Närvikoest tuleks võtta proovid ja valmistada need ette morfomeetriliseks hindamiseks. Morfomeetiline hindamine võib hõlmata näiteks aju teatavate piirkondade joonmõõtmete või pindala määramist (78). Joonmõõtmete või pindala määramiseks on vaja kasutada homoloogseid lõikeid, mis on hoolikalt valitud usaldusväärsete mikroskoopiliste punktide järgi (6). Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat (79, 80, 81, 82, 83, 84).

43. Ajus tuleks otsida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta, mis on seotud dooside manustamisega, ja piisavad näidised tuleks võtta kõikidest peamistest aju piirkondadest (nt haistmissibulad, ajukoor, hipokamp, basaalganglionid, talamus, hüpotalamus, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajubarred), ajusild, piklikaju, väikeaju), et läbivaatamine oleks põhjalik. On oluline, et kõigilt loomadelt võetaks lõiked samas tasapinnas. Katse lõpetamisel humaanselt surmatud täiskasvanud loomadelt tuleks võtta seljaaju ja perifeerse närvüsteemi representatiivsed lõiked. Uuritavad alad peaksid hõlmama silma koos nägemisnärvi ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmepõhise kohal, selgmisi ja kõhtmisi närvijuuri, proksimaalset istmikunärvi, proksimaalset säärenärvi (põlve juures) ja säärenärvi sääremarjalihase harusid. Seljaajust ja perifeersest närvist tuleks teha nii ristkui ka pikilõiked.

▼ **M5**

44. Neuropatoloogilisel hindamisel tuleks otsida närvisüsteemi arenguhäirete tunnuseid (6, 85, 86, 87, 88, 89), lisaks rakuliste muutustele (nt närvirakkude vakuolisatsioon, degeneratsioon, nekroos) ja koemuutustele (nt gliosis, leukotsüütide infiltratsioon, tsüstide moodustumine). Sellega seoses on oluline, et dooside manustamisega seotud muutusi tuleb eristada tavalistest arenguga seotud muutustest, mis peaksid toimuma looma surmamise ajaks (90). Arengu häirumisele viitavad muu hulgas näiteks järgmised leiud:

- haistmissibulate, aju või väikeaju üldsuuruse või kuju muutused;
- aju eri piirkondade suhtelise suuruse muutused, sealhulgas sellised aju piirkondade suuruse muutused, mis on tingitud tavaliselt ajutiste raku populatsioonide või aksonite väljakasvude kaotsiminekest või püsijäämisest (nt väikeaju väline germinaalkiht, möhnkeha);
- muutused rakkude paljunemises, migreerumises ja diferentseerimises, millele osutab ülemäärane apoptoos või nekroos, väärasetsusega, valesuunaliste või vääralt moodustunud närvirakkude kogumid või hajutatud populatsioonid või muutused ajukoorestruktuuride kihtide suhtelises suuruses;
- muutused müeliniseerumises, sealhulgas müeliiniga kaetud struktuuride muutunud üldsuurus või värvumine;
- vesipea tunnused, eelkõige vatsakeste suurenemine, ajuveejuha ahennemine ja ajupoolkerade õhenemine.

**Neuropatoloogiliste muutuste doosi ja toime vahelise sõltuvuse analüüsimine**

45. Kvalitatiivse ja kvantitatiivse neuropatoloogilise analüüsi puhul soovitatakse toimida järgmiselt. Esiteks võrreldakse suure doosi rühma loomade löikeid kontrollrühma loomade löigetega. Kui suure doosi rühma loomadel neuropatoloogilisi muutusi ei leita, ei ole täiendav analüüs vajalik. Kui suure doosi rühmade loomadel leitakse neuropatoloogilisi muutusi, uuritakse keskmise ja madala doosi rühmade loomi. Kui katse suure doosi rühmaga lõpetatakse loomade surma või muu segava mürgistuse tõttu, tuleks suure ja keskmise doosi rühma loomadel uurida neuropatoloogilisi muutusi. Kui väiksema doosi rühma loomadel esineb tunnuseid, mis viitavad kemikaali neurotoksilisusele, tuleks neuropatoloogiline analüüs teha osutatud rühmade loomadega. Kui kvalitatiivse või kvantitatiivse vaatlusega leitakse dooside manustamisega seotud neuropatoloogilisi muutusi, tuleks määrata kõikide kahjustuste või morfoomeetriliste muutuste esinemise, sageduse ja raskusastme sõltuvus doosist, kasutades kõikide doosirühmade loomade vaatluse andmeid. Hindamine peaks hõlmama kõiki ajupiirkondi, milles on leitud neuropatoloogilisi muutusi. Iga kahjustuste tüübi puhul tuleks kirjeldada näitajaid, mille alusel määrati raskusaste, sealhulgas omadused, mida kasutati raskusastmete eristamiseks. Iga tüüpi kahjustuste ja nende raskusastmete esinemissagedus tuleks registreerida ja teha statistiline analüüs, et hinnata doosi ja toime vahelise sõltuvuse laadi. Soovitatakse kasutada koodmärgisega varustatud mikroskoobipreparaate (91).

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**

**Andmed**

46. Andmed tuleks esitada iga looma kohta ja samuti kokkuvõtliku tabelina, milles iga katserühma kohta näidatakse muutuste tüübid ning iga tüübi puhul emasloomade, järglaste (eraldi kummastki soost) ja pesakondade arv, kellele see esines. Kui järglased viiakse pärast sündi otse kokkupuutesse kemikaaliga, tuleb teatada kokkupuuteviisi, kestus ja kokkupuute ajavahemik.

▼ **M5****Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

47. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring annab teavet selle kohta, millist mõju avaldab korduv sünnieelne ja varane sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga. Kuna rõhk on pandud nii üldise mürgisuse kui ka arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse näitajate määramisele, võimaldavad katsetulemused teha vahet järglaste arengu häireid põhjustaval neurotoksilisusel, kui üldist mürgistust emaloomal veel ei täheldata, ja sellisel arenguhäireid põhjustaval neurotoksilisusel, mis avaldub ainult kontsentratsioonil, mis on mürgine ka emaloomale. Kuna seosed katse kavandamise, andmete statistilise analüüsi ja bioloogilise olulisuse vahel on keerulised, kasutatakse arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu andmete õigeaks tõlgendamiseks eksperdi hinnanguid (107, 109). Katsetulemuste tõlgendamisel kasutatakse tõendite kaalukusel põhinevat lähenemisviisi (20, 92, 93, 94). Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Sellise iseloomustuse koostamisel tuleks kasutada kõiki andmeid arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohta, sealhulgas inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid ja katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilised andmed, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, muude toksikoloogiauringute andmed). See hõlmab seost uuritava kemikaali doosi ja neurotoksilise mõju olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel kummagi soo puhul (20, 95).
48. Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Statistilist analüüsi tuleks vaadelda kui vahendit, mis suunab andmete tõlgendamist, kuid ei määra seda. Statistilise olulisuse puudumine ei tohiks olla ainus põhjendus järeldamiseks, et kokkupuude kemikaaliga ei avalda mõju, ja statistiline olulisus ei saa olla ainus põhjendus, millest järeldatakse, et kemikaal avaldab mõju. Et hoiduda võimaliku valenegatiivse järelduse tegemisest ja kuna „mõju puudumise” tõendamine on juba põhimõtteliselt raske, tuleks arutada kõiki olemasolevaid andmeid mõju olemasolu kohta ja varasema kontrolli andmeid, eriti kui katse näitas, et dooside manustamine mõju ei avalda (102, 106). Valepositiivse järelduse tõenäosust tuleks arutada kõikide andmete statistilise hindamise põhjal (96). Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi.
49. Kõigi andmete analüüsimisel tuleb kasutada statistilisi mudeleid, milles arvestatakse katse korraldust (108). Parameetrilise või mitteparameetrilise analüüsi valimine peaks olema põhjendatud, võttes arvesse selliseid tegureid nagu andmete laad (otsesed või teisendatud andmed) ja nende jaotust, samuti valitud statistilise analüüsi meetodi suhtelist stabiilsust. Lähtudes uuringu eesmärgist ja katse kavast, tuleks statistilise analüüsi meetod valida nii, et viia miinimumini I tüüpi (valepositiivse) vea ja II tüüpi (valenegatiivse) vea võimalikkus (96, 97, 104, 105). Kui arengu-uuringus kasutatakse loomaliiki, kelle pesakonnas on mitu poega, kellega tehakse katseid, tuleks statistilises mudelis vaadelda pesakonda, et vältida I tüüpi vea võimaluse olulist suurenemist (98, 99, 100, 101). Statistiline mõõtmisühik peaks sel juhul olema pesakond ja mitte poeg. Katsed peaksid olema kavandatud nii, et ühe pesakonna liikmeid ei käsitataks sõltumatute vaatlusaluste loomadena. Kui ühe ja sama vaatlusobjekti põhjal määratakse mitut näitajat, tuleks nende näitajate analüüsiks kasutada statistilisi mudeleid, milles võetakse arvesse, et mõõtmised ei ole sõltumatud.

**Katseprotokoll**

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

— füüsiline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed, sh päritolu;

▼ **M5**

- preparaadi puhtus ja teadaolevad või eeldatavad lisandid.

*Kandeaine (vajaduse korral):*

- kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaineks ei ole vesi või füsioloogiline soolalahus.

*Katseloomad:*

- kasutatud loomaliik ja liin, ning põhjendus, kui see on muu kui rott;
- katseloomade tarnija;
- loomade arv, vanus katse alguses ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt, vesi jne;
- iga looma mass katse alguses.

*Katsetingimused:*

- doositaseme valimise põhjendus;
- dooside manustamise tee ja ajavahemiku põhjendus;
- manustatavate dooside üksikasjad, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;
- üksikasjad uuritava kemikaali koostise/söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
- meetod, mida kasutati emaloomade ja järglaste kordumatuks märgistamiseks;
- üksikasjalik randomiseerimismeetodi(te) kirjeldus: kuidas juhuslikkuse alusel jaotati emaloomad doosirühmadesse, valiti välja järglased surmamiseks ja määrati järglased katserühmadesse;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral söödas/joogivees või sissehingatavas õhus oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);
- keskkonnatingimused;
- üksikasjad sööda ja vee kvaliteedi kohta (nt kraanivesi, destilleeritud vesi);
- uuringu alustamise ja lõpetamise kuupäevad.

*Vaatlused ja katsemeetodid:*

- üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi leiud jm protseduurid, samuti märgatud leidudele hindepunktide andmise tööjuhendid;
- kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;
- kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;
- seadmete kalibreerimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;
- lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdi hinnanguid.

▼ **M5**

*Tulemused (individuaalsed tulemused ja nende kokkuvõte, sealhulgas võimaluse korral keskväärtus ja dispersioon):*

- loomade arv uuringu alguses ja uuringu lõpus;
- iga katsemeetodi puhul kasutatud loomade ja pesakondade arv;
- iga looma identifitseerimisnumber ja pesakond, millest loom on pärit;
- pesakonna suurus ja sünnijärgne keskmine mass sugude kaupa;
- kehamassi ja selle muutuse andmed, sealhulgas emaloomade ja järglaste lõplik kehamass;
- sööda tarbimise ja vajaduse korral vee tarbimise andmed (nt kui uuritavat ainet manustatakse vee kaudu);
- toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed sugude ja doosimäärade kaupa, sh surma aeg ja põhjus, kui see on asjakohane;
- toksilisuse laad, raskusaste, kestus, avaldumise päev, kellaaeg, ja edasiste üksikasjalike kliiniliste vaatluste käik;
- arengu iga olulise näitaja (kehamass, suguküpsuse saabumine ja käitumise ontogenees) hindepunktide arv igal vaatlusel;
- kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste, elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;
- lahkamise tulemused;
- aju mass;
- neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;
- tüüpiliste muutuste fotod;
- madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;
- andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta, sh täiendavad andmed eraldi toksiko-kineetilise uuringust, kui need on olemas;
- tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;
- uuringust osavõtute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

*Tulemuste arutelu:*

- teave doosi ja selle mõju kohta, sugude ja rühmade kaupa;
- muude toksiliste mõjude (sugude ja rühmade kaupa) seos uuritud keemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;
- mõju võrdlus muude tuntud neurotoksiliste ainete mõjuga ja mõju sarnasus;

▼ **M5**

- andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);
- seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;
- NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa.

*Järeldused:*

- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatav kahjuliku toimeteta doos.

**KIRJANDUS**

- 1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.
- 2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98–239. Vt: [[http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS\\_Harmonized/870\\_Health\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Series/](http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/)].
- 3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Vt: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- 4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79–91.
- 5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101–111.
- 6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93–100.
- 7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.
- 8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Vt: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(200816&doclanguage\)=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage)=en)].
- 9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Vt: [[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html)].
- 10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173–292.
- 11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

## ▼ M5

- 12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188–197.
- 13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1<sup>st</sup> Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- 14) Käesoleva lisa peatükk B.34. Ühe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 15) Käesoleva lisa peatükk B.35. Kahe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksilisuse uuring närilistel.
- 17) Käesoleva lisa peatükk B.31. Sünnieelse arengu mürgisuse uurimus.
- 18) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Vt: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- 20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Vt: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- 21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1<sup>st</sup> Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- 22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499–509.
- 23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 38:2–6.
- 24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110–112.
- 25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 13:118–136.
- 26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- 27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- 28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- 29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87–94.
- 30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *Sci.*, 49: 1–4.
- 31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- 32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433–439.

## ▼ M5

- 33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449–457.
- 34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383–390.
- 35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350–365.
- 36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579–586.
- 37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298–303.
- 38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489–95.
- 39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896–920.
- 40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. Vt: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67–100.
- 41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53–66.
- 42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37–82.
- 43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117–129.
- 44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247–260.
- 45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599–609.
- 46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405–411.
- 47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661–669.
- 48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589–591.
- 49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. Vt: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287–351
- 50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107–128.
- 51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181–211.



▼ M5

- 52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199–211.
- 53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25–30.
- 54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437–445.
- 55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. *Vt: Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125–145.
- 56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321–332.
- 57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247–296.
- 58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237–244.
- 59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98–105.
- 60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465–479.
- 61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47–60.
- 62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29–69.
- 63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60–90.
- 64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235–241.
- 65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387–399.
- 66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327–332.
- 67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342–352.
- 68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338–341.
- 69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122–131.
- 70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84–107.
- 71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone, London.

## ▼ M5

- 72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291–304.
- 73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123–130.
- 74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365–372.
- 75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545–561.
- 76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745–755.
- 77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417–432.
- 78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129–135.
- 79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- 80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305–310.
- 81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262–268.
- 82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707–710.
- 83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51–61.
- 84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813–831.
- 85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113–121.
- 86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294–298.
- 87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. Vt: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3–41.
- 88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70–74.

## ▼ M5

- 89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
- 90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- 91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127–133.
- 92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401–405.
- 93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- 94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- 95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- 96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113–126.
- 97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21–27.
- 98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329–335.
- 99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165–172.
- 100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221–228.
- 101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587–90.
- 102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345–352.
- 103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A ‘best practices’ approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296–313.
- 104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205–210.
- 105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295–301.
- 106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.
- 107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288–325.

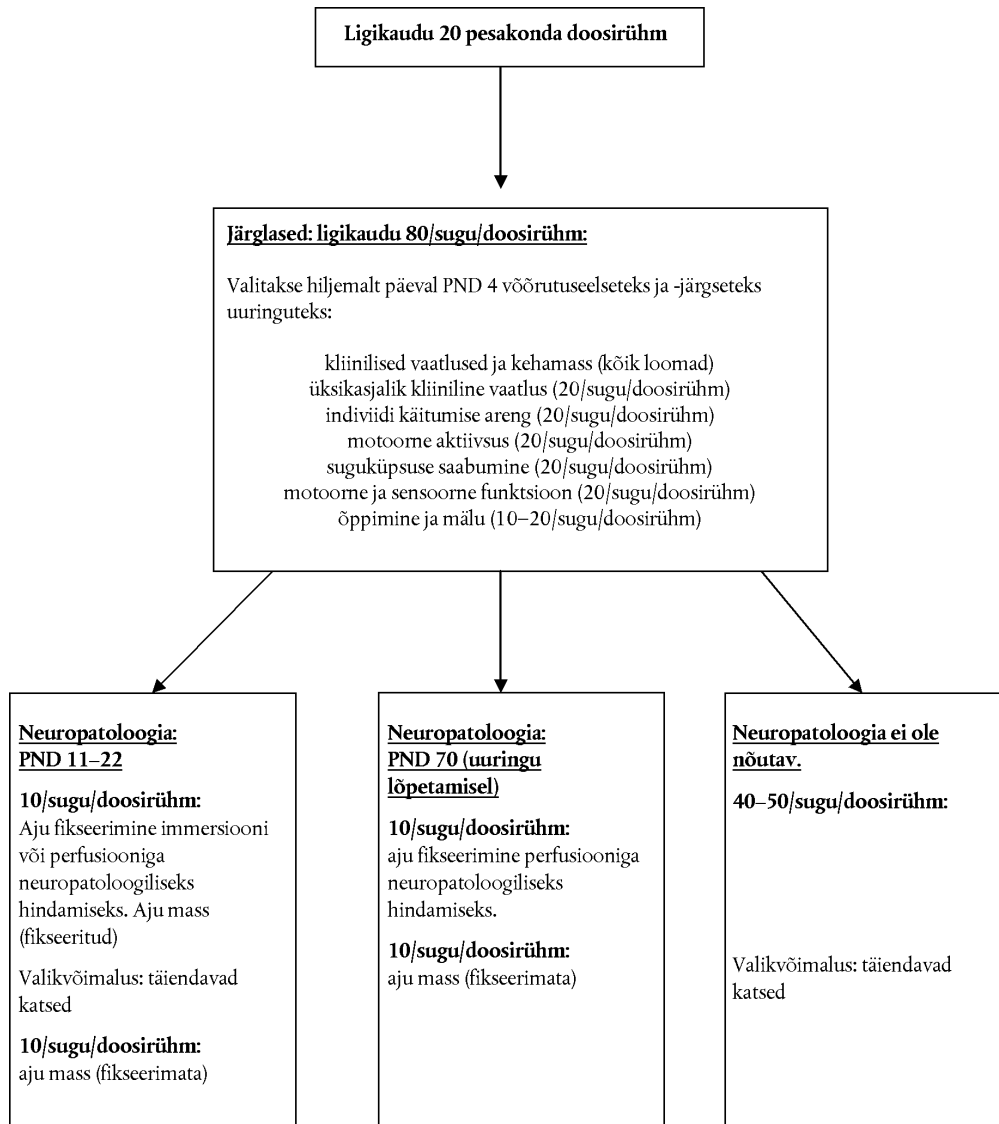
**▼ M5**

- 108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.
- 109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

## ▼ M5

## Joonis 1

Üldine katseskeem funktsionaalsete ja käitumuslike katsete tegemiseks, neuropatoloogia hindamiseks ja ajumassi määramiseks. Diagramm põhineb punktides 13–15 esitatud kirjeldusel (PND — päev pärast sündi). Katsete jaoks loomade määramise näited on esitatud 1. liites



## ▼ M5

## 1. liide

- Allpool esitatud tabelis on kirjeldatud näiteid, kuidas võib määrata loomi katsete tegemiseks. Näidete eesmärk on selgitada, et katseloomi võib katseteks määrata mitmel viisil, olenevalt katse korralduse põhimõttest.

## 1. näide

- Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, mille koosseis on 20 looma kummagi soo ja iga doosimäära kohta (edaspidi „looma/sugu/doosimäär“) (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 22. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma fikseerimata aju.
- Võõrutusjärgsete funktsionaalsete ja käitumuslike katsete (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, helisignaaliga harjumise ja kognitiivse funktsiooni katsed noorukieas) ning suguküpsuse saabumise vanuse hindamiseks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
- Kognitiivsete funktsioonide testimiseks noorte täiskasvanute puhul (st PND 60–70) kasutatakse ära kolmas komplekt, mille koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
- Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär hoitakse varuks võimalike lisakatsete jaoks.

Tabel 1

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 25)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

## ▼ M5

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass ~ PND 70
4	8	—	Reservloomad asendamiseks või lisakatseteks

<sup>(a)</sup> Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emaslomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

## 2. näide

6. Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmataks 10 looma/sugu/doosimäär (1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanseelt päeval PND 11. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks.
7. Teine komplekt loomi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) kasutatakse võõrutusjärgseteks vaatlusteks (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, suguküpse sabumise vanuse ning motoorse ja sensoorse funktsiooni hindamine). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
8. Noorukite ja noorte täiskasvanute kognitiivsete funktsioonide katsetamiseks kasutatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Kognitiivsete funktsioonide katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu vanuses kasutatakse erinevaid loomi. Uuringu lõpetamisel surmataks 10 looma/sugu/doosimäär, kellega olid tehtud täiskasvanuea katseid, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
9. Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär, keda ei valitud välja katseteks, surmataks ja kõrvaldatakse võõrutamisel.

Tabel 2

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpse sabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

## ▼ M5

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	10 M + 10 N <sup>(b)</sup>	Õppimine ja mälu (PND 23)
3	7	10 M + 10 N <sup>(b)</sup>	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass
4	8	–	Päeval PND 21 surmatud ja kõrvaldatud loomad.

<sup>(a)</sup> Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

<sup>(b)</sup> Kognitiivseteks katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu eas kasutatakse erinevaid järglasi (nt paarisarvulised ja paarituurvalised pesakonnad kokku 20 pesakonnast).

## 3. näide

10. Päeval PND 11 kasutatakse aju massi ja neuropatoloogia hindamiseks üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11, nende aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogiliseks hindamiseks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emasloomi iga doosimäära kohta.
11. Käitumise ontogeneesi (motoorne aktiivsus) vaatlusteks ja võõrutusjärgseteks vaatlusteks (motoorne aktiivsus ja suguküpsuse saabumise vanuse hindamine) ning noorukite kognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast).
12. Motoorse ja sensoorse funktsiooni katseteks (helisignaali harjumine) ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
13. Noore täiskasvanukognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

Tabel 3

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 11 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees (motoorne aktiivsus)
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 27)



▼ **M5**

Poeg nr <sup>(a)</sup>		Katseks määratud poegade arv	Vaatus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Helisignaali (noorukid ja noored täiskasvanud)
		20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
4	8	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass

<sup>(a)</sup> Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

▼ **M5**

*2. liide*

**Mõisted**

Kemikaal – aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M5****B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 440 (2007). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja näriliste uterotroofse biokatse juhend. Näriliste uterotroofne biokatse läbis seejärel ulatusliku valideerimisprogrammi; sealhulgas koostati üksikasjalik taustadokument (2, 3) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust tugeva võrdlusöstrogeeni, nõrkade östrogeenireseptori agonistide, tugeva östrogeenireseptori antagonisti ja mõju mitteomava võrdluskemikaali puhul (4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesoleva katsemetodi B.54 aluseks on kogemused, mis saadi valideerimiskatsete programmiga, ja programmi käigus östrogeeniagonistidega saadud tulemused.
2. Uterotroofne biokatse on kiire sõelkatse, mis töötati välja 1930. aastatel (27, 28) ja mida esmakordselt standarditi sõelkatsena kasutamiseks 1962. aastal (32, 35). See põhineb emaka massi suurenemisel või nn uterotroofselt reaktsioonil (vt ülevaade 29). Sellega hinnatakse kemikaali võimet kutsuda esile bioloogilist mõju, mis sarnaneb looduslike östrogeenide (nt 17 $\beta$ -östradioli) agonistide või antagonistide mõjuga, kuid meetodit kasutatakse hoopis sagedamini agonistide kui antagonistide leidmiseks. Emakas reageerib östrogeenidele kahel viisil. Esmane reaktsioon on massi suurenemine, mida põhjustab vee imamine. Sellele järgneb massi suurenemine kudede kasvu tulemusel (30). Hiire- ja rotiemaka reageerimine on kvalitatiivselt võrreldav.
3. Biokatset saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (2. liide). Selles kontseptuaalses raamistikus on uterotroofne biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt östrogeensuse kohta.
4. Uterotroofne biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale. OECD valideerimisprogrammis kasutati nii tugevaid kui ka nõrku östrogeeni antagoniste, et hinnata katse kasutamist östrogeensete kemikaalide väljaselgitamiseks (4, 5, 6, 7, 8). Sellega tõendati meetodi tundlikkust östrogeeniagonistide suhtes ja lisaks ka head laborisisesest ja laboritevahelist korratavust.
5. Mis puutub mõjuta (n-ö negatiivsetesse) kemikaalidesse, siis valideerimisprogrammis kasutati vaid üht mõjuta võrdluskemikaali, mille kohta oli juba varem uterotroofselt analüüsi ja ka *in vitro* retseptorisidumise ja retseptori katsetega tehtud kindlaks mõju puudumine, kuid on hinnatud veel OECD valideerimisprogrammist sõltumatuid täiendavaid andmeid, mis samuti toetavad uterotroofselt biokatse selektiivsust östrogeeniagonistide kindlakstegemisel (16).

## ▼ M5

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Östrogeeni agonistid ja antagonistid toimivad östrogeenireseptorite  $\alpha$  ja  $\beta$  ligandidena ning võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. See võib põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke östrogeeni agoniste või antagonistide. Kuigi ligandi afiinsus östrogeenireseptori suhtes või reportergeeni transkriptsiooni aktiveerimine *in vitro* annab küll olulist teavet, on see siiski vaid üks ohtu põhjustavatest võimalikest teguritest. Muud tegurid võivad hõlmata metabolismi kaudu aktiveerimist või inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, jaotumist sihtkudedes ja väljutamist kehast, mis vähemalt osaliselt sõltub ka manustamistest ja uuritavast kemikaalidest. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku toimet *in vivo* asjakohastes tingimustes, kui kemikaali neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega seotud omadused juba ise ei paku vajalikku teavet. Emaka koed reageerivad östrogeenidega stimuleerimisele kiire kasvuga, eriti laboris peetavate näriliste puhul, kus östraalsükkel kestab umbes 4 päeva. Närilisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast on närilise emakas sobiv sihtorgan, millega saab teha *in vivo* sõeluuringuid östrogeeni agonistide ja antagonistide väljaselgitamiseks.
7. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisestest kui ka laboritevahelistes uuringutes (5, 7). Praegu on kättesaadavad kaks meetodit, nimelt eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emaslooma meetod (*OVX-adult method*) ja eemaldamata munasarjadega ebaküpse emase meetod (*immature method*). OECD valideerimiskatsete programmiga näidati, et nende meetodite tundlikkus ja reprodutseeritavus on võrreldavad. Meetod, milles kasutatakse ebaküpset emaslooma, kelle hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg on kahjustamata, on siiski mõnevõrra vähem spetsiifiline, kuid selle meetodiga saab uurida laiemat mõjude spektrit kui eemaldatud munasarjadega emaslooma meetodiga, kuna see näitab ka kemikaalide mõju HAS-teljele, mitte üksnes östrogeenireseptorile. Roti HAS-telg hakkab toimima umbes 15. elupäevast. Enne nimetatud tähtaega ei saa gonadoliberiiniga (GnRH) puberteeti kiirendada. Kui emasloomad hakkavad jõudma puberteediikka, siis enne tupe avanemist on neil mitu n-õ vaikset tsüklit, millega ei kaasne tupe avanemist või ovulatsiooni, kuid kaasnevad teatavad hormoonitaseme kõikumised. Kui kemikaal otse või kaudselt stimuleerib HAS-telge, on tulemuseks enneaegne puberteet, varane ovulatsioon ja tupe varasem avanemine. Seda võivad põhjustada mitte ainult HAS-teljele toimivad kemikaalid, vaid ka mõned tavalisest suurema metaboliseeritava energia sisaldusega dieetid, mis stimuleerivad kasvu ja kiirendavad tupe avanemist, kuigi ei ole östrogeensed. Sellised kemikaalid ei tekita uterootroofset reaktsiooni täiskasvanud OVX-loomal, kuna tema HAS-telg ei tööta.
8. Loomade heaolu huvides tuleks eelistada ebaküpsete rottide meetodit, millega välditakse loomade kirurgilist eeltöötlemist ja ka selliste loomade võimalikku kasutamata jätmist, kellel esineb östruse alguse märke (vt punkt 30).

## ▼ M5

9. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult tingitud östrogeenidest, st seda võivad esile kutsuda ka kemikaalid, mis ei ole östrogeenide agonistid või antagonistid. Näiteks suhteliselt suured progesterooni, testosterooni või mitmesuguste sünteetiliste kollaskehahormoonide doosid võivad kõik põhjustada seda reaktsiooni (30). Igasugust reaktsiooni tuleb uurida histoloogiliselt tupe keratinisatsiooni ja sarvestumise suhtes (30). Olenemata reaktsiooni võimalikust põhjusest tuleks uterotroofse biokatse positiivse tulemuse puhul algselt täiendada uuring selguse saamiseks. Täiendavaid tõendeid östrogeensuse kohta võib saada *in vitro* katsetega, nagu östrogeenireseptori sidumise katse ja transkriptsiooni aktivatsiooni katse või muud *in vivo* uuringud, näiteks emasloomade puberteedi katse.
10. Kui võtta arvesse, et uterotroofne biokatse on ette nähtud *in vivo* sõeluuringuks, on kontrollimisviisi valikul lähtunud nii loomade heaoluga seotud kaalutlustest kui ka korrasstatud astmelise katsetamise strateegiast. Sel eesmärgil püüti hoolikalt kontrollida, kuivõrd korratavalt ja tundlikult lubab meetod kindlaks teha östrogeensust, mis on paljude kemikaalide puhul peamine mure; vähem pöörati tähelepanu katsega antiöstrogeensuse tõendamise küljele. Katsetati ainult ühte tugevat antiöstrogeeni, kuna selgelt teadaolevate antiöstrogeensete kemikaalide (millel ei ole mingit varjavat östrogeenset mõju) on väga piiratud. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse seega östrogeensete omaduste tuvastamist; antagonistliku toime tuvastamist on käsitletud ühes juhenddokumendis (37). Biokatse korratavus ja tundlikkus puhtalt antiöstrogeense toimega kemikaalide puhul määratletakse täpsemalt hiljem, kui katset on tavameetodina mõnda aega kasutatud ja leitud rohkem sellise toimeviisiga kemikaale.
11. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomakaitse kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (25).
12. Nagu elusloomadega tehtavate katsete puhul tavaliselt, on enne katse algust oluline tagada, et andmed on tõepoolest vajalikud. Andmed võivad olla tõeliselt vajalikud näiteks järgmiste kahe olukorra puhul:
- suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase, vt 2. liide) või kaudsed andmed kemikaali östrogeensuse kohta (2. tase), mille tõttu on vaja uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
  - toimed, mis näitavad östrogeensust 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja millest selgub, et mõjud on seotud östrogeense mehhanismiga, mida ei saa uurida *in vitro* katstes.
13. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

▼ **M5****KATSE PÕHIMÕTE**

14. Uterotroofse biokatse tundlikkuse aluseks on loomkatsesüsteem, milles hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg ei funktsioneer, mistõttu vereringes on vähe endogeenset östrogeeni. See tagab emaka väikse massi mõjutaja puudumisel (nn nulljoon) ja maksimaalse reageerimise manustatud östrogeenidele. Näriliste emasloomadel esineb sellist östrogeenitundlikku seisundit kahes olukorras:
- i) ebaküpsed emasloomad pärast võõrutamist ja enne puberteeti, ning
  - ii) noored täiskasvanud emasloomad pärast munasarjade eemaldamist, kui on antud piisavalt aega emaka taandarenguks.
15. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Uuritava kemikaali eri doosid manustatakse vähemalt kahele katseloomade doosirühmale (vt punkt 33), kasutades kummaski rühmas oma doositaset ja manustamist kolmel järjestikusel päeval ebaküpsede emasloomade meetodi puhul ja vähemalt kolmel järjestikusel päeval täiskasvanud OVX-emasloomade meetodi puhul. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Östrogeeni agonistide leidmiseks hinnatakse kemikaali saanud loomade keskmist emaka massi ja võrreldakse kandeainet saanud loomade rühma vastava näitajaga, et leida statistiliselt olulist suurenemist. Emaka keskmise massi statistiliselt oluline suurenemine osutab, et kõnealuse biokatse vastus on positiivne.

**MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

16. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate näriliseliinide loomi. Valideerimiseks kasutati näiteks Wistari ja Sprague-Dawley liini rotte. Ei tohiks kasutada selliste liinide emasloomi, kelle emakas on või arvatakse olevat vähem tundlik. Labor peaks tõendama liini tundlikkust, nagu on kirjeldatud punktides 26 ja 27.
17. Uterotroofseks biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte ja hiiri. OECD valideerimisuringud tehti ainult rottidega, lähtudes arusaamast, et neid liike võib pidada samaväärseks ja seepärast piisab ülemaailmseks valideerimiseks katsetest ühe liigi loomadega, kuna sellega säästetakse vahendeid ja loomi. Rott valitakse katseloomaks enamiku reproduktiiv- ja arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringutes. Arvestades seda, et hiirte kohta on olemas ulatuslik varasema kasutuse andmebaas, ja selleks, et laiendada näriliste uterotroofse biokatse kasutamist ka hiirtele kui katseliigile, tehti piiratud valideerimisuring hiljem ka hiirtel (16). Kuna peamine soov oli hoida kokku vahendeid ja loomi, valiti võrdlusmeetod, milles kasutati piiratud arvu uuritavaid kemikaale ja osalevaid laboreid ning ei kasutatud koodiga tähistatud näidiste katsetamist. Kõnealune uterotroofse biokatse võrdlev valideerimisuring näitab, et noorte täiskasvanud OVX-hiirte puhul on rottide ja hiirtega saadud andmed omavahel kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt heas kooskõlas. Kui uterotroofse biokatse tulemus on pikema uuringu eelkatse, võimaldab selline kooskõla kasutada mõlemas uuringus sama liini samast allikast pärinevaid loomi. Võrdleva lähenemisviisi juures piirduti OVX-hiirte kasutamisega ja katsed ei andnud töökindlaid andmeid, mis oleksid võimaldanud valideerida meetodi ka ebaküpsede emasloomade mudeli jaoks, seepärast ebaküpsede hiirte mudelit käesoleva katsemeetodi raames ei vaadelda.

**▼ M5**

18. Seega võib mõnel juhul rottide asemel kasutada hiiri. Hiirte kasutamist tuleks põhjendada, lähtudes toksikoloogilistest, farmakokineetilistest ja/või muudest kriteeriumidest. Hiirte korral võib olla vaja muuta katse-eeskirja. Näiteks kasutavad hiired oma kehamassi kohta rohkem sööta ja seepärast peab sööda fütoöstrogeenisaldus olema hiirte puhul madalam kui rottide puhul (9, 20, 22).

**Pidamis- ja söötmingimused**

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Noori täiskasvanud loomi võib hoida puurides eraldi või kuni kolmest loomast koosneva rühmana. Ebaküpsete loomade nooruse tõttu soovitatakse neid pidada puurides sotsiaalsete rühmadena.
21. On teada, et fütoöstrogeenide suur sisaldus laborisöötas suurendab näriiliste emaka massi sedavõrd, et see segab uterotroofse biokatse tegemist (13, 14, 15). Fütoöstrogeenide ja metaboliseeritava energia kõrge tase kasutatavas söötas võib ebaküpsete loomade korral põhjustada ka varast puberteeti. Laborisöötas on fütoöstrogeene peamiselt siis, kui söödaks kasutatakse soja- ja lutsermitooteid, ning on näidatud, et fütoöstrogeenide tase võib sõltuda standardse laborisööda partiist (23). Kehamass on oluline muutuja, kuna tarbitav sööda kogus on seotud kehamassiga. Seetõttu võib tegelik saadav fütoöstrogeenide doos sama sööda juures sõltuda loomaliigist ja vanusest (9). Ebaküpsete emasrottide puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu kaks korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasloomade puhul. Noorte täiskasvanud hiirte puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu neli korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasrottide puhul.
22. Uterotroofse biokatse tulemused (9, 17, 18, 19) näitavad siiski, et piiratud koguse fütoöstrogeenide olemasolu söötas on lubatav ja ei vähenda biokatse tundlikkust. Juhinduda tuleks sellest, et söödaga saadav fütoöstrogeenide kogus ei ületaks 350 µg genisteiiniequivivalenti laborisööda grammi kohta ebaküpsete Sprague-Dawley ja Wistari rottide puhul (6, 9). Selline sööt peaks samuti sobima katse tegemisel noorte täiskasvanud OVX-rottidega, kuna nende söödatarbimine kehamassi kohta on väiksem kui ebaküpsedel loomadel. Kui kasutatakse täiskasvanud OVX-hiiri või fütoöstrogeenide suhtes tundlikumaid rotte, tuleb sööda fütoöstrogeenisaldust vastavalt vähendada (20). Lisaks võivad eri söötade kättesaadava metaboliseeritava energia erinevused põhjustada puberteedi algust eri vanuses (21, 22).

▼ **M5**

23. Enne uuringut tuleb hoolikalt valida sööt, mille fütoöstrogeenide tase ei oleks liiga kõrge (vt juhendid 6, 9) või milles ei oleks liiga palju metaboliseeritavat energiat, mis võib moonutada tulemusi (15, 17, 19, 22, 36). Laboris kasutatava katsesüsteemi õige toimimise tagamine, nagu on täpsustatud punktides 26 ja 27, on oluline mõlema teguri kontrolli alla võtmiseks. Hea laboritava kohane kaitsemeede on võtta uuringu ajal manustatava sööda igast partiist representatiivsed proovid, et oleks võimalik teha fütoöstrogenisisalduse analüüsi (nt kui kontrollrühma keskmine emaka mass on suurem kui varasemate kontrollrühmade puhul või kui katses standardöstrogeeni 17 $\alpha$ -etinüülöstradiooliga saadakse ebasobiv tulemus). Uuringu käigus tuleks teha alikvootide analüüs või need külmutada –20 °C juures või säilitada nii, et proovid ei laguneks enne analüüsimist.
24. Mõned allapanumaterjalid võivad sisaldada looduslikult esinevaid östrogeenseid või antiöstrogeenseid kemikaale (nt on teada, et maisitõlvik mõjutab emasrottide tsükli ja näib olevat antiöstrogeenne). Valitud allapanumaterjal peaks sisaldama võimalikult vähe fütoöstrogeene.

**Loomade ettevalmistamine**

25. Katseks valitakse loomad, kel ei esine mingeid haigusnähte ega füüsilisi kõrvalekaldeid, ja need jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Loomadele tuleks anda kordumatu märgis. Ebaküpsed loomad peaksid eelistatavalt olema kuni võõrutamiseni puurides koos oma ema või kasuemaga. Kohanemisaeg enne uuringu algust peaks olema umbes 5 päeva noorte täiskasvanud loomade puhul ja ebaküpsede loomade puhul, kes on tarnitud koos oma ema või kasuemaga. Kui ebaküpsed loomad ostatekse ilma emata kohe pärast võõrutamist, võib olla vajalik kasutada lühemat kohanemisaega, kuna dooside manustamine peaks algama kohe pärast võõrutamist (vt punkt 29).

**KATSE KORRALDUS****Labori pädevuse kontrollimine**

26. Labori pädevuse kontrollimiseks saab kasutada kahte meetodit:

- perioodiline kontrollimine, mille aluseks on algse nulljoone positiivse kontrolli katse (vt punkt 27). Vähemalt iga 6 kuu järel ja iga kord, kui toimub muutus, mis võib mõjutada katse usaldusväärsust (nt uus laborisööda koostis, uus lahkamist teostav isik, loomaliini või loomade tarnija vahetamine jne) tuleks kontrollida katsesüsteemi (loommudeli) tundlikkust, kasutades nulljoone positiivse kontrolli katset, mida on kirjeldatud punktis 27 ja võrdlusöstrogeeni 17 $\alpha$ -etinüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) sobivat doosi;
- samaaegsete kontrollkatsete tegemine, milleks nähakse igas katses ette rühm, kellele manustatakse sobiv doos võrdlusöstrogeeni.

Kui süsteemi reaktsioon ei vasta ootustele, tuleb uurida katsetingimusi ja neid vastavalt muuta. On soovitatav, et kummagi lähenemisviisi puhul kasutataks võrdlusöstrogeeni doos oleks ligikaudu 70–80 efektiivdoosi.



▼ **M5**

27. **Nulljoone positiivse kontrolli katse.** Enne kui labor teeb käesoleva katsejuhendi järgi esimese katse, tuleks tal tõendada oma pädevust. Selleks uuritakse loomumodeli reageerimist võrdlusöstrogeeni 17 $\alpha$ -etinüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) vähemalt neljale doosile. Emaka massi suurenemist võrreldakse varasemate kontrollitud andmetega (vt viide 5). Kui kõnealune nulljoone positiivse kontrolli katse ei anna oodatud tulemusi, tuleb katsetingimused üle vaadata ja neid muuta.

**Loomade arv ja seisund**

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma (nii ebaküpse emaslooma kui ka täiskasvanud OVX-emaslooma eeskirja puhul).

**Ebaküpsete loomade vanus**

29. Ebaküpsete loomade uterotroofse biokatse tegemisel peab olema täpsustatud loomade sünni kuupäev. Dooside manustamisega tuleks alustada piisavalt vara, et uuritava kemikaali manustamise lõpuks ei oleks puberteediga seotud endogeensete östrogeenide taseme tõus veel alanud. Teisest küljest on tõendeid, et väga noored loomad võivad olla vähem tundlikud. Optimaalse vanuse kindlaksmääramiseks peaks iga labor võtma arvesse oma varasemaid tulemusi suguküpsuse saavutamise kohta.

Üldise suunisenähtuse võib rottidele dooside manustamist alustada kohe pärast varast võõrutamist, st 18. päeval pärast sündi (sünnimise päev loetakse sünnijärgseks päevaks 0). Dooside manustamine rottidele tuleks eelistatult lõpetada 21. sünnijärgsel päeval ja igal juhul enne 25. sünnijärgset päeva, kuna pärast seda päeva hakkab hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg toimima ja endogeensete östrogeenide tase võib hakata tõusma, millele vastavalt hakkab suurenema keskmine nulljoone emaka mass ja rühma standardhälve (2, 3, 10, 11, 12).

**Munasarjade eemaldamise kord**

30. Eemaldatud munasarjadega rottide ja hiirte saamiseks (doosi- ja kontrollrühmad) tuleb emasloomal eemaldada munasarjad vanuses 6–8 nädalat. Roti puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 14 päeva, et emakas saaks taandareneda miinimumini ehk stabiilse nulljooneni. Hiire puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 7 päeva. Kuna östrogeenide taseme tõstmiseks veres piisab juba väiksest kogusest munasarjakoest (3), tuleks loomi enne kasutamist kontrollida tupe-tampooniprooviga saadud epiteelialrakude vaatlemisega vähemalt viiel järjestikusel päeval (nt päevad 10–14 pärast roti emaslooma munasarjade eemaldamist). Kui loomal esineb algava östruse tunnuseid, ei tohiks teda katseks kasutada. Lisaks tuleb lahangul uurida munasarjade kunagisi kinnituskohi munasarjakoe leidmiseks. Kui sellist kude leitakse, ei tohiks looma andmeid arvutustes kasutada (3).
31. Munasarjade eemaldamiseks loom tuimestatakse korralikult ja pannakse lamama kõhuli. Sisselõige, millega avatakse kõhuõõne dorsolateraalne sein, peaks olema pikkusega umbes 1 cm ja asuma alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskel ning mõni millimeeter külgmiselt niudelihase välimisest servast. Munasari tuleks eemaldada kõhuõõnest aseptilisele alale. Munasari tuleks eraldada munajuha ja emakakeha kokkupuutekohalt. Kui on tehtud kindlaks, et massiivset verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või sobiva õmblusega. Niidiga sidumise kohad on skemaatiliselt näidatud joonisel 1. Tuleb kasutada asjakohast operatsioonijärgset tuimestust, vastavalt näriliste ravivõtte kogenud veterinaararsti soovitudele.

▼ **M5****Kehamass**

32. Täiskasvanud OVX-emaslooma meetodi kasutamisel ei ole kehamass ja emaka mass omavahel seotud, kuna emaka massi mõjutavad hormoonid, nagu östrogeenid, kuid mitte kasvutegurid, mis reguleerivad keha suurust. Seevastu ebaküpse emaslooma kasutamisel on kehamass seotud emaka massiga küpsemise ajal (34). Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ebaküpse emaslooma meetodi kasutamisel ületada  $\pm 20\%$  keskmisest kehamassist. See tähendab, et loomade kasvataja peaks standardima pesakonna suuruse, et eri emasloomade järglased saaksid umbes ühepalju toitu. Loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Tuleks jälgida, et sama pesakonna liikmeid ei määrataks samasse doosirühma, kuivõrd see on võimalik ilma uuringus kasutatavate pesakondate arvu suurendamiseta.

**Doseerimine**

33. Selleks et teha kindlaks, kas uuritava kemikaalil võib *in vivo* olla östrogeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ja ühest kontrollrühmast; seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale östrogeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava aine manustamisel kasutatakse kandeainet, peaks kontrollrühm saama doosirühmadega võrdses koguses kandeainet (või kui doosirühmades kasutatakse erinevaid koguseid, siis neist suurima koguse).

34. Uterotroofse biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise ning mis ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kolmel järjestikusel päeval maksimumdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeima doosimäära puhul tuleks kõigepealt arvestada LD50 väärtust ja/või andmeid ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi ja stressi (24, 25, 26). Suurim doos peaks vastama suurimale talutavale doosile; uuringu võib teha ka doosi suuruse juures, mis põhjustab positiivse utero- troofse reaktsiooni. Kuna see on sõelkatse, siis võib üldiselt kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi kuni 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse.

35. Teiselt poolt, kui agonisti östrogeenseid omadusi on võimalik hinnata *in vitro* (või *in silico*) andmetest, võib neid doosi valimisel arvesse võtta. Näiteks määratakse uuritava kemikaali kogus, mis utero- troofses biokatses põhjustab võrdlusagonisti (etinüülöstradiool) mõjuga ekvivalentse reaktsiooni, tema suhtelise tõhususe järgi *in vitro*, võrreldes etinüülöstradiooliga. Kõrgeim katses kasutatav doos leitakse selle ekvivalentse doosi korrutamisel sobiva teguriga, näiteks 10 või 100ga.

▼ **M5****Vahemiku leidmise kaalutlused**

36. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti nr 19 (25), milles on määratletud mürgisusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib emakad pärast kolmepäevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võiks seejärel kasutada põhiuuringu kava koostamiseks (et valida sobivad suurim ja väiksem doos ja vajalik doosirühmade arv).

**Dooside manustamine**

37. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaolu kaalutlusi, toksikoloogia aspekte (kuivõrd asjakohane on teatav manustamistee, arvestades inimese kemikaaliga kokkupuute viise (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid sissehingamisele või naha kaudu imendumisele), uuritava materjali füüsikalisi ja keemilisi omadusi ning eriti olemasolevaid toksikoloogilisi andmeid ning andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral).
38. Soovitav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna enamik östrogeneid ligande või nende metaboolseid eellasi on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Need õlid on eri kalorsuse ja rasvasisaldusega, seega võib kandeaine mõjutada üldist metaboliseeritava energia omastamist, mille tõttu võivad muutuda mõõdetavad näitajad, nagu emaka mass, eeskätt ebaküpse emaslooma meetodi puhul (33). Seepärast tuleb enne uuringut katsetada kandeainet ja võrrelda kontrollrühmaga, kellele ei anta kandeainet. Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökonsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peavad olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealikoostis ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused.
39. Doosi manustamise ajastus sõltub kasutatavast mudelist (vt punkt 29, ebaküpse emaslooma mudel, ja punkt 30, täiskasvanud OVX-emaslooma mudel). Ebaküpsetele emasrottidele manustatakse uuritavat kemikaali iga päev kolmel järjestikusel päeval. Kolmepäevast dooside manustamist soovitatakse ka täiskasvanud OVX-emasrottide puhul, kuid sel juhul on lubatav ka pikem kokkupuude ja nii saab paremini avastada nõrga toimega kemikaale. Täiskasvanud OVX-emashiirte puhul peaks 3-päevane manustamine olema piisav ja manustamise pikendamisel seitsme päevani ei ole tugevate östrogeeniagonistide puhul erilisi eeliseid, kuid valideerimisuuringus näidati, et nõrkade agonistidega see nii ei ole (16), seepärast tuleks OVX-emashiirte puhul pikendada dooside manustamist kuni 7 järjestikuse päevani. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Doose tuleks vajaduse korral kohandada, et säilitada konstantset doosimäära looma kehamassi suhtes (nt mg uuritavat kemikaali ühe kg kehamassi kohta päevas). Katses kasutatava lahuse mahu muutumine tuleks hoida minimaalne; tuleks muuta uuritava aine lahuse kontsentratsiooni, et tagada ühesugune lahuse maht kehamassi suhtes kõikide dooside ja manustamisviiside puhul.

▼ **M5**

40. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedeliku maht, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada kuni 10 ml kehamassi kg kohta.
41. Kui uuritavat kemikaali manustatakse nahaaluse süstiga, tuleks päevane doos manustada üheainsa süstiga. Doose tuleks manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõela (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljaimbumine või doosi mittetäielik manustamine. Rotile päevas süstitav lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, mis jagatakse kahe süstekoha vahel; vesilahuste puhul võib erandina süstida 10 ml kehamassi kg kohta.

**Vaatlused***Üld- ja kliinilised vaatlused*

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul jälgitakse suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).

*Kehamass ja sööda tarbimine*

43. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumise. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

*Lahkamine ja emaka massi mõõtmine*

44. Kaksikümend neli tundi pärast viimase doosi manustamist rotid surmatakse humaanselt. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamised teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid natuke mõjutada. Biokatse eesmärk on mõõta nii märja emaka kui ka kuivatatud emaka mass. Märkmass hõlmab emaka ja selle valendikus oleva vedeliku massi. Kuivatatud emaka mass mõõdetakse pärast selle valendikus oleva vedeliku väljapigistamist ja kõrvaldamist.
45. Ebaküpsete emasloomade puhul uuritakse enne lahkamist tuppe, et teha kindlaks tupe võimalik avanemine. Lahkamist alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eemaldatakse emakasarved ja munasarjad, kui viimased on olemas, kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupe-suudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupe-seina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel 2. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi

▼ **M5**

emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast keha eemaldamist tuleks emakat käsitseda piisavalt kiiresti, et vältida kudede kuivamist. Massikadu kuivamise tõttu muutub olulisemaks just väikeste kudede nagu emaka puhul (23). Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Liigne rasv ja sidekude tuleks ära lõigata. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel 2.

46. Iga emakas tuleks paigutada kordumatu märgisega teadaoleva massiga anumasse (nt Petri tass või plastikust kaalumismõõ), jälgides kogu aeg, et koed ei enne kaalumist ära ei kuivaks (nõusse võib panna näiteks soolalahusega kergelt niisutatud filterpaberi). Emakas koos valendikus oleva vedelikuga kaalutakse täpsusega 0,1 mg (märja emaka mass).
47. Seejärel töödeldakse eraldi iga emakat, et eemaldada valendikus olev vedelik. Mõlemad emakasarved torgatakse läbi või lõigatakse pikuti lõhki. Emakas pannakse kergelt niisutatud filterpaberile (nt Whatman nr 3) ja pressitakse kergelt teise kergelt niisutatud filterpaberiga valendikus oleva vedeliku täielikuks eemaldamiseks. Emakas ilma valendikus oleva vedelikuta kaalutakse täpsusega 0,1 mg (kuivatatud emaka mass).
48. Katse lõpetamisel määratud emaka massi võib kasutada selle tõendamiseks, et ebaküpse opereerimata roti katses kasutamise sobivat vanust ei ületatud, kuid laboris kasutatava rotiliini varasemad andmed on selles suhtes otsustava tähtsusega (vt tulemuste tõlgendamine, punkt 56).

*Vabavalikulised uuringud*

49. Pärast kaalumist võib emaka fikseerida neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahuses, et seda saaks histopatoloogiliselt uurida pärast värvimist hematok-süliini ja eosiiniga. Ka tuppe võib samal viisil uurida (vt punkt 9). Lisaks võib teha morfoomeetrilise mõõtmise endomeetriumi epiteeli kvantitatiivseks võrdlemiseks.

**KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:

- loomade arv katse alguses,
- surnuna leitud või katse jooksul humaansetel põhjustel surmatud loomade arv ja koodnumbrid ning iga looma surma või humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg,
- mürgistustunnustega loomade arv ja koodnumbrid ning tunnuste kirjeldus, sealhulgas toksilise toime täheldatud algushetk, kestus ja raskusaste, ning
- kahjustustega loomade arv ja koodnumbrid ning kahjustuste tüübi kirjeldus.

▼ **M5**

51. Iga looma kohta registreeritakse kehamass, märja emaka mass ja kuivatatud emaka mass. Selleks, et teha kindlaks, kas uuritava kemikaali manustamine põhjustas statistiliselt olulise ( $p < 0,05$ ) emaka massi suurenemise, tuleks agonistide puhul kasutada ühepoolset statistilist analüüsi. Kuivatatud emaka massi ja märja emaka massi suurenemist tuleks analüüsida asjakohaste statistiliste meetoditega, et kindlaks teha kemikaali manustamisega seotud suurenemine. Näiteks võib andmeid hinnata kovariatsioonianalüüsi (ANCOVA) lähenemisviisi abil, kus kaasmuutujaks on kehamass lahkamise ajal. Enne andmete analüüsi võib emaka andmed logaritmiliselt teisendada dispersiooni stabiilsuse suurendamiseks. Iga doosirühma paariviisiliseks võrdlemiseks kontrollrühmaga ja usaldusvahemiku leidmiseks sobivad Dunnetti ja Hsu test. Võimalike väärtuste leidmiseks ja dispersiooni homogeensuse hindamiseks võib kasutada jääkhälvete töötlemist Studenti teljestikus. Neid meetodeid kasutati OECD valideerimisuurings, milles kasutati statistilise analüüsi süsteemi programmi PROC GLM (SAS Institute, Cary, NC), versioon 8 (6, 7).

52. Lõpp-protokollis esitatakse järgmine.

*Uurimislabor:*

- vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;
- nulljoone positiivse kontrolli andmed ja perioodilise positiivse kontrolli andmed (vt punktid 26 ja 27).

*Uuritav kemikaal:*

- uuritava kemikaali iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste analüüsid.

*Kandeaine:*

- kandeaine iseloomustus (olek, tarnija ja partii);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

*Katseloomad:*

- liik, liin ja nende valimise põhjendus;
- tarnija ja tema konkreetne käitis;
- loomade vanus tarnimise ajal ja sünnikuupäev;
- ebaküpsete loomade puhul: kas tarniti koos ema või kasuemaga ja võõrutamise kuupäev;
- loomade kohanemise korra üksikasjad;
- loomade arv puuris;
- üksikloomade ja rühma märgistamise üksikasjad ja meetod.

*Katse tingimused:*

- randomiseerimise üksikasjad (st kasutatud juhuvaliku meetod);
- doosi valimise põhjendused;

▼ **M5**

- uuritava kemikaali doseerimisvormi üksikasjad, saavutatud kontsentratsioon, stabiilsus ja homogeensus;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, koostis ja, kui see on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- vee päritolu (nt kraanivesi või filtritud vesi) ja loomadele kättesaadavaks tegemine (torude kaudu suurest mahutist, pudelist jne);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puurides pidamise tingimused, valgustusaeg, ruumi temperatuur ja õhuniiskus, ruumi koristamine;
- lahkamise ja emaka kaalumise korra üksikasjalik kirjeldus;
- statistiliste töötluste kirjeldus.

*Tulemused**Iga looma kohta:*

- iga looma kehamass igal päeval (rühmadesse jagamisest kuni lahkamiseni) (täpsusega 0,1 g);
- iga looma vanus (päevades, lugedes sündimise päeva 0-päevaks) selleks ajaks, kui algas uuritava kemikaali manustamine;
- iga doosi manustamise kuupäev ja kellaaeg;
- manustatud doosi suurus ja arvatud ruumala ning kõik tähelepanekud kadude kohta doosi manustamisel või pärast manustamist;
- igapäevased andmed looma olukorra kohta, kõik asjakohased sümptomid ja tähelepanekud;
- oletatav surma põhjus (kui loom uuringu ajal oli suremas või suri);
- humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg ning ajavahemik pärast viimast manustamist;
- märja emaka mass (täpsusega 0,1 mg), tähelepanekud valendikus olnud vedeliku kadude kohta lahkamise ja kaalumiseks ettevalmistamise ajal;
- kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg).

*Iga loomade rühma kohta:*

- keskmine kehamass igal päeval (täpsusega 0,1 g) ja standardhälbed (rühmadesse määramisest kuni lahkamiseni);
- keskmine märja emaka mass ja keskmine kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg) ja standardhälbed;
- kui mõõdeti, siis igapäevane sööda tarbimine (arvatuna tarbitud sööda grammides looma kohta);

## ▼ M5

- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud märja emaka ja kuivatatud emaka massi doosirühmades ja kandeainet saanud rühmades;
- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud doosirühmade loomade üldist kehamassi ning kehamassi suurenemist märja emaka ja kuivatatud emaka massiga ja kõrvutatud neid tulemusi kandeainet saanud kontrollrühmade asjaomaste näitajatega.

## 53. Katsemeetodi oluliste suunavate faktide kokkuvõte

	Rott	Hiir
<b>Loomad</b>		
Liin	Tavaliselt kasutatav laborinäriiliste liin	
Loomade arv	Vähemalt 6 looma ühes doosirühmas	
Rühmade arv	Vähemalt 2 doosirühma (vt punkt 33 juhiste saamiseks) ja negatiivne kontrollrühm Vt punktid 26 ja 27, juhised positiivse kontrollkatse rühmade kohta	
<b>Pidamis- ja söötmingimused</b>		
Loomade ruumi T°	22 °C ± 3 °C	
Suhteline õhuniiskus	50–60 %, mitte alla 30 % ega üle 70 %	
Ööpäeva valgustusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust	
Sööt ja joogivesi	Ad libitum	
Majutus puurides	Üksi või kuni kolmest loomast koosnevate rühmadena (ebaküpsed loomi soovitatakse pidada sotsiaalsete rühmadena)	
Sööt ja allapanu	Sööda ja allapanu fütoöstrogeenide sisaldus peaks olema väike	
<b>Katse-eeskiri</b>		
Meetod	Ebaküpsede eemaldamata munasarjadega loomade meetod (eelistatud valik). Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod	Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod
Ebaküpsete loomade vanus dooside manustamisel	Vähemalt PND 18. Dooside manustamine tuleb lõpetada enne päeva PND 25.	Praeguse meetodi puhul ei ole asjakohane.
Vanus munasarjade eemaldamisel	Vanuses 6–8 nädalat.	
Eemaldatud munasarjadega loomade vanus dooside manustamisel	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 14 päeva.	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 7 päeva.
Kehamass	Kehamassi erinevused peaksid olema minimaalsed, mitte üle ±20 % keskmisest kehamassist	



## ▼ M5

	Rott	Hiir
<b>Doseerimine</b>		
Manustamistee	Suukaudne sond või nahaalune süst	
Manustamise sagedus	Ühekordne päevane doos	
Sondiga ja süstimisega manustatav ruumala	≤ 5 ml kehamassi kg kohta (või vesilahuste puhul kuni 10 ml kehamassi kg kohta) (kahte süstimiskohta nahaaluse manustamise puhul)	
Manustamise kestus	Ebaküpsete loomade puhul 3 järjestikusel päeval OVX-loomade puhul vähemalt 3 järjestikusel päeval	OVX-loomade puhul 7 järjestikusel päeval
Lahkamisaeg	Ligikaudu 24 tundi pärast viimast doosi	
<b>Tulemused</b>		
Positiivne vastus	Keskmise emakamassi statistiliselt oluline suurenemine (märja ja/või kuivatatud emaka mass)	
Võrdlusöstrogeen	17α-etiinülöstradiool	

## TULEMUSTE TÖLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

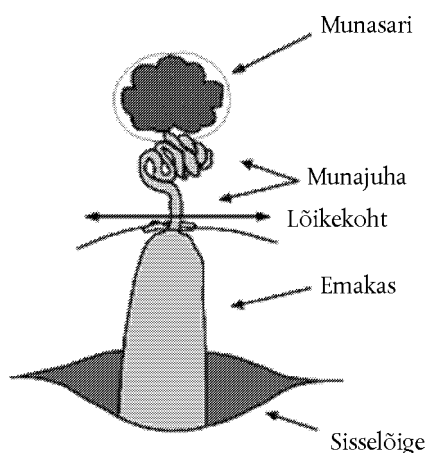
54. Üldiselt tuleks östrogeensuse test lugeda positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline emakamassi suurenemine ( $p < 0,05$ ) vähemalt suure doosi rühmas, võrreldes lahusti kontrollrühmaga. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutav sõltuvus doosi ja toime ulatuse vahel, pidades aga silmas, et uuritava kemikaali kattuvad östrogeensed ja antiöstrogeensed toimed võivad mõjutada uuritava kemikaali doosi-toime sõltuvuse kuju.
55. Tuleb jälgida, et ei ületataks suurimat talutavat doosi, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid.
56. Oluline asjaolu uterotroofse biokatse tulemuste kehtivaks tunnistamisel on emaka mass kandeaine kontrollrühma liikmetel. Suur emaka mass kontrollrühma liikmetel võib panna kahtluse alla biokatse tundlikkuse ja võime tuvastada väga nõrku östrogeeni agoniste. Kirjandusülevaated ja uterotroofse biokatse valideerimise käigus kogutud andmed osutavad, et kontrollrühma emakamassi kõrge keskmine esineb spontaanselt, eriti ebaküpsete loomade puhul (2, 3, 6, 9). Kuna ebaküpse roti emaka mass sõltub mitmest muutujast, nagu stress või kehamass, ei ole võimalik anda kindlat emaka massi ülempiiri. Juhendumiseks: kui ebaküpsete rottide kontrollrühmas emaka mass on 40–45 mg, tuleks tulemusi pidada kahtlaseks, ja emaka mass üle 45 mg võib tähendada, et katsed tuleks korrata. Siiski tuleb seda kaalutleda iga juhtumi puhul eraldi (3, 6, 8). Täiskasvanud rottidega katsete tegemisel võib munasarjade puudulikul eemaldamisel jääda alles munasarjakude, mis võib nõrendada endogeenseid östrogeene ja aeglustada emakamassi taandarengut.

## ▼ M5

57. Kandeaine kontrollrühma kuivatatud emaka mass, mis on väiksem kui 0,09 % roti ebaküpse emaslooma kehamassist ja väiksem kui 0,04 % roti eemaldatud munasarjadega noore täiskasvanud emaslooma kehamassist, näib andvat vastuvõetavaid tulemusi (vt tabel 31 (2)). Kui kontrollrühmas on emaka mass suurem kui kõnealused arvud, tuleks analüüsida eri tegureid, nagu loomade vanus, munasarjade eemaldamise nõuetekohasus, söödaga saadavad fütoöstrogeenid jne), ja katse negatiivset tulemust (östrogeense toime puudumine) tuleks võtta ettevaatusega.
58. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemad andmed. Samuti tuleks laboris säilitada andmed selliste võrdlusöstrogeenide nagu 17 $\alpha$ -etinüülöstradiool poolt esilekutsutud reaktsiooni kohta. Labor võib teha katseid ka teadaolevalt nõrga östrogeeni agonisti reaktsiooni määramiseks. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate andmetega (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), et veenduda selles, et labori meetod on piisavalt tundlik.
59. Kuivatatud emaka massi varieeruvus oli OECD valideerimisuringus väiksem kui märja emaka massi puhul (6, 7). Kuid kummagi näitaja väärtuste tugev suurenemine viitab siiski sellele, et uuritav aine on östrogeense toime poolest positiivne.
60. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult östrogeense päritoluga, kuid uterotroofse biokatse positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada kui tõendit võimaliku östrogeensuse kohta *in vivo*, ja see peaks tavaliselt andma põhjust selle küsimuse edasiseks täpsustamiseks (vt punkt 9 ning „Sisesekreetsiooni-süsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik“, 2. lisa).

Joonis 1

## Skeem munasarjade kirurgilise eemaldamise kohta



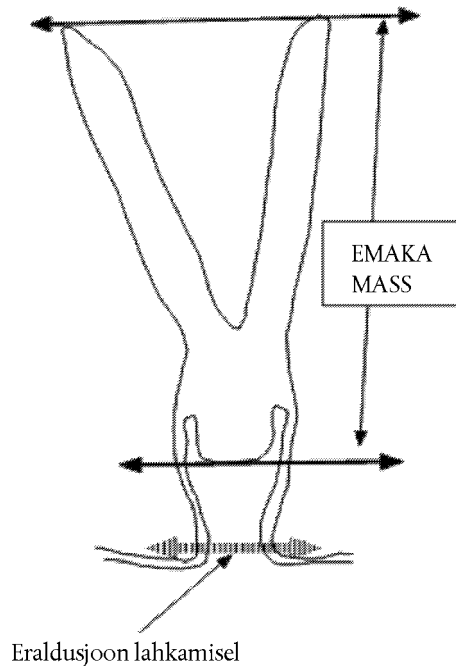
Mesomeetriumi, veresooni ega  
rasvpadjandit ei ole näidatud

Operatsioon algab kõhuõõne dorsolateraalse seina avamisega alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskpunktis ning mõne millimeetri kaugusel niudelihase välimisest servast. Kõhuõõnes tuleks leida munasarjad. Munasarjad eemaldatakse seejärel füüsiliselt kõhuõõnest aseptilisele alale, munasarja ja emaka vahele pannakse ligatuur verejooksu vältimiseks ning munasari eemaldatakse sisselõikega ligatuuri kohalt kummagi munajuha ja emakasarve ühinemiskohast. Kui on tehtud kindlaks, et olulist püsivat verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või õmblusega. Loomadel lastakse paraneda ja emakal taandarenda vähemalt 14 päeva enne katses kasutamist.

▼ M5

Joonis 2

Emakakudede eemaldamine ja ettevalmistamine massi määramiseks.



Tööd alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eraldatakse kumbki munasari ja emakasarv kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupesuudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast emaka eemaldamist lõigatakse ära liigne rasv ja sidekude. Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel. Emaka võib seejärel kaaluda.

▼ **M5**

## 1. liide

## MÕISTED

**Antiöstrogeensus** – kemikaali võime alla suruda 17 $\beta$ -etinüülöstradioli toimet imetajate organismile.

**Doos** – manustatav uuritava kemikaali kogus. Uterotroofse biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (nt mg kehamassi kg kohta päevas).

**Doseerimine** – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Maksimaalne talutav doos**(*Maximum Tolerable Dose, MTD*) – suurim kemikaali kogus, mis katselooma kehasse viiduna ei põhjusta katselooma surma (tähis LD<sub>0</sub>) (IUPAC, 1993).

**Spetsiifilisus** – kõikide negatiivsete/toimeta ainete osakaal, mis katsemeetodi abil klassifitseeritakse õigesti. See on tõhususe näitaja katsemeetodi puhul, mis näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

**Sünnijärgne päev X** – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

**Sünnikuupäev** – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

**Tundlikkus** – kõikide positiivsete/toimivate ainete osakaal, mis klassifitseeritakse katsemeetodi abil õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

**Uterotroofne** – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju emaka kudede kasvule.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Östrogeensus** – kemikaali võime avaldada imetaja organismile 17 $\beta$ -etinüülöstradioli omaga sarnanevat toimet.

**Valideerimine** – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

## 2. liide

**Märkus:** dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

## Sisesekretoonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

<p><b>Tase 1</b> Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— füüsilised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus</li> <li>— inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmismahd, heide keskkonda, kasutusviisid</li> <li>— ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed</li> </ul>
<p><b>Tase 2</b> <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus</li> <li>— Transkriptsiooni aktiveerimine</li> <li>— Aromataas ja steroidogenees <i>in vitro</i></li> <li>— Arüülsüsiivesinike retseptori äratundmine/sidumine</li> <li>— kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR)</li> <li>— Suure jõudlusega sõeluuringud</li> <li>— Kilpnäärmefunktsioon</li> <li>— Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse</li> <li>— Muud (vastavalt vajadusele)</li> </ul>
<p><b>Tase 3</b> <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Uterotroofne katse (östrogeenid)</li> <li>— Hershbergeri katse (androgeenid)</li> <li>— Hormooni retseptorisõltumatu toime</li> <li>— Muud (nt kilpnääre)</li> <li>— Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)</li> </ul>
<p><b>Tase 4</b> <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel)</li> <li>— Isas- ja emasloomade puberteedikatsed</li> <li>— Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse</li> <li>— Kala sugunäärmete histopatoloogia katse</li> <li>— Kullese metamorfoosi katse</li> </ul>
<p><b>Tase 5</b> <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG415)<sup>1</sup></li> <li>— 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG416)<sup>1</sup></li> <li>— reproduktiivõelumiskatse (tõhustatud TG421)<sup>1</sup></li> <li>— kombineeritud 28 päeva / reproduktiivõelumise katse (tõhustatud TG422)<sup>1</sup></li> <li>— Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)</li> </ul>

<sup>1</sup> VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

**▼ M5****MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE**

- Märkus 1:* kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.
- Märkus 2:* tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.
- Märkus 3:* kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendada ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.
- Märkus 4:* iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.
- Märkus 5:* praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.
- Märkus 6:* raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

▼ M5

## KIRJANDUS

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- 3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.
- 4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- 5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.
- 6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- 7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549
- 8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.
- 9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- 10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.
- 11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- 12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.
- 13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.
- 14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.
- 15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼ **M5**

- 16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- 17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145–157.
- 18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- 19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613–620.
- 20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477–485.
- 21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343–347.
- 22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381–393.
- 23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596–601.
- 24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- 28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- 29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- 30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- 31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64-12367-9, Paris.
- 32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization.* New York, Academic Press.
- 33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401–416.



**▼ M5**

- 34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1–2): 159–184.
- 35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- 36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- 37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. No. 71.
- 38) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

## ▼ M5

**B.55. HERSHBERGERI BOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÖELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 441 (2009). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbi-vaatamise ja uute väljatöötamise, et söeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekreetsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja rotiga tehtava Hershbergeri biokatse juhend. Pärast mitme aastakümne pikkust kasutamist ravimitööstuses standarditi see katse kõigepealt ametliku eksperdikomitee poolt 1962. aastal söelkatsena androgeense toimega kemikaalide väljaselgitamiseks (2). Aastatel 2001–2007 läbis rotiga tehtav Hershbergeri biokatse ulatusliku valideerimisprogrammi, mille käigus koostati üksikasjalik taustadokument (23), põhjalik artikkel (3) meetodite kohta, arendati välja lahkamise juhendid (21) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust. Nimetatud uuringud viidi läbi tugeva võrdlusandrogeeniga (testosteroonpropionaat (TP)), kahe tugeva sünteetilise androgeeniga (trenboloonatsetaat ja metüültestosteroon), ühe tugeva antiandrogeense ravimiga (flutamiid), loodusliku androgeeni (dihüdrotestosteroon, DHT) sünteeti tugeva inhibiitoriga (finasteriid), mitme nõrgalt antiandrogeense pestitsiidiga (linuroon, vinklosoliin, protümidoon, *p,p'*-DDE), tugeva 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitoriga (finasteriid) ja kahe teadaoleva toimeta (negatiivse) kemikaaliga (dinitrofenool ja nonüülfenool) (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on võetud kokku pikaajaliste biokatsetega saadud kogemused ning valideerimisprogrammi käigus saadud kogemused ja saavutatud tulemused.
2. Hershbergeri biokatse on kiire *in vivo* söelkatse, milles kasutatakse isassuguorganite kudesid. Katse töötati välja 1930. aastatel ja 1940. aastatel seda muudeti, et lisada ka isassuguorganite androgeenitundlikud lihased (2, 9–15). 1960. aastatel hinnati katse-eeskirja standarditud versiooni kasutades enam kui 700 võimalikku androgeeni (2, 14); sel ajal peeti seda katset nii androgeenide kui ka antiandrogeenide määramise standardmeetodiks (2, 15). Praegune biokatse põhineb enne puberteeti kastreeritud isasrottide viie androgeenisõltuva koe massi muutustel. Sellega hinnatakse, kas kemikaal kutsus esile bioloogilisi toimeid, mis on kooskõlas androgeeni agonistide, antagonistide või 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorite toimega. Viis androgeenisõltuvat kude, mida hõlmab käesolev katsemeetod, on ventraalne eesnäär (ventral prostate, VP), seemnepõis (seminal vesicle, SV) (pluss vedelikud ja koagulatsiooninäärmed), lihas levator ani-bulbocavernosus (LABC), paarilised Cowperi näärmed (COW) ja suguti pea (glans penis, GP). Enne puberteeti kastreeritud isasrottidel reageerivad kõik need viis kude androgeenidele absoluutse massi suurenemisega. Samas kui nende kudede stimuleerimine tugeva võrdlusandrogeeniga suurendab nende massi, väheneb kõigi nende viie koe mass antiandrogeenide toimel. Hershbergeri biokatse esmane mudel oli enne puberteeti kirurgiliselt kastreeritud isasrott; seda mudelit valideeriti Hershbergeri valideerimisprogrammide etappidel 1, 2 ja 3.
3. Biokatset saab kasutada androgeeni agonistide, antagonistide ja 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorite rutiinseks *in vivo* söeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” (2. liide) kontekstis. Selles

## ▼ M5

kontseptuaalses raamistikus on Hershbergeri biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt (anti)androgeensuse kohta. Hershbergeri biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale.

4. Kuna loomade kastreerimise operatsioon on küsitav loomade heaolu seisukohast, püüti alternatiivse mudelina hakata kasutama opereerimata (kastreerimata) võõrutamises isasrotte, et vältida Hershbergeri biokatses kastreerimiseta. Võõrutuseas isasloomade katsemeetod valideeriti (24); kuid valideerimisuuringus selgus, et Hershbergeri biokatse võõrutamises isasloomade versiooniga ei ole võimalik järjekindlalt avastada nõrkade antiandrogeenide kasutatud kontsentratsioonide mõju androgeenisõltuvate kudede massile. Seetõttu ei hõlma käesolev katsemeetod seda versiooni. Kuna aga selle kasutamine võib olla oluline mitte ainult loomade heaolu seisukohast, vaid võib anda ka teavet muude toimeviiside kohta, on see kättesaadav OECD juhenddokumendis 115 (25).

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Androgeeni agonistid ja antagonistid toimivad androgeenireseptorite ligandidena ja võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. Lisaks takistavad mõned kemikaalid testosterooni muutmist mõjusamaks looduslikuks androgeeniks dihidrotestosterooniks mõnes androgeeni sihtkoes (5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorid). Sellised kemikaalid võivad põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on regulatiivsetel eesmärkidel vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke androgeeni agoniste või antagonistide või 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorideid. Kuigi ligandi afiinsus androgeenireseptori suhtes, mida mõõdetakse retseptorile sidumise või reporter geenide transkriptsiooni aktiveerimise kaudu *in vitro*, annab küll olulist teavet, ei ole see siiski mitte ainus võimalik ohtu põhjustav tegur. Muud tegurid hõlmavad metabolismi aktiveerimist ja inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, kemikaalide jaotumist sihtkudedesse ja väljutamist kehast. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku mõju *in vivo* asjakohastes tingimustes ja asjakohase kokkupuute korral. *In vivo* hindamine on vähem oluline, kui kemikaali sellised omadused, mis on seotud neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega, on teada. Androgeenisõltuvad koed reageerivad androgeeniga stimuleerimisele kiire ja jõulise kasvuga, eriti enne puberteeti kastreeritud isasrottide puhul. Närlisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast sobib biokatse käesolev versioon, milles kasutatakse enne puberteeti kastreeritud rotte ja viit sihtkude, androgeeni agonistide, antagonistide või 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorite *in vivo* sõelkatseks.
6. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutasid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisestes kui ka laboritevahelistes uuringutes (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on esitatud nii androgeeni kui ka antiandrogeeni määramise meetod.
7. Kuigi testosteroonpropionaadi (TP) doos, mida kasutati antiandrogeenide määramiseks OECD Hershbergeri biokatse valideerimisprogrammis, oli eri laborites erinev (0,2 ja 0,4 mg/kg/päevas, nahaalne süst), ei olnud nende kahe katse-eeskirja versioonide vahel suuri erinevusi nõrga või tugeva antiandrogeense aktiivsuse tuvastamises. Siiski on selge, et TP doos ei tohiks olla liiga kõrge, et takistada nõrkade androgeenireseptori (AR) antagonistide mõju, ega liiga madal, nii et androgeenitundlike kudede kasv on liiga väike isegi ilma antiandrogeeni samaaegse manustamiseta.

## ▼ M5

8. Üksikute androgeenitundlike kudede reaktsioon ei ole siiski täielikult tingitud androgeenist, st ka muud kemikaalid kui androgeeni antagonistid võivad muuta teatavate kudede massi. Mitme koe samaaegne kasv siiski tõendab androgeenispetsiifilist mehhanismi. Näiteks tugevad östrogeenid suures doosis võivad suurendada seemnepõiekeste massi; muud androgeenisõltuvad koed ei reageeri aga sarnasel viisil. Antiandrogeense toimega kemikaalid võivad toimida kas androgeenireseptori antagonistidena või 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitoritena. 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorid on mitmesuguse mõjuga, kuna muundamine tugevama toimega dihidrotestosterooniks on eri kudedes erinev. Antiandrogeenidel, nagu finasteriid, mis inhibeerivad 5 $\alpha$ -reduktaasi, on suurem mõju ventraalses eesnäärmes kui muudes kudedes, kui võrrelda sellise androgeenireseptori tugeva antagonistiga nagu flutamiid. Seda erinevust kudede reaktsioonis võib kasutada androgeenireseptorist sõltuva ja 5 $\alpha$ -reduktaasist sõltuva toime eristamiseks. Lisaks sellele on androgeenireseptor evolutsiooniliselt suguluses muude steroidhormoonide retseptoritega, ja kui mõnda muud hormooni manustatakse suures, füsioloogilist taset kaugelt ületavas doosis, võib see siduda end retseptoriga ja toimida testosteroonpropionaadi põhjustatava kasvu stimuleerimise antagonistina (13). Lisaks on ka usutav, et tõhustatud steroidide metabolism ja sellest tingitud seerumi testosteroonisalduse vähenemine võib vähendada androgeenisõltuvate kudede kasvu. Seepärast tuleb Hershbergeri biokatse positiivse tulemuse hindamisel tavaliselt lähtuda sellest, kui kaalukad on tõendid, sealhulgas *in vitro* katsed, nagu androgeenireseptori ja östrogeenireseptori sidumise katsed ja vastavad transkriptsiooni aktivatsiooni katsed või muud *in vivo* katsed, millega uuritakse sarnaseid androgeeni sihtkudesid, nagu isaslooma puberteedikatse, 15-päevane opereerimata täiskasvanud isaslooma katse või 28-päevane või 90-päevane korduvdoosi uuring.
9. Kogemused näitavad, et ksenobiootilisi androgeene esineb harvemini kui ksenobiootilisi antiandrogeene. Seepärast eeldatakse, et Hershbergeri biokatset kasutatakse kõige sagedamini antiandrogeenide leidmise sõelkatseks. Androgeenide tuvastamise katset võib sellele vaatamata siiski soovitada steroidsete või steroidisarnaste kemikaalide või selliste kemikaalide puhul, mille võimaliku androgeense mõju kohta on saadud viiteid meetoditega, mis on kontseptuaalse raamistiku (2. liide) 1. või 2. tasemel. Sarnaselt sellega võib (anti)androgeense profiiliga seotud kahjulikke mõjusid leida 5. taseme uuringutega, mistõttu tuleb hinnata, kas kemikaal toimib endokriinse mehhanismi kaudu.
10. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (17).
11. Nagu iga biokatse puhul, milles kasutatakse katseloomi, tuleb hoolikalt kaaluda, kas uuringut on üldse vaja teha. Sellise otsuse tegemiseks võib põhimõtteliselt olla kaks põhjust:
- suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase) või kaudsed andmed kemikaali (anti)androgeensuse kohta *in vitro* katsetest (2. tase), mille tõttu on vaja täiendavalt uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
  - (anti)androgeensusele osutav mõju 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja on vaja täiendavaid uuringuid konkreetse toimeviisi selgitamiseks, näiteks tõendamiseks, et mõju aluseks on (anti)androgeenne mehhanism.

## ▼ M5

12. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

13. Hershbergeri biokatse on tundlik, kuna selles kasutatakse isasloomi, kelle endogeense androgeeni nõristumine on minimaalne. See saavutatakse kastreeritud isasloomade kasutamisega tingimusel, et pärast kastreerimist on möödunud piisavalt aega ning sihtkoed on taandarenenud miinimumini ja arvestatakse ühesugust nulljoonele vastavat massi. Seega on võimaliku androgeense toime avastamise sõeluuringu tegemisel veres ringleva endogeense androgeeni sisaldus madal, hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg ei suuda seda tagasisidemehhanismide kaudu kompenseerida, kudede võime androgeenile reageerida on viidud maksimumini ja lähtekoe mass miinimumini. Võimalike antiandrogeenide otsimisel võib saavutada kooskõlalisema kudede massi suurenemise, kui kudesid stimuleeritakse võrdlusandrogeeniga. Selle tulemusel on Hershbergeri biokatses vaja ainult 6 looma doosirühma kohta, samal ajal kui muudes katsetes opereerimata puberteedialiste või täiskasvanud isasloomadega soovitatakse kasutada 15 isasloomi igas doosirühmas.
14. Isasrottide puberteedilähedane kastreerimine peaks toimuma asjakohasel viisil, heakskiidetud anesteetikumide ja aseptilise tehnika kasutamisega. Esimese paari päeva jooksul pärast operatsiooni tuleks manustada valuväigisteid, et kõrvaldada operatsioonijärgseid vaevusi. Kastreerimine suurendab katsemeetodi täpsust nõrkade androgeenide ja antiandrogeenide avastamisel, kuna kõrvaldab kompenseerivad sisesekretsioonisüsteemi tagasisidemehhanismid, mis on olemas opereerimata katseloomas ja mis võivad nõrgendada manustatavate androgeenide ja antiandrogeenide mõju, ning kõrvaldab samuti eri isasrottide testosteroonitaseme suured erinevused seerumis. Seega vähendab kastreerimine loomade arvu, mida on vaja endokriinse mõju tuvastamiseks sõeluuringuga.
15. Sõeluuringuga võimaliku androgeense toime leidmiseks manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondiga või nahaaluse süstiga kümnel järjestikusel päeval. Uuritavat kemikaali manustatakse vähemalt kahe doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline suurenemine uuritavat kemikaali saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse kandeainet, näitab, et uuritav aine on võimaliku androgeense toime suhtes positiivne (vt punkt 60). Sellised androgeenid nagu trenboloon, mida ei ole võimalik 5 $\alpha$  — taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le (*levator ani-bulbocavernosus*) ja GP-le (*glans penis*) kui testosteroonpropionaat, kuid kõigi kudede juures peaks näha olema intensiivsemat kasvu.
16. Võimaliku antiandrogeense aktiivsuse otsimisel sõelkatsetega manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondi või naha alla süstimisega kümnel järjestikusel päeval koos testosteroonpropionaadi igapäevase manustamisega (0,2 või 0,4 mg/kg/päevas) nahaluste süstide abil. Valideerimisprogrammiga tehti kindlaks, et võib kasutada kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas, kuna mõlema doosiga sai avastada antiandrogeene ja sellepärast tuleks katses kasutamiseks valida ainult üks nendest doosidest. Erinevaid uuritava kemikaali doose manustatakse vähemalt kolme doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline vähenemine uuritavat kemikaali ja testosteroonpropionaati saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse ainult testosteroonpropionaati, näitab, et uuritav aine on võimaliku antiandrogeense toime suhtes positiivne (vt punkt 61).

▼ **M5****MEETODI KIRJELDUS****Liikide ja liinide valimine**

17. Hershbergeri biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et roti ja hiire reaktsioon võib olla sarnane, on roti 70-aastase kasutamise põhjal kujunenud rott Hershbergeri biokatse eelistatud loomaliigiks. Lisaks sellele, kuna Hershbergeri biokatse tulemus võib olla pikema, mitut põlvkonda hõlmava uuringu eelkatse, võimaldab see kasutada mõlemas uuringus sama liigi ja liini ning samast allikast pärinevaid loomi.
18. Käesoleva katse-eeskirja kohaselt lubatakse laboril valida katse kasutamiseks sellise liini rott, keda osalevas laboris on varem tavaliselt kasutatud. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate rotiliinide loomi, kuid siiski ei tuleks kasutada liine, mille isasloomad küpsevad oluliselt hiljem kui 42 päeva vanuselt, kuna nende loomade kastreerimine 42. päeval võib takistada suguti pea massi määramist, mida saab teha alles pärast seda, kui eesnähk on eraldunud peenise tüve küljest. Seega ei tuleks kasutada liine, mis pärinevad Fisher 344 rottidest, või teha seda üksnes harvadel juhtudel. Fisher 344 rottidel on seksuaalse küpsemise ajastus teistsugune kui sagedamini kasutatavatel Sprague Dawley või Wistari liini rotid (16). Kui tuleb kasutada sellist liini, tuleks need kastreerida veidi kõrgemas vanuses ja labor peab suutma näidata, et kasutatav liin on tundlik. Labor peaks selgelt põhjendama, miks valiti konkreetse liini rotid. Kui söeluuring võib olla korduva suukaudse doosi, reproduktiivtoksilisuse, arenguhäireid põhjustava toksilisuse või pikaajalise toksilisuse uuringu eelkatse, tuleks kõigis uuringutes eelistatavalt kasutada samast liinist ja samalt tarnijalt saadud loomi.

**Pidamis- ja söötmingimused**

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kõikidele kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning rangemad kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt ei peaks olema üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Rühmas pidamine on eelistatav isoleerimisele, arvestades loomade noorust ja asjaolu, et rotid on seltsingulised loomad. Kahe või kolme looma paigutamine puuri võimaldab vältida liigset asustustihedust ja sellega seotud stressi, mis võib mõjutada paljunemisfunktsiooniga seotud kudede arengut. Puurid tuleb hoolikalt puhastada võimalikest saasteainetest; puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Sobiva suurusega puuris (ca. 2 000 ruutsentimeetrit) ei ole loomad liiga tihedalt.
21. Iga loom peab olema humaansel viisil eraldi märgistatud (nt kõrvamärk või lipik). Kasutatud märgistamismeetod tuleks kirjeldada.

## ▼ M5

22. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Hershbergeri biokatset tegev labor peaks kasutama tavalist sööta, mida tavaliselt kasutatakse kemikaalide katsetamise uuringute puhul. Biokatse valideerimisuurinus ei täheldatud mõju või varieeruvust, mille põhjuseks oleks tulnud pidada sööta. Kasutatud sööt tuleks kirjeldada ja laborisööda proov tuleks säilitada võimaliku tulevase analüüsi jaoks.

**Androgeenisõltuvate organite masside kasutatavuse kriteeriumid**

23. Valideerimisuuringu ajal ei saadud tõendeid, et kehamassi vähenemine oleks mõjutanud sihtkudede (st käesolevas uuringus kaalutavate kudede) massi suurenemist või vähenemist.
24. Valideerimisprogrammis edukalt kasutatud eri liinide hulgas on androgeenisõltuvate organite mass suurema kehamassiga rotiliinide puhul suurem kui väiksema kehamassiga rottidel. Hershbergeri biotesti kehtivuse kriteeriumid ei hõlma seega elundite oodatavat absoluutset massi positiivsetes (doosi)rühmades ja negatiivsetes kontrollrühmades.
25. Kuna koe puhul on variatsioonikordaja (CV) pöördvõrdeline statistilise võimsusega, siis Hershbergeri biokatse kasutatavuse kriteeriumid põhinevad iga koe puhul lubataval maksimaalsel CV väärtusel (tabel 1). CV väärtused tulenevad OECD valideerimisuuringutest. Negatiivse tulemuse korral peaks labor uurima kontrollrühma ja suure doosiga rühma CV-sid ja tegema kindlaks, kas kasutatavuse jaoks lubatava maksimaalse CV kriteerium on ületatud.
26. Uuringut tuleks korrata, kui: 1) kontrollrühma ja suure doosi rühmade kümnest võimalikust eraldi CV-st on kolm või enam suuremad agonisti ja antagonistu uuringute jaoks esitatud väärtustest tabelis 1 ning 2) vähemalt kaks sihtkude olid marginaalselt ebaolulised, st  $p$  väärtused on vahemikus 0,05–0,10. <sup>(1)</sup>

Tabel 1

**Maksimaalsed lubatavad CVd, mis on kastraatmudelil määratud paljunemisfunktsiooniga seotud sihtkudede jaoks OECD valideerimisuurinus <sup>(1)</sup>**

Kude	Antiandrogeensed mõjud	Androgeensed mõjud
Seemnepõiekesed	40 %	40 %
Ventraalne eesnääre	40 %	45 %
Levator ani-bulbocavernosus	20 %	30 %
Cowperi näärmed	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

<sup>(1)</sup> CV künnisväärtus teatava koe jaoks määrati CV väärtuste graafikult, millele olid kantud kõikide valideerimisuuringute konkreetse mudeliga (agonist või antagonist) leitud keskvaartuste CV-d järjestatuna väikseimast suurimani. CV künnisväärtuseks loeti punkt, mille juures CV-väärtuste suurenemised järgmiste kõrgemate CV-de suunas muutusid järsult suuremaks kui mõne eelneva CV vahel — see loeti murdepunktiks. Tuleks märkida, et kuigi selle analüüsiga leiti suhteliselt usaldusväärsed murdepunktid katse antagonistide mudeli puhul, olid agonistide mudeli CV kõverad ühtlasemate suurenemistega väärtuste vahel, mistõttu künnisväärtuse CV leidmine selle meetodiga oli mõnevõrra meelevaldne.

▼ **M5****KATSE KORRALDUS****Õigusnormidele vastavus ja labori valideerimine**

27. Erinevalt uterotroofsest katsest (käesoleva lisa peatükk B.54) ei ole Hersbergeri katse puhul enne katse alustamist vaja tõendada labori pädevust, kuna paralleelselt tehakse positiivset kontrollkatset (testosteroonpropionaat ja flutamiid) ja negatiivset kontrollkatset, mis on katse lahutamatud osad.

**Loomade arv ja seisund**

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma. See kehtib nii androgeense kui ka antiandrogeense katse-eeskirja kohta.

**Kastreerimine**

29. Pärast loomade saamist peaks olema esialgne kohanemisperiood mitu päeva, et veenduda, et loomad on hea tervise juures ja tunnevad end hästi. Kuna enne 42 päeva vanuseks saamist (PND 42) kastreeritud loomadel ei tarvitse eesnähk eralduda, tuleks loomad kastreerida 42. päeval või hiljem, mitte varem. Loomad kastreeritakse narkoosi all; munandikotti tehakse sisselõige, kõrvaldatakse mõlemad munandid ja munandimanused ning veresooneid ja seemnejuhad ligeeritakse. Kui on kindlaks tehtud, et verejooksu ei ole, tuleks munandikott sulgeda õmbluse või klambritega. Loomadele tuleks esimestel päevadel pärast operatsiooni anda valuvaigistit, et leevendada operatsioonijärgseid ebamugavusi. Kui loomade tarnijalt ostetakse kastreeritud loomad, teatab tarnija loomade vanuse ja seksuaalse küpsuse staadiumi.

**Kohanemine pärast kastreerimist**

30. Loomadel tuleks lasta jätkata kohanemist laboritingimustega vähemalt 7 päeva pärast kastreerimist, et sihtkoed saaksid taandareneda (nende mass väheneb). Loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik haiguse või kehaliste kõrvalkallate märkidega loomad tuleks kõrvaldada. Dooside manustamist uuringu tegemiseks saab alustada kõige varem seega 49. päeval pärast sündimist (PND 49), seda ei tohiks alustada hiljem kui päeval PND 60. Vanus lahkamise ajal ei tohiks olla suurem kui PND 70. Selline paindlikkus lubab laboril oma katseid tõhusalt planeerida.

**Kehamassi ja juhuvaliku alusel rühmadesse jagamine**

31. Loomade kehamassi erinevused põhjustavad keha kudede massi varieeruvust nii rühma sees kui ka rühmade vahel. Suurem koemasside varieeruvus suurendab variatsioonikordajat (CV) ja vähendab katse statistilist võimsust (mida nimetatakse mõnikord katse tundlikkuseks). Seepärast tuleks kehamassi varieeruvust hoida nii eksperimentaalselt kui ka statistiliselt kontrolli all.
32. Eksperimentaalne kontrolli all hoidmine hõlmab kehamassi varieeruvuse võimalikult väiksena hoidmist nii katserühma piires kui ka rühmade vahel. Kõigepealt tuleks vältida ebatavaliselt väikseid või suuri loomi ja neid ei tuleks võtta uuritavate loomade hulka. Katse alguses ei tohiks loomade kehamassi varieeruvus olla suurem kui  $\pm 20\%$  keskmisest kehamassist (nt  $175 \text{ g} \pm 35 \text{ g}$  kastreeritud puberteedilähedases vanuses rottide puhul). Teiseks, loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Kasutatud randomiseerimismeetodit tuleb kirjeldada.



▼ **M5**

33. Kuna kemikaali mürgisus võib vähendada kehamassi doosirühmades, võrreldes kontrollrühmaga, võiks statistilise kaasmuutujana kasutada kehamassi uuritava kemikaali manustamise esimesel päeval, mitte kehamassi lahkamise ajal.

**Dooside manustamine**

34. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla androgeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ning positiivsest kontrollrühmast ja kandeaine (negatiivsest) kontrollrühmast (vt punkt 43); seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale androgeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Antiandrogeense toime uurimiseks manustatakse uuritavat kemikaali koos võrdluseks kasutatava androgeeniagonistiga. Tuleks kasutada vähemalt kolme uuritava kemikaali erineva doosiga katserühma (doosirühmad) ning positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli rühma (vt punkt 44). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb kontrollrühmale manustada kandeainet suurimas doosirühmade puhul kasutatud mahus.

35. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Suurima doosi puhul tuleb kõigepealt arvesse võtta LD<sub>50</sub> väärtust ja/või teavet ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi või ebamugavusi (17, 18, 19, 20), ja teiseks olemasolevat teavet dooside kohta, mida on kasutatud subkroonilise ja kroonilise toksilisuse uuringutes. Üldiselt ei tohiks suurim doos põhjustada kehamassi vähenemist katse lõpuks mitte rohkem kui 10 % kontrollrühma loomade massist. Suurim doos peaks olema kas: 1) suurim doos, mis tagab loomade ellujäämise ja mis ei põhjusta erilist mürgistust või kannatusi loomadele pärast manustamist 10 järjestikusel päeval doosis kuni 1 000 mg/kg/päevas (vt punkt 36) või 2) doos, mis põhjustab (anti)androgeenset toimet, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kuna see on sõelkatse, siis võib kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (vt punkt 37).

**Piirdoosi tase**

36. Kui katse piirdoosiga 1 000 mg/kg/päevas ja väiksema doosiga vastavalt käesolevas eeskirjas kirjeldatud korrale ei tekita statistiliselt olulist muutust reproduktiivorganite massis, võib täiendavaid doositasemeid pidada mittevajalikuks. Sellist piirdoosi väärtust kasutatakse alati, välja arvatud sellised juhud, kui inimese kokkupuute andmed viitavad vajadusele kasutada kõrgemat doositaset.

**Vahemiku leidmise kaalutlused**

37. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks, et valida sobivad doosirühmad (kasutades ägeda mürgisuse tuvastamise katseid (käesoleva lisa peatükid B.1b, B.1c (27), OECD katse-eeskiri 425 (19))). Hershbergeri biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise, ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kümnel järjestikusel päeval piirdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas, nagu

▼ **M5**

on märgitud punktides 35 ja 36. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti (17), milles on määratletud mürgistusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib koed pärast 10-päevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võib seejärel kasutada põhiuurimuses kasutatavate dooside valimise hõlbustamiseks.

**Võrdluskemikaalid ja kandeaine**

38. Võrdluseks kasutatav androgeeniagonist peaks olema testosteroonpropionaat (TP), CASi nr 57-82-5. Võrdlus-TP doos võib olla kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas. Võrdluseks kasutatav androgeeniantagonist peaks olema flutamiid (FT), CASi nr 1311-84-7. Võrdlus-FT doos peaks olema 3 mg/kg/päevas ja FT tuleks manustada koos võrdlus-TP doosiga.
39. Soovitav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna paljud androgeensed ligandid või nende metaboolsed eellased on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökonsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peaksid olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealivoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused, olles hoolikas, et vältida proovide saastumist või rikkumist.

**Dooside manustamine**

40. TP-d tuleks manustada nahaaluse süstiga ja FT-d suukaudse sondiga.
41. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudse sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaoluga seotud kaalutlusi ning uuritava kemikaali füüsikalisi ja keemilisi omadusi. Lisaks tuleb arvestada toksikoloogilisi aspekte, nagu kokkupuuteviisi asjakohasus inimese kemikaaliga kokkupuute seisukohast (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid — sissehingamisele või imendumisele naha kaudu), ning olemasolevaid toksikoloogilist teavet ja andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral), enne kui süstimise teel saadud positiivse tulemuse põhjal algatatakse ulatuslik pikaajaline uuring.
42. Loomadele tuleks doose manustada samal viisil ja sama ajakava kohaselt 10 järjestikusel päeval umbes 24-tunniste vaheaegadega. Doosi suurust tuleks kohandada iga päev, arvestades igapäevaseid kehamassi määramise andmeid. Igal doosi manustamise päeval tuleks kirja panna doosi maht ja manustamise kellaaeg. Tuleb jälgida, et ei ületataks maksimaalset doosi, mida on kirjeldatud punktis 35, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid. Tuleks kasutada suukaudset sondi, maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Vedeliku suurim kogus,

**▼ M5**

mida saab ühel korral manustada, sõltub katseloomade suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus võib kasutada mahtu kuni 10 ml kehamassi kg kohta. Nahaaluse süstiga manustamisel tuleks doose manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõelaga (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljajumbumine või doosi mittetäielik manustamine. Päevas rotile süstitav vedelikukogus ei tohiks ületada 0,5 ml kehamassi kg kohta.

**Androgeeniagonistide katsete tegemise meetodid**

43. Androgeeniagonistide katsetes on kandeaine negatiivne kontroll ja TP-d saav rühm on positiivse kontrolli rühm. Androgeeniagonistide omast bioloogilist toimet kontrollitakse uuritava kemikaali manustamisega katserühmadele valitud doosis 10 järjestikuse päeva jooksul. Kemikaali saanud katserühma loomade paljunemise funktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse kandainet saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi suurenemine.

**Androgeeni antagonistide ja 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorite katsete tegemise meetodid**

44. Androgeeni antagonistide ja 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorite katsetes on TP-d saav rühm negatiivne kontroll ja rühm, mille loomadele manustatakse korraga TP-d ja FT-d, on positiivne kontroll. Androgeeni antagonistide ja 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitoritega seotud bioloogilist toimet kontrollitakse TP võrdlusdoosi ja uuritava kemikaali manustamisega 10 järjestikuse päeva jooksul. TP-d ja kemikaali saanud katserühma loomade paljunemise funktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse ainult TP-d saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi vähenemine.

**VAATLUSED****Kliinilised vaatlused**

45. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul tuleks jälgida suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).
46. Surmana leitud loomad tuleks kõrvaldada ning hävitada ilma täiendava andmete analüüsita. Iga looma surm enne lahangut tuleks kanda katseprotokollis koos surma võimalike põhjustega. Kõik suremas olevad loomad tuleks humanseelt surmata. Iga suremas olnud ja hiljem eutanaasia teel surmatud loom tuleks kanda katseprotokollis ja esitada haiguse võimalikud põhjused.

▼ **M5****Kehamass ja sööda tarbimine**

47. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumise järgi. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

**Lahkamine ning kudede ja organite massi mõõtmine**

48. Ligikaudu 24 tundi pärast uuritava kemikaali viimase doosi manustamist tuleks rotid humaanselt surmata ja lasta verest tühjaks joosta vastavalt katset tegeva labori tavalisele korrale ning teha lahkamine. Humaanse surmamise meetod tuleks esitada katseprotokollis.
49. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamine teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid mõjutada. Kõik lahkamise tähelepanekud, nagu patoloogilised muutused või nähtavad kahjustused, tuleks üles märkida ja esitada protokollis.
50. Viis androgeenisõltuvat kude (VP, SV, LABC, COW, GP) tuleks kaaluda. Need koed tuleks välja lõigata, hoolikalt vabastada liigsetest nende külge kinnitunud kudedest ja rasvast ning määrata nende värske (fikseerimata) mass. Iga kude tuleks käidelda eriti hoolikalt, et vältida vedelike kaotust ja kuivamist, mis võib põhjustada suuri vigu ja varieeruvust, kuna väheneb registreeritav mass. Mõned koed võivad olla väga väikesed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Seepärast on oluline, et paljunemise funktsiooniga seotud kudede eraldamist sooritav isik tunneks nende kudede eraldamise tavalist korda. Standardse töökorra (SOP) käsiraamatu saab OECD-lt (21). Uuringu tulemuste võimalikku varieeruvust saab vähendada SOP juhendialase hoolika koolitusega. Ideaaljuhul peaks teatava konkreetse koe eraldamisi tegema sama isik, et vähendada isikutevahelisi erinevusi kudede töötlemisel. Kui see ei ole võimalik, peaks lahkamine olema korraldatud nii, et iga lahkaja eraldab teatavat kude kõigi katserühmade loomadelt, mitte nii, et üks isik eraldab kõik koed kontrollrühma loomadelt ja teine isik doosirühmade loomadelt. Iga paljunemise funktsiooniga kude tuleks ilma kuivaks pühkimata kaaluda 0,1 mg täpsusega ja iga looma kudede massid tuleb registreerida.
51. Mõned koed võivad olla väga väikesed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Varasema tööga on leitud variatsioonikordajate (CV) vahemik, mis näib olevat erinev ja näib sõltuvat labori pädevuse tasemest. Mõnel juhul on täheldatud kudede, nagu VP ja COW, absoluutmasside suuri erinevusi samas konkreetsetes laboris.
52. Soovi korral võib määrata ka maksa massi, mõlema neeru massi (koos) ja mõlemate neerupealiste massi (koos). Koed tuleks ka sel puhul vabastada nendega ühendatud sidekirmetest ja rasvast. Maks tuleks kaaluda täpsusega 0,1 g, mõlemad neerud ja mõlemad neerupealised — täpsusega 0,1 mg ning need andmed registreerida. Maksa, neerud ja neerupealised ei mõjuta mitte üksnes androgeene; need elundid annavad kasulikku teavet ka süsteemse mürgisuse kohta.

## ▼ M5

53. Soovi korral võib mõõta luteiniseeriva hormooni (LH), folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja testosterooni (T) sisalduse seerumis. Testosteroonisisaldust seerumis on kasulik määrata siis, kui uuritav kemikaal põhjustab testosterooni metabolismi maksas ja vähendab seerumi testosteroonisisaldust. Kui selliseid T andmeid ei ole, võib näida, et mõju avaldub antiandrogeense mehhanismi kaudu. LH tase annab teavet antiandrogeeni omaduse kohta mitte ainult vähendada elundite massi, vaid mõjutada ka hüpotalamuse-ajuripatsi funktsioone, mis pikaajalises katses võib tekitada munandikasvajaid. FSH on oluline hormoon spermatogeneesi jaoks. Võib määrata ka seerumi T4 ja T3 sisalduse; see võib anda kasulikku lisateavet kemikaali võime kohta häirida kilpnäärme homöostaasi. Kui tehakse hormoonide mõõtmisi, tuleks rotid enne lahkamist tuimastada ja võtta neilt veri südame punktsiooniga; narkoosimeetod tuleks valida hoolikalt, et mitte mõjutada hormoonitaseme mõõtmisi. Seerumi valmistamise meetod, radioimmuunanalüüsi- või muude mõõtmiskomplektide päritolu ja tulemused tuleks registreerida. LH ja T sisaldus esitatakse ng-des seerumi ml kohta.
54. Kudede eraldamisel tuleb tugineda üksikasjalikele fotodega lahkamisjuhenditele, mis on avaldatud valideerimisprogrammi osana kui lisamaterjal (21). Korea toidu- ja ravimiameti veebisaidil on kättesaadav ka lahkamist käsitlev video (22).
- Looma keha pannakse lauale kõhuga ülespoole ja tehakse kindlaks, kas suguti eesnähk on eraldunud suguti peast. Kui see on nii, tõmmatakse eesnähk tagasi, eemaldatakse suguti pea ja kaalutakse see 0,1 mg täpsusega; mass registreeritakse.
  - Avatakse kõhunähk ja kõhuõõne sein, paljastatakse siseelundid. Kui tuleb määrata soovi korral määratavate elundite mass, eemaldatakse ja kaalutakse maks täpsusega 0,1 g, eemaldatakse magu ja soolestik, eemaldatakse ja kaalutakse neerud (koos) ja neerupealised (koos) täpsusega 0,1 mg. Sellise lahkamisega paljastatakse kusepõis ja jõutakse isaslooma paljunemiskõhuga seotud kudede eraldamiseni.
  - Ventraalse eesnäärme eraldamiseks eraldatakse kusepõis kõhulihaste kihist, milleks lõigatakse läbi sidekude piki keskjoont. Kusepõis nihutatakse ettepoole seemnepõiekeste suunas, millega paljastatakse ventraalse eesnäärme (*ventral prostate*, VP) vasak ja parem sagar (mida katab rasvakiht). Rasv pühitakse ettevaatlikult VP vasakult ja paremalt sagaralt. VP parem sagar tõstetakse kusiitilt ja eraldatakse sagar kusiitist. Hoides VP paremat sagarat, tõstetakse VP vasak sagar kusiitilt ja eraldatakse; kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
  - Seemnepõiekeste ja koagulatsiooninäärmete (*seminal vesicles plus coagulating glands*, SVCG) eraldamiseks lükatakse põis saba poole, millega paljastatakse seemnejuhad ning SVCG parem ja vasak sagar. Vedeliku lekke ärahoidmiseks pannakse verejooksu sulgemise klamber SVCG lähtekohale, kus seemnejuha ühineb kusiitiga. SVCGd eraldatakse ettevaatlikult, hoides klambrit oma kohal, lõigatakse ära rasv ja manused, pannakse teadaoleva massiga kaalumiskõõnusse, eemaldatakse klamber, kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja registreeritakse mass.

▼ **M5**

- Selleks et eraldada *levator ani* ja *bulbocavernosus* (LABC) lihased, paljastatakse suguti alus ja lihased. LA lihased ümbritsevad käärsoolt, samal ajal kui eesmised LA ja BC lihased on kinnitunud suguti sibulale. Perianaalse piirkonna nahk ja manused, mis ulatuvad peenise lähteko-  
hast kuni päraku eesmise otsani, eemaldatakse. BC lihased eraldatakse järk-järgult suguti sibulast ja kudedest. Käärsool lõigatakse pooleks ja nüüd saab eraldada ja kõrvaldada kogu LABC. LABC tuleks puhastada rasvast ja manustest, kaaluda 0,1 mg täpsusega ja registreerida mass.
  - Kui LABC on eemaldatud, tulevad nähtavale ümmargused Cowperi või bulbouretraalnäärmed (COW) suguti sibula lähtekoha juures, veidi selja poole. Lõigata tuleb hoolikalt, et vältida õhukese kesta läbitorkamist ja vedeliku väljavoolu. COW (koos) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
  - Lisaks, kui lahkamise või kudede eraldamise ajal voolas mõnest näär-  
mest vedelikku välja, tuleks see registreerida.
55. Kui ühe kemikaali hindamiseks on vaja lahata rohkem loomi, kui ühe päevaga on võimalik lahata, võib uuringu alguse jaotada kahele järjestiku-  
sele päevale, millega ka lahkamine ja sellega seotud tööd jaotuvad kahele päevale. Kui töö jaotatakse niimoodi järkudesse, tuleks ühel päeval kasutada pooled iga doosirühma loomadest.
56. Kehad tuleks pärast lahangu kõrvaldada sobival viisil.

**PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

57. Andmed tuleks esitada eraldi iga looma kohta (kehamass, paljunemisfunk-  
siooniga seotud kudede mass, soovi korral tehtud täiendavad mõõtmised, muud toimed ja tähelepanekud) ja iga loomarühma kohta (arvutatakse kõikide mõõtmistulemuste keskväärtused ja standardhälbed). Andmed tuleb koondada tabelisse. Tuleks esitada loomade arv katse alguses, katse käigus surnult või mürgistuse tunnustega leitud loomade arv, täheldatud toksilisuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas tunnuste ilmnemise aeg, tunnuste kestus ja raskus.
58. Lõpp-protokollis tuleks esitada järgmine.

*Uurimislabor:*

- nimi ja asukoht;
- uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;
- uuringu alguse ja lõpetamise kuupäev, st uuritava kemikaali manusta-  
mise esimene päev ja viimane lahkamispäev.

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, nimetus, puhtus, tarnija täielik aadress ja uuritava  
kemikaali täielik iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod, sagedus ja lahuste hoiutingimused;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste või -suspensioonide analüüsid.

▼ M5*Kandeaine:*

- kandeaine iseloomustus (nimetus, tarnija ja partii nr);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

*Katseloomad ja nende pidamise tingimused:*

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- päritolu või tarnija, kaasa arvatud täielik aadress;
- tarnitud loomade arv ja vanus;
- pidamistingimused (temperatuur, valgustus jne);
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, partii number, koostis ja, kui on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puuridesse paigutamise tingimused ja loomade arv puuris.

*Katse tingimused:*

- vanus kastreerimise ajal ja kohanemise kestus pärast kastreerimist;
- iga looma mass katse alguses (täpsusega 0,1 g);
- kasutatud randomiseerimismeetod ning kandeaine rühma, võrdlusrühma, uuritava kemikaali rühmadesse ja puuridesse määramise andmed;
- iga rühma loomade kehamassi keskväärts ja standardhälve igal kaalumispäeval kogu uuringu kestel;
- doosi valimise põhjendused;
- uuritava kemikaali manustamise tee ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- antiandrogeensuse katse tegemisel TP manustamine (doos ja maht);
- uuritava kemikaali manustamine (doos ja maht),
- manustamise aeg;
- lahkamise kord, sealhulgas veretustamise vahendid ja kasutatud anesteetikumid;
- seerumianalüüside tegemise korral tuleks esitada meetodi üksikasjad. Näiteks, kui kasutatakse radioimmuunanalüüsi (RIA), tuleks esitada järgmine: RIA tegemise kord, RIA komplektide tootja, RIA komplektide aegumise kuupäev, sädearvestuse kord ja standardimine.

*Tulemused*

- Igapäevased tähelepanekud iga looma kohta dooside manustamise ajal, sealhulgas:
  - kehamass (täpsusega 0,1 g);
  - kliinilised tunnused (kui neid esineb);
  - kõik andmed ja tähelepanekud sööda tarbimise kohta.
- Lahkamise ajal tehtud tähelepanekud iga looma kohta, sealhulgas:

**▼ M5**

- lahkamise kuupäev;
- doosirühm;
- looma identifitseerimisnumber;
- lahkaja;
- lahangu ja kudede eraldamise kellaaeg;
- looma vanus;
- lõplik kehamass lahkamise ajal; märkida iga statistiliselt oluline suurenemine või vähenemine;
- loomade veretustamise ja lahkamise järjekord;
- viie androgeenisõltuva sihtkoe mass;
- ventraalne eesnääre (täpsusega 0,1 mg);
- seemnepõiekesed ja koagulatsiooninäärmed, koos vedelikuga (koos, täpsusega 0,1 mg);
- *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste kompleks (täpsusega 0,1 mg);
- Cowperi näärmed (märgkaal, koos, täpsusega 0,1 mg);
- peenise pea (märgkaal täpsusega 0,1 mg);
- soovi korral määratavate kudede kaal, kui määrati:
- maks (täpsusega 0,1 g);
- neerud (koos, täpsusega 0,1 mg);
- neerupealised (koos, täpsusega 0,1 mg);
- Üldised märkused ja kommentaarid
- Seerumihormoonide analüüsid, kui need tehti:
  - seerumi luteiniseeriv hormoon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s) ja
  - seerumi testosteroon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s).
- Üldised märkused ja kommentaarid

*Andmete kokkuvõte*

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, milles näidatakse valimi suurus iga rühma puhul, keskvärtus ja selle standardviga või standardhälve. Tabelites tuleks esitada surmajärgne kehamass, kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass ja soovi korral määratud muude elundite mass.

*Tulemuste arutelu***Tulemuste analüüs**

59. Lahkamise ajal määratud kehamassi ja organite massi tuleks statistiliselt analüüsida ja leida näitajad nagu dispersiooni homogeensus, mille jaoks on andmeid vaja sobivalt teisendada. Doosirühmi tuleks võrrelda kontrollrühmaga, kasutades selliseid meetodeid nagu ANOVA, millele järgnevad paariviisilised võrdlused (nt Dunnetti ühepoolne test) ja statistilise erinevuse kriteerium, näiteks  $p \leq 0,05$ . Tuleb kindlaks teha rühmad, milles on saavutatud statistiline olulisus. Elundite suhtelisi masse kehamassi suhtes tuleks siiski vältida, kuna selline andmetöötlus tugineb väärtudele statistilistele eeldustele.



## ▼ M5

60. Androgeeniagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult kandeainet. Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudedel suhteliselt erinevat toimet; näiteks trenboloon, mida ei saa 5 $\alpha$ -taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le ja GP-le kui TP. Statistiliselt olulist ( $p \leq 0,05$ ) massi suurenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul tuleks lugeda androgeeniagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingisugust kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
61. Androgeeniantagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult võrdlusandrogeeni (ainult testosteroonpropionaati). Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudede suhteliselt erinevat reageerimist; näiteks 5 $\alpha$ -reduktaasi inhibiitorid, nagu finasteriid, mõjutavad tugevamini ventraalset eesnääret kui muid kudesid, võrreldes tugevate androgeenireseptori antagonistidega nagu flutamiid. Statistiliselt olulist ( $p \leq 0,05$ ) massi vähenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul, võrreldes ainuüksi TP-d saanud kontrollrühmaga, tuleks lugeda androgeeniantagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingil määral vähenenud kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
62. Andmed tuleks esitada kokkuvõtiliku tabelina: keskvärtus, keskvärtuse standardviga (sobib ka standardhälve) ja iga rühma valimi suurus. Samuti tuleks lisada üksikandmete tabelid. Tuleks uurida kontrollrühma konkreetseid väärtusi, keskvärtust, keskvärtuse viga (standardhälvet) ja variatsioonikoefitsienti (CV), et teha kindlaks, kas need vastavad varasemate väärtustega koosõla kriteeriumidele. CV väärtused, mis ületavad tabelis 1 (vt punktid 25 ja 26) esitatud CV väärtusi iga organi massi puhul, peaksid näitama, kas andmete lugemisel või registreerimisel on tehtud vigu või kas labor ei ole veel saavutanud androgeenisõltuvate kudede väljalõikamiseks vajalikku meisterlikkust ja vaja oleks täiendavat koolitust või harjutamist. Üldiselt on CV-d (saadakse standardhälbe jagamisel organi massi keskvärtusega) eri laborite ja eri uuringute tulemuste võrdlemisel korratavad. Esitatud andmed peaksid hõlmama vähemalt järgmist: ventraalse eesnäärme, seemnepõiekeste, *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste, Cowperi näärmete, suguti pea, maksa ja keha mass ning kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni. Võib esitada ka parandatud andmed, millesse on kovariatsiooni abil tehtud kehamassi muutumist arvestavad parandid, kuid see ei tohiks asendada korrigeerimata andmete esitamist. Lisaks sellele, kui eesnaha eraldumist (*preputial separation*, PPS) mõnes rühmas ei esine, tuleks registreerida PPS ja võrrelda seda statistiliselt olukorraga kontrollrühmas, kasutades Fisheri täpset testi.

**▼ M5**

63. Arvutisse sisestatud andmete kontrollimisel võrdluses originaalandmete lehtedega tuleb hoolikalt uurida organite kaalu väärtusi, mis ei ole bioloogiliselt usutavad või erinevad rohkem kui kolm standardhälvet vastava katserühma keskväärtusest; sellised andmed tuleb võib-olla välja jätta kui tõenäolised registreerimisvead.
64. Sageli on uuringu tulemuste võrdlemine OECD CV väärtustega (tabel 1) tõlgendamise oluline etapp, mis näitab uuringu tulemuste kehtivust. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemaid andmeid. Samuti tuleks laboris säilitada andmed positiivsete võrdluskemikaalide nagu TP ja FT toime kohta. Laborid võivad perioodiliselt testida ka teadaolevalt nõrkade androgeeniagonistide ja -antagonistide toimet ning säilitada need andmed. Neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate OECD andmetega selle kontrollimiseks, et labori meetodid annavad piisava statistilise täpsuse ja võimsuse.

▼ **M5***1. liide***MÕISTED**

**Androgeenne** – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju androgeenisõltuvate kudede kasvule.

**Antiandrogeenne** – kemikaali võime alla suruda testosteroonpropionaadi toimet imetajate organismile.

**Doos** – manustatav uuritava kemikaali kogus. Hershbergeri biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg kehamassi kg kohta päevas).

**Doseerimine** – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Spetsiifilisus** – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel ei ole katsega kontrollitavat omadust.

**Suremas olev** – termin, millega kirjeldatakse surmaeelses seisundis looma.

**Sünnijärgne päev X** – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

**Sünnikuupäev** – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

**Tundlikkus** – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel on katsega kontrollitav omadus.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Valideerimine** – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

## 2. liide

**Märkus:** dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

## Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

<p><b>Tase 1</b> Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— füüsikalised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus</li> <li>— inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmismahd, heide keskkonda, kasutusviisid</li> <li>— ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed</li> </ul>	
<p><b>Tase 2</b> <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus</li> <li>— Transkriptsiooni aktiveerimine</li> <li>— Aromataas ja steroidogenees <i>in vitro</i></li> <li>— Arüülsüivesinike retseptori äratundmine/sidumine</li> <li>— kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Suure jõudlusega sõeluuringud</li> <li>— Kilpnäärmefunktsioon</li> <li>— Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse</li> <li>— Muud (vastavalt vajadusele)</li> </ul>
<p><b>Tase 3</b> <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Uterotroofne katse (östrogeenid)</li> <li>— Hershbergeri katse (androgeenid)</li> <li>— Hormooni retseptorisõltumatu toime</li> <li>— Muud (nt kilpnääre)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)</li> </ul>
<p><b>Tase 4</b> <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel)</li> <li>— Isas- ja emasloomade puberteedikatsed</li> <li>— Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Kala sugunäärmete histopatoloogia katse</li> <li>— Kullese metamorfoosi katse</li> </ul>
<p><b>Tase 5</b> <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG415)<sup>1</sup></li> <li>— 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG416)<sup>1</sup></li> <li>— reproduktiivsõelumiskatse (tõhustatud TG421)<sup>1</sup></li> <li>— kombineeritud 28 päeva / reproduktiivsõelumise katse (tõhustatud TG422)<sup>1</sup></li> </ul> <p><sup>1</sup> VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)</li> </ul>

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

▼ **M5****MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE**

*Märkus 1:* kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.

*Märkus 2:* tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.

*Märkus 3:* kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.

*Märkus 4:* iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.

*Märkus 5:* praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.

*Märkus 6:* raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

**KIRJANDUS**

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- 3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. Vt: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- 4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- 5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- 6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- 7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼ **M5**

- 8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671–8.
- 9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413–422.
- 10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- 11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38–44.
- 12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113–119.
- 13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.
- 14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic.* Washington DC: United States Public Health Service.
- 15) Dorfman RI (1969). *Androgens and anabolic agents.* Vt: *Methods in Hormone Research, volume IIA.* (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.
- 16) Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology, volume I.* New York: Humana Press, p 38.
- 17) OECD (2000). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 18) OECD (1982). *Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice,* ISBN 92–64-12367-9, Paris.
- 19) OECD (2008). *Acute oral toxicity — up-and-down procedure.* OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 20) OECD (2001). *Guidance document on acute oral toxicity.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- 22) Korea Food and Drug Administration. *Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video.* [http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education\\_fr.html](http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html).
- 23) OECD (2008). *Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- 24) OECD (2008). *Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.*
- 25) OECD (2009). *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties.* Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼ **M5**

- 26) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 27) Käesoleva lisa järgmised peatükid:
  - B.1a. Äge suukaudne mürgisus — kindla annuse protseduur
  - B.1b. Äge suukaudne mürgisus — ägeda mürgisusastme meetod

▼ M5

**B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.



## ▼ M5

## B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 456 (2011). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. OECD 2002. aasta kontseptuaalses raamistikus sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks on viis taset; igale tasemele vastab erinev bioloogilise keerukuse tase (1). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vitro* H295R-steroidogeneesi katses (H295R) on kasutatud inimese neerupealisevähi rakuliini (NCI-H295R-rakud) ja see vastab 2. taseme „*in vitro* katsele, millega saadakse mehhanistlike andmeid”, mida kasutatakse sõelumiseks ja selleks, et tunnistada kemikaal erilist tähelepanu nõudvaks. Katse väljatöötamine ja standardimine sõelkatseks, mille abil saaks avastada kemikaalide poolt steroidogeneesi, eriti 17 $\beta$ -östradioli (E2) and testosterooni (T) sünteesile avaldatavat mõju, toimus mitmeastmelise protsessina. H295R-katse on optimeeritud ja valideeritud (2, 3, 4, 5).
2. H295R steroidogeneesi katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad E2 ja T sünteesi. H295R-katse on ette nähtud selliste ksenobiootikute leidmiseks, mis mõjutavad raku endogeenseid komponente, millest koosneb kolesteroolist E2 ja/või T sünteesini viiv rakusisene biokeemiline sünteesirada. H295R-katse ei ole ette nähtud selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis mõjutavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsisugunäärmete (HAS) telje kaudu. Katse eesmärk on saada vastus JAH või EI küsimusele, kas kemikaal võib esile kutsuda või pärssida T ja E2 sünteesi; mõnel juhul võib saada aga ka kvantitatiivse tulemuse (vt punktid 53 ja 54). Katse tulemused väljendatakse hormoonide sünteesi suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga. Katse eesmärk ei ole saada konkreetset mehhanismi käsitlevat teavet, kuidas uuritav kemikaal mõjutab sisesekretsioonisüsteemi. Teadlased on uurinud kõnealuse rakuliini abil mõju konkreetsetele ensüümidele ja vahepealsete hormoonide nagu progesterooni sünteesile (2).
3. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites. Üksikasjalik katse-eeskiri, kuidas valmistada lahuseid, kasvatada rakke ja teha muid katse läbiviimiseks vajalikke töid, on esitatud OECD dokumendi 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4) I-III liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

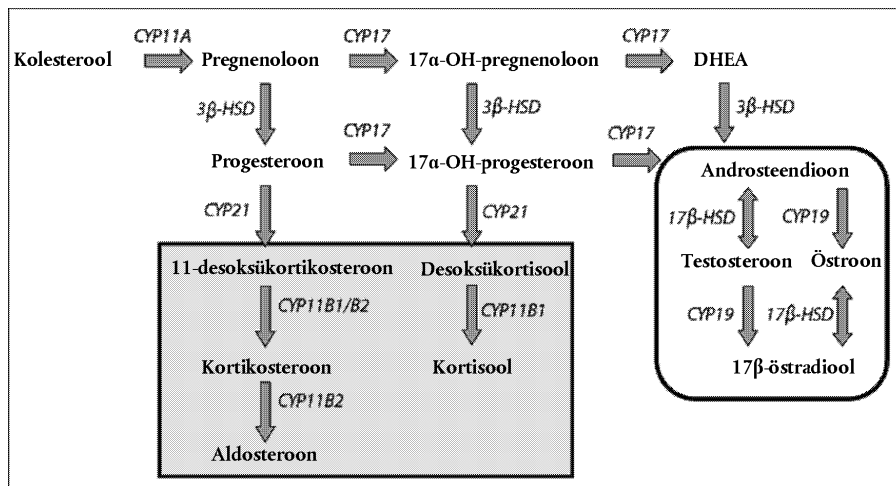
4. Steroidsete suguhormoonide sünteesis osalevad viis ensüümi, mis katalüüsivad kuue steroidse suguhormooni biosünteesi. Kolesterooli ensümaatiline muundamine pregnenolooniks kolesterooli kõrvalahelat lõhustava tsütokroom P450 (CYP) ensüümi (CYP11A) poolt on steroidsete lõppsaadusteni viiva biokeemiliste reaktsioonide rea esimene etapp. Olenevalt kahe järgmise reaktsiooni järgust hargneb steroidogeneesi rada kaheks rajaks, need on  $\Delta^5$ -hüdroksüsterooidide rada ja  $\Delta^4$ -ketosteroidide rada, mis ühinevad taas androsteendiooni sünteesi juures (joonis 1).
5. Androsteendioon muudetakse 17 $\beta$ -hüdroksüsterooiddehüdrogenaasi (17 $\beta$ -HSD) poolt testosterooniks (T). Testosteroon on nii vahesaadus kui ka lõpphormoonsaadus. Isaslooma organismis võib 5 $\alpha$ -reduktaas muundada testosterooni (T) dihidrotestosterooniks (DHT); 5 $\alpha$ -reduktaasi leidub androgeenide sihtkudede, nagu eesnääre ja seemnepõiekesed, rakumembraanides, tuumaümbrises ja endoplasmaatilises retiikulumis. DHT on oluliselt tugevam androgeen kui T ja seda peetakse samuti lõpphormoonsaaduseks. H295R-katse abil ei mõodeta DHT-d (vt punkt 10).

## ▼ M5

6. Steroidogeense raja ensüüm, mis muundab androgeensed kemikaalid östrogeenseteks kemikaalideks, on aromataas (CYP19). CYP19 muundab testosterooni (T) 17 $\beta$ -östradioliks (E2) ja androsteendiooni östrooniks. Hormoone E2 ja T peetakse steroidogeense raja lõppsaadusteks.
7. CYP17 lüaasse aktiivsuse spetsiifilisus vahepealsete substraatide suhtes on loomaliigist. Inimesel eelistab see ensüüm  $\Delta^5$ -hüdroksüsteroidide raja substraate (pregnenolooni), samal ajal kui roti puhul on eelistatud  $\Delta^4$ -ketosteroidide raja substraadid (progesteron) (19). Sellised erinevused CYP17 lüaasses aktiivsuses võivad selgitada mõningaid liigist sõltuvaid erinevusi *in vivo*-reaktsioonis steroidogeneesi mõjutavatele kemikaalidele (6). On näidatud, et H295R-rakud peegeldavad väga hästi täiskasvanud inimese neerupealise ensüümide ekspressiooni ja steroidide sünteesi (20), kuid nendes on ekspresseeritud androgeenide sünteesi nii  $\Delta^5$ -hüdroksüsteroidide kui ka  $\Delta^4$ -ketosteroidide raja ensüümid (7, 11, 13, 15).

Joonis 1

## Steroidogeenne rada H295R-rakkudes



## Märkus

Ensüümid on esitatud kaldkirjas, hormoonid on paksus kirjas ja nooled näitavad sünteesi suunda. Halli taustaga on näidatud kortikosteroidseid rajad ja saadused. Steroidsete suguhormoonide rajad ja saadused on ümbritsetud ringiga. CYP = tsütokroom P450; HSD = hüdroksüsteroiddehüdrogenaas; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Inimese H295R-adrenokartsinoomi rakud on kasulik *in vitro* mudel steroidhormoonide sünteesile avaldatava mõju uurimiseks (2, 7, 8, 9, 10). H295R-rakkudes on ekspresseeritud geenid, milles on kodeeritud eespool steroidogeneesi jaoks olulised ensüümid (11, 15) (joonis 1). See on unikaalne omadus, kuna nende geenide *in vivo* ekspressioon sõltub koest ja arengustaadiumist; tavaliselt ei ole üheski koest ega üheski arengustaadiumis ekspresseeritud kõik steroidogeneesis osalevad geenid (2). H295R-rakkudel on inimloote tsonaalselt diferentseerumata neerupealiserakkude omadused (11). Need rakud kujutavad endast ainulaadset *in vitro*-süsteemi, kuna nad on suutelised sünteesima kõiki täiskasvanute neerupealise koorest ja sugunäärmetes leiduvaid steroidhormoone ning see võimaldab uurida mõju nii kortikosteroidide sünteesile kui ka steroidsete suguhormoonide nagu androgeenide ja östrogeenide sünteesile, kui katse on valideeritud ainult T ja E2 määramiseks. Katsesüsteemiga kindlakstehtud T ja E2 sünteesi muutuste põhjuseks võivad olla uuritava kemikaali mitmesugused mõjud steroidogeneesetele funktsioonidele, mis on ekspresseeritud H295R-rakkudes. Need hõlmavad mõju steroidhormoonide sünteesis, muundamises või kõrvaldamises osalevate ensüümide ekspressioonile, sünteesile või funktsioonidele (12, 13, 14). Hormoonide sünteesi pidurdamist võib põhjustada otsene

▼ **M5**

konkurents sünteesiraja ensüümile sidumise pärast, mõju sellistele kofaktoritele nagu NADPH (nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat) ja cAMP (tsükliline adenosiinmonofosfaat) ja/või steroidide metabolismi kiirendamine või steroidogeneesi raja mõne ensüümi geeni ekspressiooni allasurumine. Kui sünteesi pidurdamist võib põhjustada hormoonisünteesis osalevate protsesside otsene või kaudne mõjutamine, siis sünteesi indutseerimine on tavaliselt seotud kaudse mõjuga, nagu kofaktorite (nt NADPH, cAMP) mõjutamine (see toimub forskoliini puhul), steroidide metabolismi vähendamine (13) ja/või steroidogeenide geenide ekspressiooni suurendamine.

## 9. H295R-katsel on rida eeliseid:

- see võimaldab kindlaks teha nii T ja E2 sünteesi suurenemist kui ka vähenemist;
- see võimaldab otse hinnata kemikaali võimalikku mõju raku eluvõimele või tsütotoksilisust. See on oluline, kuna see võimaldab eristada tsütotoksilisusest tingitud mõju sellisest mõjust, mis tuleneb kemikaalide otsesest toimest steroidogeensetele radadele; selline eristamine ei ole võimalik koeeksplantaatide korral, milles on palju eri tundlikkuse ja eri funktsioonidega rakutüüpe;
- meetod ei nõua loomade kasutamist;
- rakuliin H295R on kaubanduslikult kättesaadav.

## 10. Katsemeetodi peamised piirangud on järgmised:

- rakkude metaboliseerimisvõime ei ole teada, kuid on tõenäoliselt üsna piiratud; seepärast jäävad selle katsega tõenäoliselt avastamata kemikaalid, mida on vaja metabolismi kaudu aktiveerida;
- kuna H295R-rakud on saadud neerupealiste koest, on neis olemas ensüümid, mis võivad sünteesida glüko- ja mineraalkortikoide, samuti suguhormoone; seetõttu võib mõju glüko- ja mineraalkortikoidide sünteesile mõjutada katses täheldatavat T ja E2 taset;
- katsega ei saa määrata DHTd ja sellepärast ei saa määrata kemikaale, mis pidurdavad  $5\alpha$ -reduktaasi; sellisel juhul võib kasutada Hershbergeri katset (16);
- H295R-katsega ei saa avastada kemikaale, mis segavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telje kaudu; seda omadust saab uurida ainult elusloomadel tehtavate katsetega.

## KATSE PÕHIMÕTE

11. Katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad T ja E2 sünteesi. T on E2 sünteesi rajal ühtlasi üks vaheühendeid. Katsega saab kindlaks teha kemikaale, mis tavaliselt pidurdavad steroidogeneesi raja ensüüme.

▼ **M5**

12. Katse tehakse tavaliselt standardse rakukultuuri tingimustes 24 süvendiga plaatidel. Katse tegemiseks võib kasutada ka muu suurusega plaate; sellisel juhul tuleb külvamist ja katsetingimusi siiski vastavalt kohandada, et järgida tulemuslikkuse kriteeriume.
13. Pärast 24-tunnist kohanemisperioodi süvenditega plaatidel viiakse rakud 48 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaali seitsme kontsentratsiooniga (vähemalt kolm paralleelkatset). Paralleelselt tehakse katsed lahusti ja teada oleva pidurdaja või aktiveerija ühe kindla kontsentratsiooniga; need on negatiivne ja positiivne kontroll. Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igast süvendist katsekeskkond. Rakkude elujõulisust igas süvendis kontrollitakse kohe pärast katsekeskkonna eemaldamist. Hormoonide keskmist kontsentratsiooni katsekeskkonnas saab mõõta eri meetoditega; võib kasutada müügil olevaid hormoonide mõõtmise komplekte ja/või kasutada instrumentaalseid meetodeid, näiteks vedelikkromatograafia-mass-spektrometriat (LC-MS). Andmed väljendatakse suhtelise muutusena (kordades), võrreldes muutust lahusti kontrolli ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooniga (*lowest-observed-effect-concentration*, LOEC). Kui katse tulemus on negatiivne, teatatakse kõrgeim uuritud kontsentratsioon kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (*no-observed-effect-concentration*, NOEC). Järeldus kemikaali võime kohta mõjutada steroidogeneesi peaks põhinema vähemalt kahel teineteisest sõltumatul katsel. Esimese katse võib teha doosivahemiku otsimise katsena, edaspidi kohandatakse katsetes 2 ja 3 (kui need tehakse) kontsentratsioone, kui tekivad raskused lahustuvuse ja tsütotoksilisusega või kui kemikaali toime hakkab avalduma alles uuritud kontsentratsioonide vahemiku äärel.

**RAKUKULTUURI KASVATAMINE****Rakuliin**

14. NCI-H295R-rakke saab osta Ameerika rakukultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collections, ATCC) materjali üleandmise lepingu (*Material Transfer Agreement*, MTA) <sup>(1)</sup> allakirjutamisel.

**Sissejuhatus**

15. Kuna rakkude võime toota E2 muutub rakkude vanuse või passaažide arvu suurenemisega (2), tuleks rakke enne nende kasutamist kasvatada teatavate eeskirjade järgi, ning üles tuleks märkida passaažide arv pärast rakkude ülessulutamist ja passaaži number, mille juures rakud külmutati ja pandi vedelasse lämmastikku. Esimene number on tegelik rakupassaaži number ja teine number näitab rakupassaaži, milles rakud külmutati ja pandi hoiule. Näiteks rakud, mis külmutati pärast viiendat passaaži ning sulatati ja seejärel eraldati aluselt kolm korda (4 passaaži, kui loeme värskest sulatatud rakud passaažiks 1) pärast seda, kui neid oli jälle kasvatatud, saavad märgise 4.5. Nummerdamisskeemi kohta on esitatud näide valideerimisaruande I liites (4).
16. Säilituskeskkonda kasutatakse täiendatud keskkonna ja külmutamiskeskonna alusena. Täiendatud keskkond on rakkude kasvatamise vajalik komponent. Külmutamiskeskond on spetsiaalselt välja töötatud selleks, et rakke saaks kahjustamatult külmutada pikaajaliseks säilitamiseks. Enne kasutamist tuleks Nu-seerumit (vm sarnaste omadustega seerumit, mille kohta on näidatud, et see vastab katse tegemise ja kvaliteedikontrolli nõuetele), mis on lisatud keskkonna osa, analüüsida, et teha kindlaks T ja E2 taustkontsentratsioon. Nende lahuste valmistamist on kirjeldatud valideerimisaruande II liites (4).

<sup>(1)</sup> ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

## ▼ M5

17. Pärast H295R-rakkude kultuuri alustamist ATCC-originaalpartiist tuleb rakke kasvatada viie passaaži jooksul (st rakke eraldatakse aluselt 4 korda). Viienda passaaži rakud külmutatakse seejärel säilitamiseks vedelas lämmastikus. Enne rakkude külmutamist kasvatatakse eelmise, neljanda passaaži rakke kvaliteedikontrolli plaadil (vt punktid 36 ja 37), millega kontrollitakse, et hormoonide baasproduktioon ja reageering positiivse kontrolli kemikaalidele vastaksid katse kvaliteedikontrolli kriteeriumidele, mis on esitatud tabelis 5.
18. H295R-rakke tuleb kasvatada, külmutada ja hoida vedelas lämmastikus selle tagamiseks, et alati on kättesaadavad vajaliku passaaži/vajalikus vanuses rakud kasvatamiseks ja kasutamiseks. H295R-katse puhul lubatav passaažide maksimaalne arv pärast uue <sup>(1)</sup> või külmutatud <sup>(2)</sup> rakupartii kultuuri võtmist ei tohiks olla üle 10. Näiteks sobivad rakukultuuride passaažid, mis on võetud 5. passaažis külmutatud partiist, on 4.5 kuni 10.5. Külmutatud partiist alustatud rakukultuuri puhul tuleb järgida punktis 19 kirjeldatud korda. Neid rakke tuleks kasvatada vähemalt neljas (4) täiendavas passaažis (passaaž 4.5), enne kui neid kasutatakse katses.

**Rakkude võtmine külmutatud varukultuurist**

19. Rakkude külmutatud varukultuurist võtmise korda tuleb kasutada siis, kui uus partii rakke võetakse välja vedela lämmastikuga hoidlast kasvatamiseks ja katses kasutamiseks. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuuringu III liites (4). Rakud eemaldatakse vedela lämmastikuga hoidlast, sulatatakse kiiresti, pannakse tsentrifuugitopsis olevasse täiendatud keskkonda, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas ja viiakse üle kultuurikolbi. Keskkonda tuleks järgmisel päeval vahetada. H295R-rakke kasvatatakse inkubaatoris 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO<sub>2</sub>, ja keskkonda uuendatakse 2–3 korda nädalas. Kui rakukultuur saavutab ligikaudu 85–90 % laatumise (konfluentsuse), tuleb kultuur eraldada aluselt. Rakkude aluselt eraldamine on vajalik nende tervise ja kasvu tagamiseks, et need oleksid biokatse tegemiseks vajalikus seisundis. Rakke loputatakse kolm korda fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca<sup>2+</sup> ega Mg<sup>2+</sup>) ja vabastatakse rakud kultuurikolvist, milleks lisatakse sobivat ensüümi, mis aitab rakkudel eralduda, nt trüpsiiniga fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca<sup>2+</sup> ega Mg<sup>2+</sup>). Kohe pärast rakkude eraldumist kultuurikolvist tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Sobiv kogus rakkudega lahust pannakse uude kultuurikolbi. Rakkudega lahuse kogus tuleks reguleerida selliseks, et rakud laatuva 5–7 päevaga. Soovitav alamkultuuri suhtarv on 1: 3 kuni 1: 4. Tass tuleks hoolikalt märgistada. Rakud on nüüd valmis katses kasutamiseks ja liigsed rakud tuleks külmutada vedelas lämmastikus, nagu on kirjeldatud punktis 20.

<sup>(1)</sup> „Uus partii“ — uus rakkude partii, mis on saanud ATCC-lt.

<sup>(2)</sup> „Külmutatud partii“ — rakke on varem kasvatatud ja siis külmutatud mujal kui ATCC-s.

▼ **M5****H295R-rakkude külmutamine (rakkude ettevalmistamine vedelas lämmastikus säilitamiseks)**

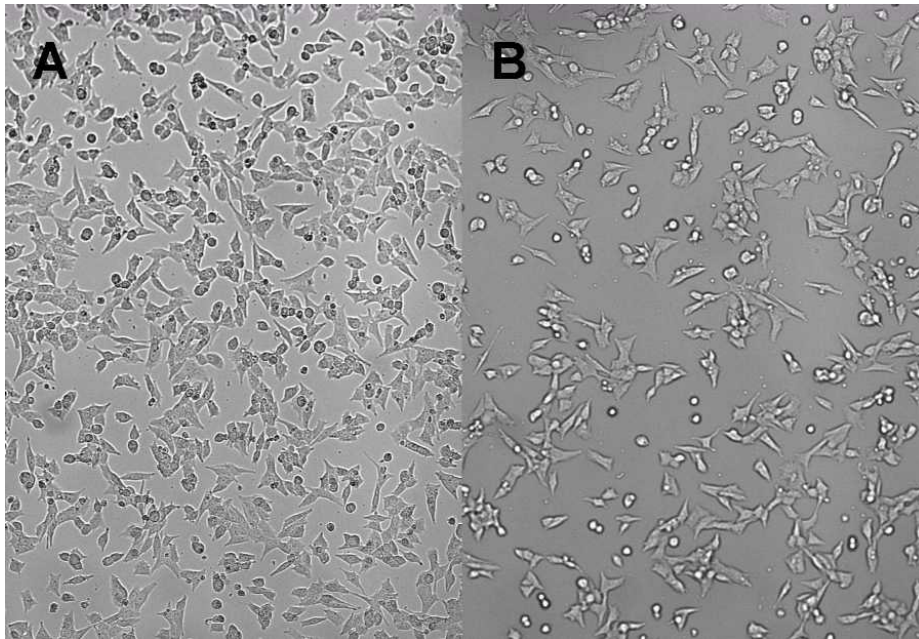
20. H295R-rakkude ettevalmistamisel külmutamiseks tuleks korrata eespool kirjeldatud rakkude eraldamisel kasutatud korda kuni tsentrifuugitopsi põhja kogutud rakkude uuesti suspendeerimiseni. Seekord suspendeeritakse tsentrifuugitud rakkudekogum külmutamiskeskonnas. Rakkudega lahuse viiakse üle krüoviaali, märgistatakse, nagu vaja, ja külmutatakse 24 tundi – 80 °C juures, mille järel viaal pannakse hoiule vedelasse lämmastikku. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuringu III liites (4).

**Rakkude kandmine plaadile ja eelinkubeerimine katse tegemiseks**

21. Katse tegemiseks vajalike punktis 19 esitatud juhendite kohaselt ettevalmistatud 24 süvendiga plaatide arv sõltub uuritavate kemikaalide arvust ja rakkude laatumisest kultuurikolvist. Üldreeglina saab ühest kultuurikolvist (75 cm<sup>2</sup>), milles laatumismäär on 80–90 %, piisava hulga rakke 1,5 (24 süvendiga) plaadi jaoks, kui vajalik rakkude tihedus on 200 000 kuni 300 000 rakku keskkonna ml-s, mis tekitab umbes 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga (joonis 2). See on tavaliselt sobivaim rakkude tihedus katstes hormoonide sünteesiks. Suurema tiheduse juures muutub T ja ka E2 sünteesi ajaline käik. Enne katse esmakordset tegemist soovitatakse katsetada mitut külvamistihedust vahemikus 200 000 kuni 300 000 rakku ml-s ja edasisteks katseteks tuleks valida selline tihedus, mis annab 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga.

*Joonis 2*

**H295R-rakkude mikrofoto külvamistihedusel 50 % 24 süvendiga plaadil pärast 24 tundi: A — süvendi äärel; B — süvendi keskel**



22. Keskkond eemaldatakse kultuurikolvist pipetiga ja rakke loputatakse 3 korda steriilse fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca<sup>2+</sup> ega Mg<sup>2+</sup>). Lisatakse ensüümi lahust samas fosfaatpuhvrit sisaldavas soolalahuses, et eraldada rakud kultuurikolvist. Rakkude eraldumiseks sobiva aja järel tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümi töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Arvutatakse rakkude tihedus, kasutades näiteks hematotsütoomeitrit või rakuloendajat. Rakkudega

▼ **M5**

lahust tuleks lahjendada kuni vajaliku külvamistiheduseni ja segada hoolikalt, et tagada rakkude ühtlane tihedus. Rakud tuleks kanda plaadile, 1 ml rakkudega lahust igasse süvendisse, ning plaadid ja süvendid märgistatakse. Rakkudega plaate inkubeeritakse 24 tundi 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO<sub>2</sub>, et lasta rakkudel kinnituda süvenditele.

**KVALITEEDIKONTROLLI NÕUDED**

23. On väga oluline, et süvenditesse pandaks täpne maht lahuseid ja dooside lisamisel proove, kuna need mahud määravad kontsentratsioonid, mida kasutatakse katsetulemuste arvutamisel.
24. Enne rakukultuuri loomist ja edasist katsete tegemist peaks iga labor näitama, et tema hormoonide määramise süsteem on piisavalt tundlik (punktid 29–31).
25. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikehapõhiseid katseid, tuleks enne katse alustamist kontrollida, kas uuritavad kemikaalid võivad segada T ja E2 mõõtmist vastavalt punktis 32 kirjeldatule.
26. Katse puhul soovitatakse lahustina kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Kui kasutatakse muud lahustit, tuleks määrata:

— uuritava kemikaali, forskoliini ja prokloraasi lahustuvus selles lahustis ning

— tsütotoksilisus funktsioonina lahusti kontsentratsioonist.

Soovitatakse, et lahusti suurim lubatav kontsentratsioon ei oleks kõrgem kui solvendi madalaima tsütotoksilise kontsentratsiooni 10-kordne lahjendus.

27. Enne katse esmakordset tegemist peaks labor läbi tegema kvalifikatsioonikatse, mis näitab, et labor suudab hooldada rakukultuuri ning saavutada rakukultuuri ja eksperimenditingimused, mis on vajalikud kemikaali katsetamiseks, nagu on kirjeldatud punktides 33–35.
28. Katsete alustamisel uue partiiga tuleks enne uue partii rakkude kasutamist teha katse kontrollplaadiga, et hinnata rakkude toimimist, nagu on kirjeldatud punktides 36 ja 37.

**Hormoonide määramise süsteemi toimimine**

*Meetodi tundlikkus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning ristreaktsioonid proovi maatriksiga*

29. Iga labor võib ise valida hormoonide mõõtmise süsteemi, mida ta kasutab H295R poolt sünteesitud T ja E2 määramiseks, tingimusel, et see vastab tulemuslikkuse kriteeriumidele, sealjuures mõõtmispiirile (*Limit of Quantification*, LOQ). Nominaalselt on need 100 pg/ml T puhul ja 10 pg/ml E2 puhul; väärtused põhinevad valideerimisuringus leitud normaalsetel hormoonitaseme baasväärtustel. Kuid ka kõrgem või madalam tase võib olla sobiv; see oleneb hormoonide baastasemest, mis on määratud katsete tegevas laboris. Enne edikontrolli plaadi ja uuritava kemikaali katsete käivitamist peaks labor tõendama, et kasutatava hormoonide määramise katsega saab hormoonide kontsentratsiooni mõõta täiendatud keskkonnas piisava mõõtmis- ja kordustäpsusega, et täita tabelites 1 ja 5 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid; selleks analüüsitakse täiendatud keskkonda, mida on tembitud hormooni sisestandardiga. Täiendatud keskkonda peaks olema

▼ **M5**

tembitud kummagi hormooniga vähemalt kolmel kontsentratsioonil (nt 100, 500 ja 2 500 pg/ml T-d; 10, 50 ja 250 pg/ml E2; T ja E2-ga tempimise kõige madalama määrana võib kasutada ka kõige madalamaid võimalikke kontsentratsioone, arvestades valitud hormoonide määramise süsteemi avastamispiiri) ja need tuleks määrata. Ekstraheerimata proovides mõõdetud hormoonide kontsentratsioonid tohivad nominaalsest kontsentratsioonist erineda kuni 30 % ja sama proovi paralleelmõõtmiste erinevus ei tohiks olla üle 25 % (vt ka tabel 8, täiendavad kvaliteedikontrolli kriteeriumid). Kui need kvaliteedikontrolli kriteeriumid on täidetud, siis eeldatakse, et valitud hormoonide määramise süsteem on piisavalt täpne, korratav ja ei esine ristreaktsioone keskkonnaga (proovi maatriks), mis võiksid oluliselt mõjutada katse tulemust. Sellisel juhul ei ole enne hormoonide mõõtmist vaja proove ekstraheerida.

30. Kui tabelites 1 ja 8 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei ole täidetud, võib olla tegemist olulise maatriksiefektiga; sel juhul tuleb teha katse tembitud keskkonnaga ja ekstraheerida hormoonid. Ekstraheerimise käigu kohta on esitatud näide valideerimisaruande II liites (4). Hormoonide kontsentratsiooni mõõtmisel ekstraheeritud proovidest tuleks teha kolm paralleelkatset<sup>(1)</sup>. Kui on võimalik näidata, et pärast ekstraheerimist keskkonna komponendid ei sega hormoonide määramise meetodit, nagu on määratletud kvaliteedikontrolli kriteeriumidega, tuleks kõik edaspidised katsed teha ekstraheeritud proovidega. Kui pärast ekstraheerimist ei õnnestu kvaliteedikontrolli kriteeriume täita, siis ei ole kasutatav hormoonide määramise süsteem sobiv H295R steroidogeneesi katses kasutamiseks ja tuleb kasutada muud hormoonide määramise meetodit.

*Standardkõver*

31. Lahusti kontrolli katsetest määratavad hormoonide kontsentratsioonid peaksid olema standardkõvera lineaarse osa peal. Eelistatavalt peaksid lahusti kontrolli tulemused asuma lineaarse osa keskel, mis tõendaks, et on võimalik mõõta nii hormoonisünteesi pärssimist kui ka aktiveerimist. Vastavalt sellele tuleks valida keskkonna (või ekstraktide) lahjendused, mis tehakse enne mõõtmist. Lineaarne sõltuvus määratakse kindlaks sobiva statistilise meetodiga.

*Kemikaali häiriva mõju katse*

32. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikeha-põhiseid meetodeid nagu ensüümmuunsorptsioonanalüüs (ELISA) ja radioimmuunanalüüs (RIA), tuleks enne kemikaalidega tegelike katsete tegemist kontrollida kemikaalide võimalikku segavat mõju (valideerimisaruande III liide (4)), kuna mõni kemikaal võib neid katseid segada (17). Kui esineb segamine, mis on  $\geq 20\%$  hormoonide T ja/või E2 baastasemest, mis määratakse hormoonianalüüsiga, tuleb kõigi uuritavate kemikaalide varulohuse lahjendustega teha hormoonide analüüsile kemikaali poolt avaldatava segava mõju

<sup>(1)</sup> Märkus: kui on vajalik ekstraheerimine, tehakse iga ekstraktiga kolm paralleelset määramist. Iga proovi ekstraheeritakse ainult üks kord.



## ▼ M5

katse (nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites, jaotis 5.0), et teha kindlaks lävidoos, mille juures esineb oluline ( $\geq 20\%$ ) segamine. Kui segamine on alla 30 %, võib segamise arvestamiseks viia tulemusse sisse parandi. Kui segamine on üle 30 %, on andmed kõlbatud ja selliste kontsentratsioonide juures saadud andmed tuleks jätta arvestamata. Kui uuritav kemikaal segab oluliselt hormoonide määramist rohkem kui ühel kontsentratsioonil, mis ei ole tsütotoksiline, tuleb kasutada muud hormoonide määramise süsteemi. Selleks et vältida saastavate kemikaalide segavat mõju, on soovitatav hormoonid keskkonnast sobiva lahustiga ekstraheerida; võimalikud meetodid on esitatud valideerimisaruandes (4).

Tabel 1

**Tulemuste õigsuse kriteeriumid hormoonide mõõtmise süsteemide puhul**

Näitaja	Kriteerium
Mõõtmismeetodi tundlikkus	Mõõtmispiir T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml <sup>(a)</sup>
Hormoonide ekstraheerimise tõhusus (ainult siis, kui on vaja ekstraheerida)	Tembitud hormooniproovide keskmine ekstraheerimismäär (mis põhineb kolmel mõõtmisel) ei tohiks erineda üle 30 % lisatud kogusest.
Kemikaali segav mõju (ainult antikeha-põhised süsteemid)	Olulisi ristreaktsioone ( $> 30\%$ vastava hormooni baastasemest) ei ole ühegi raku poolt sünteesitava hormooniga <sup>(b)</sup> <sup>(c)</sup> .

<sup>(a)</sup> Märkus: meetodi mõõtmispiirid põhinevad tabelis 5 esitatud hormoonide sünteesi baastase väärtustel ja sõltuvad määramise kvaliteedist. Kui saavutatakse kõrgem hormoonide baastase, võib piir olla kõrgem.

<sup>(b)</sup> Mõned T ja E2 antikehad võivad suurema protsendimäära korral ristreegeerida vastavalt androsteendiooni ja östrooniga. Sellisel juhul ei ole võimalik õigesti määrata mõju 17 $\beta$ -hüdroksüsteroidehüdrogenaasile. Siiski võib andmetest saada kasulikku teavet mõju kohta üldisele östrogeenide või androgeenide sünteesile. Sellistel juhtudel tuleks andmed väljendada pigem androgeeni/östrogeeni toimena, mitte E2 ja T-na.

<sup>(c)</sup> Need hõlmavad järgmisi: kolesterool, pregnenoloon, progesteron, 11-desoksükortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17 $\alpha$ -pregnenoloon, 17 $\alpha$ -progesteron, desoksükortisool, kortisool, DHEA, androsteendioon, östroon.

**Labori pädevuse katse**

33. Enne tundmatu kemikaali katsetamist peaks labor näitama, et ta suudab saavutada ja säilitada asjakohast rakukultuuri ja katsetingimusi, mis on vajalikud katse edukaks läbiviimiseks; selleks tehakse labori pädevuse katse. Kuna katse tulemuslikkus sõltub otseselt laboris analüüsi tegevatest inimestest, tuleb neid katseid osaliselt korrata, kui labori töötajaskonnas on muutusi.
34. Labori pädevuse katse tehakse samades tingimustes, mis on loetletud punktides 38–40: rakud viiakse kokkupuutesse tugeva, mõõduka ja nõrga aktivaatori ja pärssija 7 kontsentratsiooniga ja negatiivse kemikaaliga (vt tabel 2). Konkreetsetelt kuuluvad uuritavate ainete hulka järgmised kemikaalid: tugev aktivaator forskoliin (CASi nr 66575-29-9); tugev pärssija prokloraas (CASi nr 67747-09-5); mõõdukas aktivaator atrasiin (CASi nr 1912-24-9); mõõdukas pärssija aminoglutetimiid (CASi nr 125-84-8); nõrk (E2 sünteesi)

▼ **M5**

aktivaator ja nõrk (T sünteesi) pärssija bisfenool A (CASi nr 80-05-7) ning negatiivne kemikaal inimese kooriongonadotropiin (HCG) (CASi nr 9002-61-3), vt tabel 2. Eraldi plaatidel tehakse katsed kõigi kemikaalidega, kasutades tabelis 6 näidatud formaati. Iga päev tuleb koos katsetega teha ka üks katse kvaliteedikontrolli plaadiga (tabel 4, punktid 36-37), millele pannakse labori pädevuse kontrollimise kemikaalid.

Tabel 2

**Pädevuse kontrollimise kemikaalid ja kokkupuutekontsentratsioonid**

Pädevuse kontrollimise kemikaal	Uuritavad kontsentratsioonid [ $\mu\text{M}$ ]
prokloraas	0 <sup>(a)</sup> , 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1, 3, 10
forskoliin	0 <sup>(a)</sup> , 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3, 10, 30
atrasiin	0 <sup>(a)</sup> , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
aminoglutetimiid	0 <sup>(a)</sup> , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
bisfenool A	0 <sup>(a)</sup> , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
HCG	0 <sup>(a)</sup> , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100

<sup>(a)</sup> Lahusti (DMSO) kontroll (0), 1  $\mu\text{l}$  DMSO-d süvendisse.

H295R kokkupuude pädevuse kontrollimise kemikaalidega tuleks teha 24 süvendiga plaatidel labori pädevuse kontrollimise katse ajal. Doosi ühik kõigi uuritavate kemikaalide puhul on  $\mu\text{M}$ . Doosid tuleks manustada DMSO-lahusena, 0,1 mahuprotsenti igasse süvendisse. Iga uuritavat kontsentratsiooni tuleks katsetada kolmes süvendis (tabel 6). Iga kemikaali uuritakse eraldi plaadil. Iga päev lisatakse plaatide hulka üks kvaliteedikontrolli plaat.

35. Rakkude elujõulisuse ja hormoonide analüüsid tuleb teha vastavalt punktidele 42–46. Teatatakse läviväärtus (vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, *lowest observed effect concentration*, LOEC) ja otsus klassifitseerimise kohta ning tulemusi võrreldakse tabelis 3 esitatud väärtustega. Andmed loetakse kasutamiskõlblikuks, kui need vastavad LOEC-le ja klassifitseerimisotsusele, mis on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

**Läviväärtused (LOEC) ja klassifitseerimisotsused pädevuse kontrollimise kemikaalide puhul**

	CASi number	LOEC [ $\mu\text{M}$ ]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
prokloraas	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ <sup>(a)</sup> (Pärssimine)	+ (pärsimine)
forskoliin	66575-29-9	$\leq 10$	$\leq 0,1$	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
atrasiin	1912-24-9	$\leq 100$	$\leq 10$	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
aminoglutetimiid	125-84-8	$\leq 100$	$\leq 100$	+ (pärsimine)	+ (pärsimine)

## ▼ M5

	CASi number	LOEC [ $\mu$ M]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
bisfenool A	80-05-7	$\leq 10$	$\leq 10$	+ (pärssimine)	+ (aktiveerimine)
HCG	9002-61-3	Puudub	Puudub	Negatiivne	Negatiivne

(<sup>a</sup>) +, positiivne

Puudub: ei kohaldata, kuna pärast kokkupuudet negatiivse kontrolli mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga ei tohiks muutusi olla.

### Kvaliteedikontrolli plaat

36. Kvaliteedikontrolli plaati kasutatakse H295R-rakkude toimimise tõendamiseks rakkude kasvatamise standardtingimustes ja varasemate katsete andmebaasi loomiseks, millesse pannakse hormoonide kontsentratsioon lahusti kontrolli katsetes, positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes, samuti varasemate katsete muud kvaliteedikontrolli peegeldavad näitajad.

— H295R-rakkude toimimist tuleks hinnata nii, et kvaliteedikontrolli plaadiga kontrollitakse iga uut ATCC partiid, samuti varem külmutatud rakkude iga sulatatud partiid, kui sama rakkude partiiga ei tehta labori pädevuse katset (punktid 32–34).

— Üks kvaliteedikontrolli plaat võimaldab täielikult hinnata katse tingimusi (nt rakkude elujõulisus, lahusti kontrollid, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, samuti katsetevaheline ja katsesisene varieeruvus) kemikaali katsetamisel ning see peaks kuuluma iga katse juurde.

37. Kvaliteedikontrolli katse tehakse 24 süvendiga plaadil ja selle puhul kasutatakse samasugust inkubeerimise, dooside manustamise, rakkude eluvõimelisuse või tsütotoksilisuse määramise, hormoonide ekstraheerimise ja analüüsimise korda, mida on kirjeldatud punktides 38–46 kemikaalide katsetamiseks. Kvaliteedikontrolli plaadil on tühikatsed, lahusti kontrollid ning E2 ja T teadaoleva aktivaatori kaks kontsentratsiooni (forskoliin, 1 ja 10  $\mu$ M) ning teadaoleva pärssija kaks kontsentratsiooni (prokloraas, 0,1 ja 1  $\mu$ M). Lisaks kasutatakse MeOH teatavates süvendites kui rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse positiivset kontrolli. Plaadi üksikasjalik kirjeldus on esitatud tabelis 4. Kriteeriumid, millele peavad vastama kvaliteedikontrolli plaadi tulemused, on loetletud tabelis 5. Nii lahusti kontrolli kui ka tühikatsete süvendites tuleb saavutada T ja E2 sünteesi minimaalne baastase.

Tabel 4

**Kvaliteedikontrolli plaat, millega kontrollitakse mõjutamata H295R-rakkude ja teadaolevate pärssijatega (PRO — prokloraas) ja aktiveerijate (FOR — forskoliin) kokkupuutes olevate H295R-rakkude E2 ja T sünteesi. Pärast kokkupuutekatse lõpetamist ja keskkonna kõrvaldamist lisatakse kõikidesse MeOH süvenditesse 70 % metanoolilahust; see on tsütotoksilisuse positiivne kontroll (vt tsütotoksilisuse katse valideerimisaruande (4) III liites)**

	1	2	3	4	5	6
A	Tühikatse ( <sup>a</sup> )	Tühikatse ( <sup>a</sup> )	Tühikatse ( <sup>a</sup> )	Tühikatse ( <sup>a</sup> ) (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )	Tühikatse ( <sup>a</sup> ) (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )	Tühikatse ( <sup>a</sup> ) (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )
B	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )	DMSO ( <sup>c</sup> ) 1 $\mu$ l (+ MeOH) ( <sup>b</sup> )

## ▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

(a) Tühikatses süvendites olevatele rakkudele lisatakse ainult keskkonda (st lahustit ei lisata).

(b) Metanool (MeOH) lisatakse pärast seda, kui kokkupuude on lõpetatud ja keskkond on nendest süvenditest eemaldatud.

(c) DMSO lahusti kontrolli katse (1 µl süvendi kohta).

Tabel 5

## Kvaliteedikontrolli plaadi tulemuslikkuse kriteeriumid

	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrollis (SC)	≥ 5 korda LOQ	≥ 2,5 korda LOQ
Aktiveerimine (10 µM forskoliin)	≥ 1,5 korda SC	≥ 7,5 korda SC
Pärssimine (1µM prokloraas)	≥ 0,5 korda SC	≥ 0,5 korda SC

## KEMIKAALIGA KOKKUPUUTESSE VIIMINE

38. Eelinkubeeritud rakud võetakse inkubaatorist välja (punkt 21) ja kontrollitakse mikroskoobi all, et teha kindlaks, kas need on heas seisundis (kleepumine, morfoloogia) enne kemikaaliga kokkupuutesse viimist.
39. Rakud pannakse bioohutuskambrisse ja eemaldatakse täiendatud keskkond ning asendatakse uue täiendatud keskkonnaga (1 ml süvendi kohta). Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud lahusti DMSO. Kui on olemas põhjusi muude lahustite kasutamiseks, tuleks esitada teaduslik põhjendus. Rakud viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse, milleks lisatakse 1 µl sobivat põhilahust dimetüülsulfoksiidis (vt valideerimisaruande (4) II liide) süvendis oleva täiendatud keskkonna 1 ml kohta (süvendi maht). Sellega saavutatakse süvendites DMSO lõppkontsentratsioon 0,1 %. Vajaliku segamise kindlustamiseks eelistatakse üldiselt segada uuritava kemikaali sobiv põhilahus DMSO täiendatud keskkonnaga, et saada iga doosi vajalik lõppkontsentratsioon, ja selline segu lisatakse igasse süvendisse kohe pärast vana keskkonna eemaldamist. Kui kasutatakse sellist varianti, peaks DMSO kontsentratsioon (0,1 %) olema ühesugune kõikides süvendites. Süvendites, milles on kaks kõige kõrgemat kontsentratsiooni, kontrollitakse visuaalselt stereomikroskoobiga, et neis ei oleks sadet ega hägu, mis osutaks kemikaali ebapiisavale lahustuvusele. Kui leitakse hägusust või sademe tekkimist, kontrollitakse ka järgmise kahe kontsentratsiooniga süvendite (jne); kontsentratsioonide, mille juures ei saavutatud täielikku lahustumist, ei arvestata edasisel hindamisel ja analüüsil. Plaat pannakse tagasi inkubaatorisse 37 °C juurde 5 % CO<sub>2</sub>-sisaldusega õhu atmosfääri 48 tunniks. Uuritava kemikaaliga katse plaat on näidatud tabelis 6. Põhilahused 1–7 näitavad uuritava kemikaali suurenevate dooside paigutust.

## ▼ M5

Tabel 6

**Dooside manustamise skeem H295R-rakkude kokkupuutel uuritava kemikaaliga 24-süvendilisel plaadil**

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Põhilahus 4	Põhilahus 4	Põhilahus 4
B	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 5	Põhilahus 5	Põhilahus 5
C	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 6	Põhilahus 6	Põhilahus 6
D	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 7	Põhilahus 7	Põhilahus 7

40. Pärast 48-tunnist kokkupuudet võetakse plaadid inkubaatorist ja iga süvendit kontrollitakse mikroskoobiga rakkude seisundi (kleepumine, morfoloogia, laatumise määr) ja tsütotoksikoloogilise suhte. Iga süvendi keskkond jagatakse kaheks võrdseks osaks (kumbki ligikaudu 490 µl) ja kantakse kahte korralikult märgistatud vialli (st üks alikvoot annab iga süvendi kohta varuproovi). Rakkude kuivamise vältimiseks eemaldatakse keskkond korraga ühe rea süvenditest ja asendatakse keskkonnaga rakkude eluvõimelisuse (tsütotoksilisuse) katseks. Kui rakkude eluvõimelisust (tsütotoksilisust) kohe määrama ei hakata, lisatakse igasse süvendisse 200 µl fosfaatpuhvrit sisaldavat soolalahust, mis sisaldab  $Ca^{2+}$  ja  $Mg^{2+}$ . Keskkond külmutatakse – 80 °C juures kuni edasise töötlemiseni hormoonikontsentratsioonide määramiseks (vt punktid 44–46). T ja E2 on – 80 °C juures hoitavas keskkonnas üldiselt stabiilsed vähemalt kolm kuud, kuid hormoonide stabiilsus säilitamisel tuleks dokumentaalselt tõendada igas laboris.
41. Kohe pärast keskkonna eemaldamist määratakse igal kemikaaliga kokkupuute plaadil rakkude eluvõimelisus/tsütotoksilisus.

**Rakkude eluvõimelisuse määramine**

42. Rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katset võib teha mitmel viisil; katse eesmärk on teha kindlaks kemikaali võimalik mõju rakkude eluvõimele. Katsega peaks saama määrata süvendis olevate eluvõimeliste rakkude tegelikku protsendimäära või tuleb näidata, et see on võrreldav katsega Live/Dead® (on selle lineaarne funktsioon) (vt valideerimisaruande (4) III liide). Samavõrra hästi töötab teine katse MTT-ga ([3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid] (18)). Rakkude eluvõimelisuse hindamine nimetatud meetoditega on suhteline ja selle puhul ei pruugi tingimata olla lineaarset sõltuvust süvendis olevate rakkude absoluutsest arvust. Seepärast tuleks igas süvendis rakke paralleelselt hinnata ka silmaga ning teha lahusti kontrolli ja kahe kõrgeima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni katse digitaalpliidid arhiivi jaoks, et hiljem oleks võimalik määrata tegelikku rakkude tihedust, kui seda on vaja. Kui visuaalne kontrollimine või eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katse näitab rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist kasvu kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokollis. Rakkude eluvõimelisus väljendatakse suhtena lahusti kontrolli katsete keskmise tulemusse; viimast peetakse 100 % eluvõimelisuseks ja see arvutatakse vastavalt kasutatava rakkude eluvõimelisuse/tsütoloogilise katse eeskirjale. MTT-katse puhul võib kasutada järgmist valemit:

▼ **M5**

**eluvõimeliste rakkude %** = (väärtus süvendis – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvaartus) ÷ (lahustikontrolli süvendite keskvaartus – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvaartus)

43. Süvendid, milles eluvõimelisus on alla 80 % võrreldes keskmise eluvõimelisusega lahusti kontrolli katsetes (= 100 % eluvõimelisus), tuleks lõplikust andmete analüüsist välja jätta. Kui steroidogeneesi pärssimine toimub peaaegu 20-protsendilise tsütotoksilisuse juures, tuleb tulemust hoolikalt hinnata ja tõendada, et pärssimise põhjuseks ei ole tsütotoksilisus.

**Hormoonide analüüs**

44. Iga labor võib kasutada vabalt valitud süsteemi hormoonide T ja E2 mõtmiseks. Iga doosirühma vabasid keskkonna alikvoote võib kasutada lahjenduste tegemiseks, et viia kontsentratsioon standardkõvera lineaarsesse osasse. Nagu märgitud punktis 29, peaks iga labor tõendama, et tema hormoonide määramise süsteem (nt ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) vastab kvaliteedikontrolli kriteeriumidele. Selle jaoks tuleb enne kvaliteedikontrolli katseid või kemikaalide katsetamist täiendatud keskkonda tempida hormooni sisestandardiga. Selleks et tagada, et katsesüsteemi komponendid ei segaks hormoonide määramist, võib olla vajalik need enne määramist keskkonnast ekstraheerida (vt punkt 30, millistel tingimustel ekstraheerimine on või ei ole vajalik). On soovitatav teha ekstraheerimine nii, nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites.
45. Kui hormoonide sünteesi mõõdetakse kaubandusliku katsekomplektiga, tuleb hormoonide analüüs teha vastavalt katsekomplekti tootja juhenditele. Enamikul tootjatest on oma individuaalne meetod hormoonide analüüsi tegemiseks. Uuritavaid proove on vaja lahjendada nii, et eeldatavad hormoonide kontsentratsioonid lahusti kontrolli katsetes langevad üksikkatse standardkõveral lineaarse osa keskele (valideerimisaruande (4) III liide). Väärtused väljaspool standardkõvera lineaarset osa tuleb jätta arvestamata.
46. Lõplik hormoonide kontsentratsioon arvutatakse järgmiselt.

Näide:

Ekstraheeriti:	450 µl keskkonda
Lahustati:	250 µl katsepuhvis
Lahjendus analüüsiks:	1: 10 (proovi tulemuse toomiseks standardkõvera lineaarsesse osasse)
Hormooni kontsentratsioon mõõdetud proovis:	150 pg/ml (pärast kohandamist kontsentratsiooniks mõõdetud proovi milliliitris)
Taas leitud:	89 %
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(hormooni kontsentratsioon (milliliitri kohta) ÷ taas leitud) (lahjendustegur)
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10$ = 936,3 pg/ml

## ▼ M5

**Uuritavate kontsentratsioonide valimine**

47. Tuleks teha vähemalt kaks sõltumatut analüüsikatset. Kui katses kasutata-  
vate kontsentratsioonide valimiseks ei ole varasemast teavet lahustuvuspää-  
rde või tsütotoksilisuse kohta, siis soovitatakse esimesel katsel võtta katse-  
kontsentratsioonid vahega  $\log_{10}$ , kusjuures  $10^{-3}$  M on maksimaalne kont-  
sentratsioon. Kui kemikaal on lahustuv ja ei ole tsütotoksiline ühelgi uuritud  
kontsentratsioonil ning esimesel katsel andsid kõik kontsentratsioonid nega-  
tiivse tulemuse, siis tuleb seda kinnitada veel ühe katsega, kasutades samu  
tingimusi kui esimesel katsel (tabel 7). Kui esimese katse tulemused on  
*ebaselged* (st suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga  
võrreldes statistiliselt oluline ainult ühel kontsentratsioonil) või positiivsed  
(st suuruse suhteline muutus lahusti kontrolliga võrreldes on statistiliselt  
oluline kahe või enama kõrvuti oleva kontsentratsiooni puhul), tuleb katset  
korrata, nagu on näidatud tabelis 7, täpsustades katseks kontsentratsioonide  
valimist. Uuritavaid kontsentratsioone teises ja kolmandas katses (kui see  
tehtakse) tuleks kohandada, arvestades esimeses katses mõju põhjustanud  
kontsentratsioonivahemikku, kasutades poole logaritmilise ühiku suurusi  
kontsentratsioonivahemikke (nt kui esimeses katses kontsentratsioonidega  
0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  leiti aktivatsioon kontsentratsioonidel  
1 ja 10  $\mu\text{M}$ , tuleks teises katses valida kontsentratsioonideks 0,1, 0,3, 1, 3,  
10, 30, 100  $\mu\text{M}$ ), kui ei ole vaja kasutada väiksemaid kontsentratsioone  
LOEC saavutamiseks. Viimasel juhul kasutatakse vähemalt viit kontsentrat-  
siooni allpool madalaimat esimeses katses uuritud kontsentratsiooni poole  
logaritmilise ühiku suuruse vahega. Kui teine katse ei kinnita esimest katset  
(st statistiliselt olulist erinevust ei leita varem positiivse kontsentratsiooni  
ümbruses  $\pm 1$  kontsentratsiooniinkrement), tuleb teha kolmas katse, kasu-  
tades esialgseid katsetingimusi. Esimese katse ebaselged tulemused loetakse  
negatiivseks, kui täheldatud mõju ei õnnestu kinnitada ühegi järgmisest  
kahest katsest. Ebaselged tulemused loetakse positiivseks toimeks, kui  
reaktsiooni õnnestub kinnitada vähemalt ühes järgmises katses kontsentrat-  
sioonil  $\pm 1$  kontsentratsiooniinkrement (vt punkt 55, andmete tõlgendamise  
meetod).

Tabel 7

**Otsuste maatriks võimalike tulemusestsenariumide korral**

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
	Otsus	Stsenarium	Otsus	Stsenarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Negatiivne	Stopp			X
Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Positiivne	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Negatiivne		X
Ebaselge <sup>(c)</sup>	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Negatiivne		X
Ebaselge <sup>(c)</sup>	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Positiivne	X	
Ebaselge <sup>(c)</sup>	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Positiivne			X	
Positiivne	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Positiivne	X	

## ▼ M5

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita <sup>(a)</sup>	Positiivne	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Positiivne	X	
Positiivne	Täpsusta <sup>(b)</sup>	Positiivne	Stopp		X	

<sup>(a)</sup> Kinnita eelmist katset, kasutades sama eksperimendiplaani.

<sup>(b)</sup> Korda katset poole logaritmilise ühiku suuruste kontsentratsioonivahemikega (mõlemale poole kontsentratsioonist, mis eelmises katses osutus oluliselt erinevaks).

<sup>(c)</sup> Suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ühel kontsentratsioonil.

**Katseplaadi kvaliteedikontroll**

48. Lisaks kvaliteedikontrolli plaadi kriteeriumide täitmisele tuleks täita ka muid kvaliteedikriteeriume, mis on seotud paralleelsüvendite tulemuste lubatavate erinevustega, korduskatsetega, hormooni määramise süsteemide lineaarsuse ja tundlikkusega, ühest ja samast proovist hormooni paralleelsete määramiste erinevustega ja tembitud hormoonipiikide taasleidmise protsendimääruga pärast keskkonna ekstraheerimist (kui seda tehakse; vt nõuded ekstraheerimisele, punkt 30); sellised kvaliteedikriteeriumid on esitatud tabelis 8. Andmed peaksid langema iga näitaja lubatavasse väärtuste vahemikku, ainult siis saab neid arvestada edasisel hindamisel. Kui need kriteeriumid ei ole täidetud, tuleks tabelis märkida, et kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei olnud kõnealuses proovis täidetud; proov tuleks uuesti analüüsida või andmed välja visata.

Tabel 8

**H295R-katse plaadi näitajate lubatavad väärtused ja varieerumisvahemik (%)**

(LOQ — hormooni määramise süsteemi mõõtmispiir (*Limit of Quantification*); CV — variatsioonikordaja; SC — lahusti kontrollkatse; DPM — lagunemist minutis)

	Võrreldavad suurused	T	E2
Hormoonide baassünteese lahusti kontrolli katsetes	Suhteline suurenemine võrreldes LOQga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Kokkupuutekatsed — plaadisene CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelsüvendid)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 30 %	≤ 30 %
Kokkupuutekatsed — plaatidevaheline CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelkatsed)	Muutus kordades	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormoonide mõõtmise süsteem — tundlikkus	Tuvastatav suhteline vähenemine, võrreldes lahusti kontrolliga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Hormoonide mõõtmise süsteem — kordusmõõtmised lahusti kontrollide CV <sup>(a)</sup>	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 25 %	≤ 25 %
Keskkonna ekstraheerimine — 3H-sisestandardi taasleidmine (vajaduse korral)	DPM	≥ 65 % nominaalsest	

<sup>(a)</sup> Tähebtab ühe ja sama proovi kordusmõõtmisi.



▼ **M5****KATSEANDMETE ANALÜÜS JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete analüüs**

49. Selleks, et hinnata hormoonide sünteesi suhtelist suurenemist või vähenemist kemikaali juuresolekul, tuleb tulemused normeerida lahusti kontrolli tulemuste keskväertusega igal plaadil, ja tulemused esitatakse suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga igal katseplaadil. Kõik andmed esitatakse kujul keskväertus  $\pm 1$  standardhälve (SD).

50. Andmete analüüsil arvestatakse ainult süvendeid, milles tsütotoksilisus oli alla 20 %. Suhtelised muutused tuleks arvutada järgmiselt:

**suhteline muutus** = (hormooni kontsentratsioon igas süvendis)  $\div$  (kõikide lahusti kontrollide hormooni kontsentratsiooni keskväertus).

51. Kui süvendi visuaalse kontrollimise või punktis 42 kirjeldatud eluvõime- lise/tsütotoksilisuse katsega näidati rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist suurenemist kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokollis.

52. Enne statistilise analüüsi tegemist tuleks hinnata normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse eelduste kehtivust. Normaaljaotust tuleks hinnata standardsete tõenäosusgraafikute või muu sobiva statistilise meetodiga (nt Shapiro-Wilki katse). Kui andmed (suhtelised muutused kordades) ei ole normaaljaotusega, tuleks püüda andmeid teisendada, et lähendada neid normaaljaotusele. Kui andmed on normaaljaotusega või ligikaudu normaaljaotusega, tuleks analüüsida erinevusi kemikaali kontsentratsioonirühmade ja lahusti kontrollide vahel, kasutades parameetrilist testi (nt Dunnetti testi), milles *kontsentratsioon* on sõltumatu muutuja, ja *toime* (suhteline muutus kordades) on sõltuv muutuja. Kui andmed ei ole normaaljaotusega, tuleb kasutada sobivat mitteparameetrilist testi (nt Kruskal Wallis, Steeli mitmese võrdluse astaktest). Erinevused loetakse oluliseks  $p \leq 0,05$  puhul. Statistiline hindamine tehakse iga süvendi keskväertuste alusel, mis esindavad sõltumatuid paralleelidega andmepunkte. Eeldatakse, et kuna esimeses katses on dooside vahel suured vahed ( $\log_{10}$  skaala), ei ole paljudel juhtudel võimalik täpselt kirjeldada kontsentratsiooni-toime sõltuvust, kui kaks kõrgeimat kontsentratsiooni on sigmoidse kõvera lineaarses osas. Seepärast kasutatakse esimese katse või muude andmete puhul, kus see olukord esineb (nt kui ei hinnata maksimaalset tõhusust), I tüüpi fikseeritud muutuja statistikat, nagu on kirjeldatud eespool.

53. Kui rohkem kui kaks andmepunkti asuvad kõvera lineaarsel osal ja on võimalik arvutada maksimaalseid tõhususi — nagu eeldatakse mõne teise katse juures, mille tegemisel kasutatakse poole logaritmilise ühiku suurusi kokkupuutekontsentratsioonide erinevusi — tuleks kasutada probit-, logit- või muud sobivat regressioonimudelit, et arvutada tõhususega seotud kontsentratsioone (nt EC50 ja EC20).

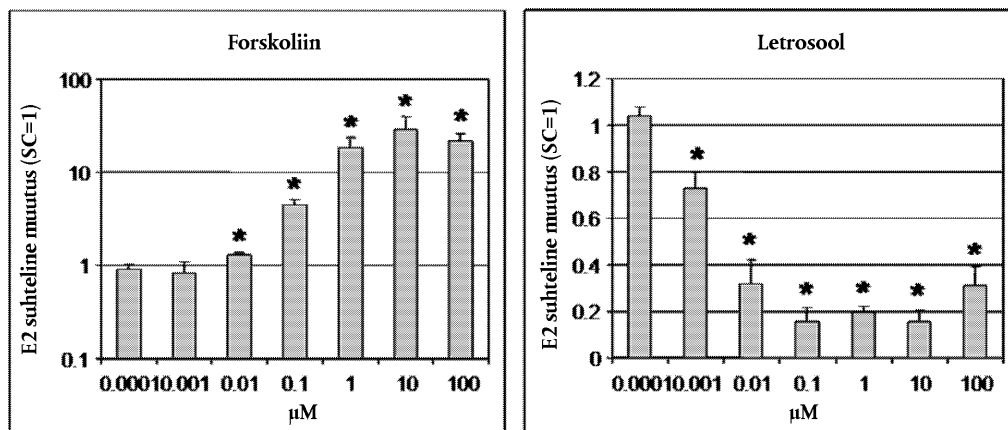
54. Tulemused tuleks esitada nii graafiliselt (tulppiagrammid, mis näitavad keskväertust  $\pm 1$  SD) kui ka tabelina (LOEC/NOEC, mõju suund, ja maksimaalse toime tugevus, mis on osa andmete doosi-toime aspektist) (vt näide joonisel 3). Andmete hindamine on ainult siis kehtiv, kui see põhineb vähemalt kahel sõltumatul katsel. Katset loetakse sõltumatuks, kui see on läbi viidud muul kuupäeval, uute lahuste ja kontrollidega. Teises ja (vajaduse korral) kolmandas katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku võib valida esimese katse tulemuste põhjal, et paremini määratleda doosi-toime vahemik, milles asub LOEC (vt punkt 47).

## ▼ M5

## Joonis 3

## H295R-katsega saadud andmete graafikuna ja tabelina esitamise ja hindamise näide

(tärm märgib statistiliselt olulisi erinevusi solvendi kontrollist ( $p < 0,05$ ); LOEC — vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (*lowest observed effective concentration*); suurim muutus — toime maksimaalne tugevus igal kontsentratsioonil võrreldes lahusti kontrolli keskväertusega (= 1))



Kemikaal	LOEC	Suurim muutus
forskoliin	0,01	0,15 korda
letrosool	0,001	29 korda

## Andmete tõlgendamise kord

55. Uuritav kemikaal tunnistatakse positiivseks, kui suhteline aktivatsioon (kordades) on statistiliselt erinev ( $p \leq 0,05$ ) lahusti kontrollist kahel kõrvuti oleval kontsentratsioonil vähemalt kahes sõltumatus katses (tabel 7). Uuritav kemikaal tunnistatakse negatiivseks pärast kahte sõltumatut negatiivset katset või pärast kolme katset, millest kaks olid negatiivsed ja üks ebaselge või positiivne. Kui andmed, mis on saadud kolme iseseisva katsega, ei vasta tabelis 7 loetletud otsustamise kriteeriumidele, ei ole uurimistulemused tõlgendatavad. Tulemusi, mis on saadud lahustuvuspiirist kõrgema või tsütotoksilise kontsentratsiooni juures, ei tohiks kasutada tulemuste tõlgendamiseks.

## Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

## Uurimislabor:

— nimi ja asukoht;

— uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;

— uuringu alguse ja lõpetamise kuupäevad.

**▼ M5***Uuritav kemikaal, reaktiivid ja kontrollid:*

- identifitseerimisandmed (nimetus ja CASi number, kui on olemas), päritolu, partii number, puhtus, tarnija, ning uuritava kemikaali, reaktiivide ja kontrollide iseloomustus;
- uuritava kemikaali füüsiline olek ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused;
- uuritavate kemikaalide, reaktiivide ja kontrollide säilitustingimused ning katseks ettevalmistamise meetod ja sagedus;
- uuritava kemikaali stabiilsus.

*Rakud:*

- allikas ja rakutüüp;
- katses kasutatud rakkude passaažide arv (rakupassaaži tunnus);
- rakukultuuride säilitusmeetodite korra kirjeldus.

*Enne katset täidetavad nõuded (vajaduse korral):*

- uuritava kemikaali võimalik segav mõju hormoonide määramise süsteemile — kontrollkatse kirjeldus ja tulemused;
- hormoonide ekstraheerimise tõhususe mõõtmised — kirjeldus ja tulemused;
- kõigi tehtavate analüüside standard- ja kaliibrimiskõverad;
- valitud analüüsimeetodite avastamiskiir.

*Katsetingimused:*

- keskkonna koostis;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon;
- rakkude tihedus (hinnatud või mõõdetud rakkude kontsentratsioon 24 ja 48 tunni järel);
- uuritava kemikaali lahustuvus (lahustumiskiir, kui see on määratud);
- inkubatsiooniaeg ja tingimused.

*Katsetulemused:*

- iga kontrollisüvendi ja kemikaaliga süvendi töötlemata andmed — iga üksiku mõõtmise tulemus otse sellisel kujul, mille annab hormoonide mõõtmiseks kasutatav vahend (nt optilise tiheduse ühikutes, fluorestsentsi ühikutes, lagunemiste arv minutis jne);
- normaaljaotuse eelduse kontrollimine või andmete teisendamise selgitus;
- keskmine toime  $\pm 1$  standardhälve igas mõõdetud süvendis;
- tsütotoksilisuse andmed (uuritavad kontsentratsioonid, mis olid tsütotoksilised);
- kinnitus selle kohta, et kvaliteedikontrolli nõuded olid täidetud;

▼ **M5**

- suhteline muutus võrreldes lahusti kontrolli proovidega, tsütotoksilisuse parandiga;
- tulpdiaagramm, mis näitab suhtelist muutust (kordades) igal kontsentratsioonil, koos standardhälbe ja statistilise olulisusega, vt punktid 49–54.

*Andmete tõlgendamine:*

- andmete tõlgendamise korra kohaldamine tulemustele ja tähelepanekute arutelu.

*Arutelu:*

- kas tulemustest järeldub midagi võimaluse kohta, et T ja E2 andmeid võisid mõjutada kaudsed mõjud glüko- ja mineraalkortikoidide radadele?

*Järeldused***KIRJANDUS**

- 1) OECD (2002), Sisesekretoonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik, käesoleva lisa peatüki B.54 2. liide.
- 2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114–124.
- 3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellesmann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- 4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Kättesaadav aadressil [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)
- 5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Kättesaadav aadressil [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)
- 6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Kättesaadav aadressil [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/steroidogenesis\\_drp\\_final\\_3\\_29\\_05.pdf](http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf)
- 7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78–89.
- 8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44–54.
- 9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265–272.

▼ **M5**

- 10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137–1148.
- 11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488–5496.
- 12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578–584.
- 13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- 14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- 15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731–737.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hershbergeri biokatse rottidel: kiire sөлkatse (anti)androgensete omaduste väljaselgitamiseks
- 17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222–231.
- 18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.
- 19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- 20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484–492.

▼ **M5***Liide***MÕISTED**

**CV (Coefficient of Variation)** – variatsioonikordaja, määratletud kui jaotuse standardhälbe ja aritmeetilise keskmise suhtarv.

**CYP** – tsütokroom P450 monoooksügenaasid, geenide ja nende järgi sünteesitud ensüümide perekond, mis osaleb väga paljude biokeemiliste reaktsioonide katalüüsimises, sealhulgas steroidhormoonide sünteesi ja metabolismi katalüüsimises.

**DPM (disintegrations per minute)** – lagunemiste arv minutis. See on teatava koguse radioaktiivse aine ühe minuti jooksul lagunenu aatomite arv.

**E2** – 17 $\beta$ -östradiool, kõige tähtsam östrogeen imetajate hormoonisüsteemides.

**H295R-rakud** – inimese adrenokartsinoomi rakud, millel on tsonaalselt diferentseerumata inimloote neerupealise rakkude füsioloogilised omadused ning milles on ekspresseeritud kõik steroidogeneesi raja ensüümid. Selliseid rakke saab tellida ATCC-st.

**Katse** – sõltumatu eksperiment, mis tehakse uute lahuste ja uute kontrollidega.

**Katseplaat** – plaat, millel H295R-rakud viiakse kokkupuutesse uuritavate kemikaalidega. Katseplaadil on lahusti kontroll ja uuritav kemikaal seitsmes kontsentratsioonis, igaüks kolme paralleelina.

**Kvaliteedikontroll (QC)** – osutab meetmetele, mida on vaja võtta kasutamiskõlblike andmete saamiseks.

**Kvaliteedikontrolli plaat** – 24 süvendiga plaat, millel on positiivse ja negatiivse kontrolli kaks kontsentratsiooni, millega kontrollitakse uue rakkude partii toimimist või tehakse katse positiivsed kontrollid kemikaalide katsetamisel.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Külmutuskeskkond** – keskkond, mida kasutatakse rakkude külmutamiseks ja milles hoitakse külmutatud rakke. Selle koostis on järgmine: varulahusekeskkond pluss BD NuSerum ja dimetüülsulfoksiid.

**Laatumismäär** – iseloomustab pinna katmise või paljunemise määra, mida rakkudele võimaldatakse kasvukeskkonna pinnal või sees.

**Lineaarne osa** – hormoonide määramise süsteemi standardkõvera osa, milles tulemus on võrdeline proovis oleva analüüdi kontsentratsiooniga.

**LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)** – vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, mille juures katse tulemus on statistiliselt erinev lahusti kontrolli tulemusest.

**LOQ (Limit of Quantification)** – mõõtmispiir, väikseim kogus kemikaali, mida saab eristada kõnealuse kemikaali puudumisest (tühikatse) teatava usalduspiiri juures. Käesoleva meetodi puhul on LOQ tavaliselt katsesüsteemi valmistaja poolt ette antud, kui seda ei ole täpsustatud teisiti.

**NOEC (No Observed Effect Concentration)** – kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille juures analüüs ei näita positiivset tulemust.

**Passaaž** – kordade arv, millal rakud on pärast külmutatud tüvikultuurist kultuuri loomist aluselt eraldatud. Lähtepassaažile, mis tehakse külmutatud tüvikultuurist, omistatakse number üks (1). Rakud, mis on aluselt eraldatud üks kord, nimetatakse passaažiks 2 jne.

**▼ M5**

**PBS** – Dulbecco fosfaatpuhvrilisandiga keedusoolalahus.

**Steroidogenees** – sünteesirada, mille kaudu kolesteroolist sünteesitakse mitmesugused steroidhormoonid. Steroidide sünteesi raja mitu vahesaadust nagu progesteron ja testosteroon on ise olulised hormoonid; samas on nad sünteesiraja edasiste hormoonide eellased.

**T** – testosteroon, üks kahest kõige olulisemast androgeenist imetajate hormoonisüsteemides.

**Trüpsiin 1X** – lahjendatud trüpsiini (üks ensüüme, kõhunäärme seriinproteas) lahus, mida kasutatakse rakkude eraldamiseks rakkude kasvatamise plaadilt, vt valideerimisaruande (4) III liide.

**Täiendatud keskkond** – varukeskkond pluss BD Nu-Serum ja ITS+ premium mix, vt valideerimisaruande (4) II liide.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Varukeskkond** – lähtekeskkond, mis on alus muude reagentilahuste valmistamiseks. See koosneb Dulbecco modifitseeritud Eagle'i keskkonna ja Hami F-12 toitainesegust (DMEM/F12) vahekorras 1: 1 15 mM HEPES-puhvril, mis ei sisalda fenoolpunast ega Na-vesinikkarbonaati. Na-vesinikkarbonaat lisatakse puhverdamiseks, vt valideerimisaruande (4) II liide.

▼ **M5**

**B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE  
GEENIDE MUTATSIOONI KATSE**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.



▼ M7

B.59. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN CHEMICO*: OTSENE  
REAKTSIOONIVÕIME KATSE PEPTIIDIDEGA (*DIRECT*  
*PEPTIDE REACTIVITY ASSAY, DPRA*)

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M7

**B.60. NAHA SENSIBILISEERIMINE *IN VITRO*: ARE-NRF2 LUTSIFERAASI KATSEMEETOD**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ M7

**B.61. FLUORESTSEINI LEKKE KATSEMEETOD SILMI SÖÖVITAVATE JA TUUGEVALT ÄRRITAVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS**

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ **M7****B.62. LEELISELINE IN VIVO KOMEEDIKATSE  
IMETAJARAKKUDEGA****SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 489 (2016). Leeliselist *in vivo* komeedikatsset (üksikraku geelelektroforeesi, edaspidi lihtsalt „komeedikats“) kasutatakse võimalike genotoksiliste materjalidega kokkupuutunud loomade, tavaliselt näriliste eri kudedest eraldatud rakkudes või rakutuumades DNA-ahelate katkemiste määramiseks. Paljud eksperdirühmad on komeedikatsse läbi vaadanud ja avaldanud oma soovitused (1–10). Käesolev katsemeetod on üks osa geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seerias. Välja on töötatud OECD dokument, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia katsetest ning ülevaade nende katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (11).

Komeedikatsse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis põhjustavad DNA kahjustusi. Leeliselises keskkonnas (pH > 13) saab komeedikatsse abil avastada DNA üksikahelalisi või kaksikahelalisi katkemisi, mis tulenevad näiteks kemikaali otsesest toimest DNA-le, leelise suhtes tundlikest kohtadest või ajutistest DNA katkemistest, mis on seotud DNA väljalõikereparatsiooniga. Need ahelate katkemised võidakse parandada, ilma et neist jääks püsimõju, need võivad olla raku jaoks surmavad või võib nende reparatsioon põhjustada mutatsiooni, mille tulemusel tekib elusrakus säiliv püsimuutus. Need võivad põhjustada ka kromosoomikahjustust, mis on seotud mitmete inimhaigustega, sealhulgas vähiga.

Närilistega tehtava *in vivo* komeedikatsse ametliku valideerimise katsed tehti aastatel 2006–2012, neid koordineeris alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) koostöös alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskusega (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomiteega (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) ja (Ameerika Ühendriikide) riikliku toksikoloogiaprogrammi (NTP) alternatiivsete toksikoloogiametodite ametitevahelise keskusega (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) (12). Käesolevas katsemeetodis on esitatud komeedikatsse soovituslik kasutusala ja piirangud, ning selle aluseks on valideerimiskatsetes kasutatud lõplik eeskiri (12) koos täiendavate asjakohaste avaldatud ja avaldamata (laboritele kuuluvate) andmetega.

Peamiste terminite määratlused on esitatud 1. liites. Tuleb märkida, et käesoleva katse tegemiseks on palju erinevaid tehnilisi lahendusi (mikroskoobi alusklaasid, geelilaigud, 96-kannulised plaadid jne). Mugavuse mõttes kasutatakse käesolevas dokumendis edaspidi mõistet „alusklaas“, kuid see hõlmab ka kõiki muid lahendusi.

**LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD**

Komeedikatsse on meetod, millega mõõdetakse DNA ahelate katkemisi eukarüootsetes rakkudes. Üksikrakud/-rakutuomad pannakse alusklaasile agarossi sisse ja lüüsitakse detergendi ning suure kontsentratsiooniga soolalahusega. Selle lüüsietapiga lõhutakse raku- ja tuumamembraanid ning vabastatakse spiraalselt keerdunud DNA-lingud, mida üldiselt kutsutakse nukleoidideks, ja DNA-fragmendid. Elektroforeesil suure pH tingimustes tekivad komeete meenutavad struktuurid, mida saab sobiva fluorestseeruva värvainega värvitult vaadelda fluorestsentsmikroskoopia abil; DNA-fragmendid liiguvad vastavalt oma suurusele komeedi „peast“ eemale „sabasse“ ning komeedi saba suhteline intensiivsus, võrreldes summaarse intensiivsusega (pea pluss saba), iseloomustab DNA katkemiste määra (13–15).

Leeliseline *in vivo* komeedikatsse on eriti asjakohane genotoksilise ohtlikkuse hindamisel, kuna selle katse tulemused sõltuvad *in vivo* imendumisest, jaotumisest, metabolismist ja eritumisest ning ka DNA reparatsiooni protsessidest. Need omadused võivad eri liikidel ja kudedel olla erinevad ja sõltuda ka DNA kahjustuse tüübist.

▼ M7

Loomade heaolu nõuete täitmiseks, eelkõige loomade kasutamise vähendamiseks (nn 3Ri – *Replacement, Reduction, Refinement* – ehk loomkatsete asendamise, vähendamise ja täiustamise põhimõtted) võib selle katse ühendada muude toksikoloogiauringutega, näiteks korduvdooosi toksilisuse uuringutega (10, 16, 17); samuti võib mõõdetavaid näitajaid kombineerida muude genotoksilisuse näitajatega nagu mikrotoomade tekke *in vivo* katse imetajate erütrotsüütidega (18–20). Kõige sagedamini tehakse komeedikatsed närilistega, kuigi seda on kasutatud ka muude imetajate ja mitteimetajate liikide puhul. Muude liikide kui närilised kasutamine peab olema teaduslikult ja eetilisel igal üksikjuhtumil põhjendatud ning soovitatakse tungivalt, et komeedikatsed ei kasutataks muudel loomaliikidel kui närilised eraldi katsena, vaid ainult kombineeritult muu toksilisuse uuringuga.

Kokkupuuteviisi ning uuritava koe valik peaks olema määratud kogu uuritava kemikaali kohta olemasoleva teabe põhjal, näiteks inimese kavandatud või oletatav kokkupuude, kemikaali metabolism ja jaotumine, toime võimalikkus kokkupuutekohas, struktuuriga seotud hoiatused, muud genotoksilisuse või toksilisuse andmed ning uuringu eesmärk. Seega võib vajaduse korral hinnata uuritava kemikaali genotoksilisust kantserogeense või muu toksilise toime sihtkoe suhtes. Seda peetakse kasulikuks ka *in vitro* katsega kindlaks tehtud mutageense mõju täiendaval uurimisel. *In vivo* komeedikatse tegemine huvipakkuva sihtkoega on asjakohane, kui võib põhjendatult eeldada, et huvipakkuv kude puutub piisavalt kemikaaliga kokku.

Katset on kõige põhjalikumalt valideeritud isaste rottide somaatilistes kudedes sellistes uuringutes nagu JaCVAMi uuring (12) ning Rothfussi jt artikkel aastast 2010 (10). JaCVAMi rahvusvahelises valideerimisuurinus kasutati maksa ja magu. Maksa kasutati seepärast, et see on kõige aktiivsemalt kemikaali metabolismis osalev elund ning sageli ka kantserogeenide sihtelund. Magu kasutati seepärast, et see on tavaliselt esimene kemikaaliga kokkupuutekoht pärast suukaudset manustamist, kuigi muid seedetrakti osi nagu kaksteistsõrmiksoolt või tühisoolt tuleks samuti pidada kemikaaliga kokkupuutekoha kudedeks, mis inimese seisukohast on vahest asjakohasemad kui näriliste näärmemagu. Tuleks jälgida, et koed ei puutuks kokku uuritava kemikaali ülemäära suure kontsentratsiooniga (21). Meetod on üldiselt kohaldatav igale koele, millest saab teha analüüsitavaid üksikrakkude või tuumade suspensioone. Mitme labori puhul nähtub intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetest, et katset saab edukalt kasutada paljude eri kudede puhul; samuti on palju avaldatud töid selle kohta, et see meetod töötab ka muude elundite ja kudede kui maks ja magu puhul, näiteks tühisoolle (22), neeru (23, 24), naha (25, 26) või kusepõie (27, 28) rakud, kopsude ja bronhoalveolaarse lavaaži rakud (mis on asjakohased sissehingatavate kemikaalide puhul) (29, 30); katseid on tehtud korraga ka mitme elundi rakkudega (31, 32).

Kuigi võib olla huvitav uurida genotoksilist mõju sugurakkudele, tuleb siiski märkida, et käesolevas katsemeetodis kirjeldatud standardset leeliselist komeedikatsed ei peeta sobivaks DNA katsete uurimiseks küpsetes sugurakkudes. Kuna kirjanduse ülevaates avaldati DNA-kahjustuste suured ja muutuvad tausttaseme väärtused komeedikatse kasutamise puhul sugurakkude genotoksilisuse uurimiseks (33), peetakse vajalikuks, et enne komeedikatse kasutamist küpsete sugurakkude (nt spermide) puhul tuleks katse-eeskirja selleks kohandada ning teha tõhusamaid standardimise ja valideerimise uuringuid. Peale selle ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ja soovitatud kokkupuuterežiim optimaalne, sest spermide DNA-ahelate katsete tähenduslikuks analüüsiks oleks vaja pikemat kokkupuudet või pikemaid proovivõtuaegu. Kirjanduses (34, 35) on kirjeldatud munandirakkudele diferentseerumise eri staadiumides avalduva genotoksilise toimet, mida on uuritud komeedikatse abil. Tuleks siiski märkida, et sugunäärmed sisaldavad somaatiliste ja sugurakkude segu. Seetõttu ei peegelda tervik-sugunäärme (munandi) positiivsed tulemused tingimata sugurakkude kahjustust; siiski näitavad need, et uuritav kemikaal ja/või selle metaboliidid on jõudnud sugunäärmesse.

▼ **M7**

Komeedikatse tavapärestes tingimustes ei ole usaldusväärselt võimalik kindlaks teha ristsidemeid. Teatavates muudetud katsetingimustes võib tuvastada DNA-DNA ja DNA-valgu ristsidemeid ning muid aluste muutusi nagu oksüdeeritud alused (23, 36–39). Kuid on vaja täiendavaid uuringuid, et piisavalt hästi kirjeldada, mis muudatusi tuleks meetodikas teha. Ristsidemeid põhjustavate ainete tuvastamine ei ole seega siinkirjeldatud katse peamine eesmärk. Katse, isegi muudatustega, ei sobi aneugeenide kindlakstegemiseks.

Praeguse teadmiste tasemega seoses on *in vivo* komeedikatsega seotud veel täiendavaid piiranguid (vt 3. liide). Eeldatakse, et katsemeetod vaadatakse tulevikus läbi ja seda muudetakse vajaduse korral, et võtta arvesse saadud kogemusi.

Enne meetodi kasutamist kavandatud regulatiivsel eesmärgil segu kohta andmete saamiseks tuleks kaaluda, kas, ja kui jah, siis miks võib see anda adekvaatseid tulemusi sellisel juhul. Selliseid kaalutlusi ei ole vaja, kui regulatiivse nõudega nähaksegi ette segu katsetamine.

**MEETODI PÕHIMÕTE**

Loomadele viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse asjakohase manustamise kaudu. Doosi valimise ja proovide võtmise üksikasjalik kirjeldus on esitatud punktides 36–40. Valitud proovivõtuajal (-aegadel) prepareeritakse huvi-pakkuv kude ja valmistatakse üksikrakkude/-rakutuumade suspensioonid (vajaduse korral võib kaaluda näiteks maksa *in situ* perfusiooni) ning alusklaasidel immobiliseerimiseks viiakse need pehmesse agarisse. Rakke/tuumi töödeldakse lüüsipuhvriga, et kõrvaldada raku- ja või tuumamembraanid, ning tugevalt leelise pH-ga, st  $\geq 13$ , et DNA keerduks lahti ning vabaneksid relakseerunud DNA-lingud ja -fragmendid. Tuuma DNA-le agaris tehakse seejärel elektroforees. Normaalsed fragmenteerumata DNA-molekulid jäävad agaris samale kohale, kus oli tuuma DNA, samas kui DNA-fragmendid ja relakseerunud DNA-lingud hakkavad liikuma anodi poole. Pärast elektroforeesi muudetakse DNA nähtavaks sobiva fluorestseeruva värviga. Preparaate tuleb analüüsida mikroskoobi abil, kasutades kas kujutise analüüsi pool- või täisautomaatset süsteemi. Elektroforeesi ajal migreerunud DNA määr ja liikumistee pikkus näitavad tekkinud DNA-fragmentide kogust ja suurust. Komeedikatse puhul määratakse mitut näitajat. DNA-kaajustuse hindamiseks on soovitatud kasutada sabas oleva DNA kogust (sabas oleva DNA % ehk saba intensiivsuse %) (12, 40–42). Pärast piisava arvu tuumade analüüsimist analüüsitakse andmeid asjakohaste meetoditega, et hinnata katse tulemusi.

Tuleks märkida, et meetodi eri aspektide muutmist, sealhulgas proovi ettevalmistamise, elektroforeesi tingimuste, visuaalse analüüsi parameetrite (nt värvimise intensiivsuse, mikroskoobilambi valguse intensiivsus, samuti mikroskoobifiltrite ja kaamera liikumise) ning keskkonnatingimuste (nt taustavalgustuse) muutmist on uuritud ja näidatud, et see võib mõjutada DNA migreerumist (43–46).

**LABORI PÄDEVUSE KONTROLLIMINE**

Iga labor peaks tõendama komeedikatse tegemise eksperimentaalset pädevust, milleks on vaja tõendada, et ta suudab iga kasutatava loomaliigi puhul saada iga sihtkoe üksikrakkude või -tuumade piisava kvaliteediga suspensioone. Preparaatide kvaliteeti hinnatakse eelkõige sabas oleva DNA % järgi vehiikuliga kokkupuutesse viidud loomade puhul – see % peab jääma reprodutseeritavalt väiksesse vahemikku. Praegused andmed näitavad, et rotimaksa rühma keskmine sabas oleva DNA % (põhineb mediaanide keskväärtsusel – vt nende terminite üksikasjalik selgitus punkt 57) ei tohiks ületada 6 %, mis on kooskõlas JaCVAMi valideerimiskatse (12) ning muude avaldatud ja intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetega. Praegu ei ole piisavalt andmeid soovitude andmiseks selle kohta, milline peaks olema parim või vastuvõetav vahemik muude kudede puhul. See ei välista muude kudede kasutamist, kui see on põhjendatud. Katseprotokollis tuleks esitada asjakohane ülevaade komeedikatse toimivusest nende kudede puhul

▼ **M7**

seoses kirjanduses avaldatud andmete või intellektuaalse omandi õigusega kaitstud andmetega. Esiteks on sabas oleva DNA % väike vahemik kontrollide puhul soovitatav sellepärast, et sellega jääb piisav dünaamiline vahemik positiivse mõju avastamiseks. Teiseks peab iga labor suutma korrata eeldatavaid vastuseid erineva toimemehhanismiga otseste mutageenide ja pro-mutageenidega, nagu on soovitatud tabelis 1 (punkt 29).

Positiivseid aineid võib valida näiteks JaCVAMi valideerimiskatses (12) või muudest avaldatud andmetest (vt punkt 9) ja kui asjakohane, lisada põhjendus ning näidata, et on saadud selged positiivsed vastused huvipakkuvate kudede puhul. Samuti tuleks näidata, et labor suudab määrata tuntud mutageeni, näiteks EMSi, väikese doosi põhjustatud nõrka toimet, milleks määratakse näiteks doosi-reaktsiooni seos vajaliku arvu ja sobivate intervallidega dooside põhjal. Esialgu tuleks keskenduda pädevuse tõendamisele kõige sagedamini kasutatavate kudede, nt näriliste maksa puhul, kus eeldatavaid tulemusi võib võrrelda olemasolevate andmetega (12). Samal ajal tuleks koguda andmeid muude kudede, näiteks mao/kaksteistsõrmiku/tühisoole, vere jne kohta. Labori pädevust tuleb tõendada eraldi iga loomaliigi iga koe puhul, mida kavatakse uurida, ning tuleb tõendada, et teadaoleva mutageeniga (näiteks EMSiga) saadakse kõnealuses koes aktsepteeritav positiivne reaktsioon.

Tuleb koguda vehiikuli/negatiivse kontrolli andmeid, et näidata negatiivse mõju korratavust ning tagada, et katse tehnilisi aspekte on nõuetekohaselt kontrollitud, või et saada teada vajadusest koostada uued varasemate kontrolli katsete vahemikud (vt punkt 22).

Tuleks märkida, et kuigi lahangu ajal võib võtta mitmeid kudesid ja töödelda neid komeedikatse tegemiseks, peab labor olema pädev mitmetest kudedest proovide võtmises samalt loomalt; sellega tagatakse, et ükski võimalik DNA-kahjustus ei lähe kaduma ja komeedikatse annab usaldusväärseid tulemusi. Ajavahemik eutanaasiast kuni kudede eemaldamiseni töötlemiseks võib olla kriitilise tähtsusega (vt punkt 44).

Käesoleva katsega seotud pädevuse arendamisel tuleb pidada silmas loomade heaolu ja seepärast võib katse mitmesuguste aspektides pädevuse saavutamiseks kasutada muudes katsetes kasutatud loomadelt saadud kudesid. Lisaks sellele ei pruugi olla vajalik viia läbi täielikku uuringut sel ajal, kui labor juurutab uut katsemeetodit; vajalike oskuste arendamiseks võib kasutada vähem loomi või uuritava kemikaali kontsentratsioone.

#### **Varasemad kontrolli andmed**

Pädevuse tõendamise uuringute ajal peab labor koostama varasemate tulemuste andmebaasi, et kehtestada positiivse ja negatiivse kontrolli tulemuste vahemikud ning jaotused asjakohaste kudede ja liikide puhul. Soovitused selle kohta, kuidas koostada ja kasutada varasemaid andmeid (st varasemate andmete andmebaasi lisamise või sealt väljajätmise kriteeriumid, varasemate andmete ja konkreetse katse nõuetekohasuse kriteeriumid) võib leida kirjandusest (47). Eri kudede, eri liikide, samuti eri vehiikulite ja manustamisviiside korral võib sabas oleva DNA % negatiivse kontrolli katses olla erinev. Seepärast on oluline määrata iga koe ja iga loomaliigi puhul negatiivse kontrolli väärtuste vahemik. Labor peab kasutama

▼ **M7**

kvaliteedikontrolli meetodeid, nagu kontrollkaardid (näiteks vastavuskontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (48)), et näha, kui varieeruvad on labori andmed, ja näidata, et meetod on laboris „kontrolli all“. Sobivate positiivse kontrolli ainete, doosivahemike ja eksperimendi tingimuste (näiteks elektroforeesi jaoks) valimist võib olla vaja ka optimeerida, et määrata nõrka toimet (vt punkt 17).

Iga muutust katse-eeskirjas tuleb kaaluda seoses nende ja labori olemasolevate varasemate kontrolli tulemuste andmebaasi kooskõlaga. Iga suurema vastuolu tekkimisel tuleb koostada uus varasemate kontrolli tulemuste andmebaas.

**MEETODI KIRJELDUS****Ettevalmistused***Loomaliigi valimine*

Harilikult kasutatakse tavaliste näriliste laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi (vanus 6–10 nädalat katse alguses, kuigi lubatud on ka veidi vanemad loomad). Näriliseligi valikul tuleks eelistada järgmisi liike: i) liik, mida kasutatakse muudes toksilise uuringutes (et andmeid saaks võrrelda ja uuringuid omavahel kombineerida), ii) liik, millel kantserogeensuse uuringus tekivad kasvaja (kantserogeensuse mehhanismi uurimisel), või iii) liik, mille puhul uuritava kemikaali metabolism on kõige asjakohasem inimese metabolismi seisukohast, kui see on teada. Käesolevas katses kasutatakse tavaliselt rotte. Siiski võib kasutada ka muid liike, kui see on eetilisel ja teaduslikult põhjendatud.

*Loomade pidamise ja söötmise tingimused*

Temperatuur katseloomade ruumis peab olema  $22 \pm 3$  °C. Suhteline õhuniiskus peaks ideaaljuhul olema vähemalt 50–60 %, seejuures vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Kasutatakse tehisvalgustust, valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut koos piiramatus koguses joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Närilisi tuleb pidada väikestes rühmades, kuni viis samast soost looma, kui ei eeldata agressiivset käitumist. Loomi võib ühekaupa pidada ainult siis, kui see on teaduslikult põhjendatud. Võimaluse korral tuleks alati kasutada kõva pinnaga põrandat, kuna metallvõrgust puuripõrand võib põhjustada raskeid vigastusi (49). Tuleb tagada sobivad keskkonna mitmekesistamise vahendid.

*Loomade ettevalmistamine*

Loomad jaotatakse kontroll- ja katserühmadesse juhuslikkuse alusel. Loomad märgistatakse kordumatu tähisega ja lastakse neid enne kemikaaliga kokkupuutumist vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda. Kordumatuks tähistamiseks tuleb kasutada kõige vähem invasiivset meetodit. Sobivad meetodid on röntgenamine, märgise kinnitamine, mikrokiipimine ja biomeetriline identifitseerimine. Varba kõndistamine ja kõrva sälkamine ei ole teaduslikult põhjendatud nende katsete puhul. Puurid paigutatakse nii, et nende asukohast tingitud võimalikud mõjud oleksid minimaalsed. Uuringu alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ja ei tohiks ületada  $\pm 20$  %.

*Dooside valmistamine*

Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas vehiikulis ja segada sööda sisse või joogivette enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat kemikaali võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela dispersse faasiga aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest (50, 51).



▼ **M7**

Tuleks kasutada uuritava kemikaali värsked valmistisi, kui kemikaali stabiilsuse andmetest ei ilmne, et säilitamine on aktsepteeritav ja on määratletud asjakohased säilitamistingimused.

**Katsetingimused***Vehiikul*

Vehiikul ei tohiks avaldada toksilist toimet kasutatava doosi ruumala korral ega keemiliselt reageerida uuritava kemikaaliga. Kui kasutatakse tuntud vehiikulist erinevat ainet, peab võrdlusandmetega olema näidatud, et see on sobiv nii katseloomade, manustamistee kui ka määratava näitaja seisukohast. Kui vähegi võimalik, on kõigepealt soovitatav kaaluda vesilahustuva lahusti/vehiikuli kasutamist. Tuleks märkida, et mõned (eriti viskoossed) vehiikulid võivad tekitada põletikku ja suurendada DNA-ahela katkete taustnivood kokkupuutekohas, eriti mitmekordse manustamise puhul.

**Kontrollid***Positiivsed kontrollid*

Praegusel ajal tuleks igas katses kasutada positiivse kontrolli rühma, milles on vähemalt 3 ühest soost analüüsivat looma või 3 looma kummastki soost, kui kasutatakse mõlemast soost loomi (vt punkt 32), kes viiakse kokkupuutesse positiivse kontrolli ainega. Tulevikus võib olla võimalik tõendada piisavat tehnilist pädevust ja vähendada vajadust positiivse kontrolli järele. Kui kasutatakse mitut proovivõtuaga (nt ühekordse manustamise eeskirja puhul), on vaja teha positiivse kontrolli katse ainult ühel proovivõtuajal, kuid tuleb tagada, et katseplaan oleks tasakaalus (vt punkt 48). Paralleelse positiivse kontrolli aineid ei ole tingimata vaja manustada samal viisil kui uuritavat kemikaali, kuid kui uuritakse paikset toimet kokkupuutekohas, siis on oluline kasutada sama manustamisviisi. Tuleb näidata, et positiivse kontrolli aine põhjustab DNA-ahela katkemist kõikides kudedes, mis on uuritava kemikaali puhul huvipakkuvad, ja kuna EMS põhjustab DNA-katkeid kõikides uuritud kudedes, on EMS tõenäoliselt hea positiivse kontrolli aine. Positiivse kontrolli doosid tuleks valida nii, et toime oleks mõõdukas, mis võimaldab kriitiliselt hinnata katse toimivust ja tundlikkust, ning dooside valik võiks põhineda doosi-toime kõveratel, mis labori koostanud pädevuse tõendamise ajal. Positiivse kontrolli loomade puhul peaks sabas oleva DNA % olema kooskõlas varem laboris iga koe ja iga proovivõtuaja jaoks kindlaks määratud vahemikuga (vt punkt 16). Positiivse kontrolli ained ja mõned näited nende sihtkudede kohta (näriliste puhul) on esitatud tabelis 1. Muud aineid kui tabelis 1 esitatud ained võib valida siis, kui see on teaduslikult põhjendatud.

*Tabel 1***Positiivse kontrolli ainete ja mõnede nende sihtkudede näited**

Aine ja CASi nr
Etüülmetaansulfonaat (CASi nr 62-50-0) – kõik koed
Etüülnitrosokarbamiid (CASi nr 759-73-9) – maks, magu, kaksteistsõrmik või tühisool
Metüülmetaansulfonaat (CASi nr 66-27-3) – maks, magu, kaksteistsõrmik või tühisool, kopsude ja bronhoalveolaarse lavaaži (BAL) rakud, neerud, kusepõis, kopsud, munandid ja luuüdi/veri
N-metüül-N'-nitro-N-nitrosoguanidiin (CASi nr 70-25-7) – magu, kaksteistsõrmik, tühisool
1,2-dimetüülhüdrasiin·2HCl (CASi nr 306-37-6) – maks ja sool
N-metüül-N-nitrosokarbamiid (CASi nr 684-93-5) – maks, luuüdi, veri, neerud, magu, tühisool ja aju.

▼ **M7***Negatiivsed kontrollid*

Negatiivse kontrolli loomade rühm, kellele manustatakse üksnes vehiikulit ja keda muus suhtes koheldakse samamoodi kui katserühmi, peab olema igas katses iga proovivõtuaja ja iga koe puhul. Negatiivse kontrolli loomade puhul peaks sabas oleva DNA % olema varem laboris selle loomaliigi iga koe jaoks ja iga proovivõtuaja jaoks kindlaks määratud vahemikus (vt punkt 16). Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrolli andmeid, mis näitavad, et valitud vehiikulil ei ole kahjulikku ega genotoksilist toimet samasuguse manustamiskordade arvu või manustamistee korral, tuleb vehiikuliga teha eelkatsed enne täieliku uuringu tegemist, et tõendada vehiikuli kontrolli vastuvõetavust.

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

Kuigi emasloomade kohta on olemas vähe andmeid selleks, et võrrelda komeedikatsede tulemuste põhjal omavahel sugusid, on muud genotoksilisuse *in vivo* toimed isas- ja emasloomadel üldiselt sarnased ja seepärast võiks enamiku katseid teha ükskõik kummast soost loomadega. Kui andmetest, sealhulgas doosivahe- miku määramise katse andmetest nähtuvad asjakohased erinevused isas- ja emasloomade vahel (nt süsteemse toksilisuse, metabolismi, biokättesaadavuse jne erinevused), tuleb katsetes kasutada kummastki soost loomi. Sellisel juhul võib olla asjakohane viia uuring läbi kummastki soost loomadega, näiteks korduvdoosi toksilisuse uuringu osana. Kui kasutatakse kummastki soost loomi, võib olla asjakohane teha katse mitut faktorit määrata võimaldava katseplani järgi. Üksik- asjad selle kohta, kuidas sellise katse andmeid analüüsida, on esitatud 2. liites.

Rühmade suurus uuringu alguses (ja pädevuse tõendamise ajal) tuleks seada eesmärgiga tagada igas rühmas vähemalt 5 analüüsitava ühest soost looma olemasolu või 5 kummastki soost looma olemasolu, kui kasutatakse kummastki soost loomi (paralleelses positiivse kontrolli rühmas võib olla vähem loomi, vt punkt 29). Kui inimese kokkupuude kemikaaliga on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse vastavast soost loomadega. Kui esitada mingi juhis loomadega seotud võimalikult tüüpiliste maksimumdooside kohta katses, mis tehakse vastavalt punktis 33 esitatud parameetritele kolme doosirühma ning paralleelsete negatiivse ja positiivse kontrolli rühmadega (igas rühmas on viis samast soost looma), siis kulub selleks 25–35 looma.

**MANUSTAMISKAVA**

Loomadele tuleks kemikaali manustada iga päev kahe või enama päeva jooksul (st kaks või enam manustamist ligikaudu 24 tunniste vaheaegadega); proovid võetakse üks kord pärast 2–6 tunni möödumist viimasest manustamisest (või ajal  $T_{max}$ ) (12). Lubatav on kasutada dooside pikaajalise manustamise (näiteks iga päev 28 päeva jooksul) režiimi korral saadavaid proove. On tõendatud, et komeedikatsed saab edukalt kombineerida erütrotsüütides mikrotoomade tekke katsega (10, 19). Hoolikalt tuleb siiski kaaluda komeedikatsede jaoks koeproovide võtmise logistika kokkusobivust muude toksikoloogiliste hindamiste jaoks koeproovide võtmise nõuetega. Proovide võtmine 24 tundi pärast viimase doosi manustamist, mis on tüüpiline üldise toksilisuse uuringute puhul, ei ole komeedikatsede puhul enamikul juhtudest vastuvõetav (vt punkt 40 proovivõtuaegade kohta). Muude annustamis- ja proovivõtukavade kasutamine peab olema põhjendatud (vt 3. liide). Näiteks ühekordset manustamist koos mitme proovi võtmisega võib kasutada, kuid tuleb siiski märkida, et ühekordse manustamisega uuringu jaoks on vaja rohkem loomi, kuna proove tuleb võtta eri ajavahemike tagant; mõnikord võib see olla eelistatav, nt siis, kui uuritav kemikaal on korduval manustamisel ülemäärane toksiline.

**▼ M7**

Olenemata katse tegemise viisist on see vastuvõetav, kui uuritav kemikaal põhjustab positiivse reaktsiooni, või negatiivse uuringu puhul, kui on otsesed või kaudsed tõendid sihtkoe või -kudede kokkupuutest, sihtkoele avalduvast toksilisusest või kui saavutatakse piirdoos (vt punkt 36).

Uuritavaid kemikaale võib manustada ka jagatud doosina, näiteks kaks doosi ühel päeval kuni 2–3-tunnise vahega, et hõlbustada suure ruumalaga koguse manustamist. Nimetatud asjaoludel peaks kavandatud proovide võtmise kord põhinema viimase doosi manustamise ajal (vt punkt 40).

**Doosid**

Vastavalt praegusele arusaamale doosivahemiku määramise uuringu tegemise kohta tuleks sellisel juhul, kui tehakse vahemiku määramise eeluuring, sest muude uuringutega ei ole saadud sobivaid andmeid vahemiku valimise hõlbustamiseks, teha uuring samas laboris, kasutades sama liiki, liini, samast soost loomi ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuuringus. Uuringu eesmärk on kindlaks määrata maksimaalne talutav doos (*maximum tolerated dose*, MTD), mis määratletakse doosina, mis põhjustab uuringu ajal vähest toksilist toimet (näiteks selgeid kliinilisi sümptomeid nagu ebaharilik käitumine või reaktsioonid, väike kehamassi langus või tsütotoksilisus sihtkoe suhtes), kuid mitte surma või sellist valu, piinlemist või kannatusi, mille puhul läheks vaja eutanaasiat. Mittetoksilise uuritava kemikaali puhul, kui manustamisaeg on 14 päeva või rohkem, on suurim (piir-) doos 1 000 mg / kehamassi kg kohta päevas. Kui manustamisaeg on lühem kui 14 päeva, on suurim (piir-) doos 2 000 mg / kehamassi kg kohta päevas. Teatud tüüpi uuritavate kemikaalide (näiteks inimravimid) puhul, millele kohaldatakse eripiiranguid, võivad need piirid olla teistsugused.

Kemikaalide puhul, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumist, või mis põhjustavad selliseid detoksifitseerimisprotsesse, mis võivad vähendada kokkupuudet pikaajalist manustamist, võib olla vajalik teha erandeid doosi määramise kriteeriumidest ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

Komeedikatse nii akuutse kui ka subakuutse toksilisuse versiooni puhul tuleb lisaks suurimale doosile (*maximum feasible dose*, MTD, maksimaalne kokkupuude või piirdoos) valida iga proovivõtuga jaoks kahanevas järjekorras veel vähemalt kaks doosiväärtust (mis eelistatavalt erinevad üksteisest vähem kui 10), et tõendada doosist sõltuvuse olemasolu. Kasutatavate doosidega tuleb siiski katta vahemik suurimast talutavast doosist kuni doosini, mis on vähetoksiline või mittetoksiline. Kui kõikide katses kasutatud dooside korral täheldatakse toksilisust sihtkoe suhtes, on soovitatav uurida veel mittetoksilisi doose (vt punktid 54–55). Kui uuringuga tahetakse põhjalikumalt uurida doosi-toime sõltuvuse kuju, võib olla vajalik lisada täiendavaid doosirühma(sid).

**Dooside manustamine**

Katse kavandamisel tuleks silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib lugeda põhjendatuks selliste kokkupuuteviiside valimist nagu toidu, joogivee või paikse pealekandmise kaudu, samuti nahaaluse, veenisisesse, suukaudse (toitmissondiga), inhalatsiooniga, intratrahheaalselt või implanteerimisega manustamise kaudu. Igal juhul tuleb manustamisviisi valida nii, et tagada sihtkoe (-kudede) piisav kokkupuude uuritava kemikaaliga. Intraperitoneaalset süstimist tavaliselt ei soovitata, kuna see ei ole inimese puhul tüüpiline kokkupuuteviis; seda võib kasutada ainult konkreetse põhjenduse olemasolul (nt mõned positiivse kontrolli ained, uurimiseesmärkidel või mõne ravimi korral, mida manustatakse intraperitoneaalselt). Vedeliku suurim kogus, mida saab toitmissondi kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Ruumala ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada ruumala 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema ruumala

▼ **M7**

kasutamise korral (kui see on lubatud loomade heaolu käsitlevate õigusaktidega) tuleb seda põhjendada. Alati kui võimalik tuleks eri doositasemed saavutada uuritava kemikaali kontsentratsiooni muutmiseiga manustatava lahuse koostises, et tagada kõikide dooside puhul lahuse ruumala ja kehamassi ühesugune suhe.

**Proovivõtu**

Proovivõtu on kriitilise tähtsusega muutuja, kuna see on määratud ajavahe-  
mikuga, mis on vajalik uuritava kemikaali maksimaalse sisalduse saavutamiseks  
sihtkoos ja DNA-ahela katkete tekkeks; samas tuleb proov võtta enne, kui katked  
kõrvaldatakse, parandatakse või kui rakk nende tõttu sureb. Mõned kahjustused,  
mis põhjustavad DNA-ahela selliseid katkemisi, mida saab määrata komeedik-  
sega, võivad olla väga lühiealised, vähemalt mõne kemikaali testimisel *in vitro*  
(52, 53). Kui kahtlustatakse selliseid ajutisi DNA-kahjustusi, tuleks võtta  
meetmed nende kaotamise vältimiseks; selleks tuleb kudedest proovid  
võtta piisavalt varakult, võib-olla varem kui pärast allpool esitatud vaiki-  
misi ajavahe-  
mike möödumist. Optimaalne proovivõtu võib sõltuda kemikaalist  
või manustamisest; näiteks võib sihtkoe kokkupuude alata kiiresti pärast veeni-  
kaudset manustamist või kokkupuudet sissehingamise kaudu. Seega tuleks proo-  
vivõtuajad määrata kineetiliste andmete alusel (nt aeg ( $T_{max}$ ), kui saavutatakse  
maksimaalne kontsentratsioon veres või koes ( $C_{max}$ ) või statsionaarse oleku  
saabumisel mitmekordse manustamise korral), kui kineetilised andmed on  
olemas. Kineetiliste andmete puudumisel on sobiv kompromiss võtta genotoksi-  
luse mõõtmiseks proovid 2–6 tundi pärast viimast manustamist kahe või enama  
manustamise korral või nii 2–6 tundi kui ka 16–26 tundi pärast ühekordset  
manustamist, kuigi tuleb jälgida, et kõik loomad lahataks ühel ja samal ajal pärast  
viimase (või ainsa) doosi manustamist. Sobiva proovivõtuaja määramiseks võib  
kasutada (selle olemasolul) ka teavet sihtorganitele avalduva toksilise toime aval-  
dumise kohta.

**Vaatlus**

Loomade tervise kliinilisi üldvaatlusi tuleb teha ja registreerida vähemalt üks  
kord päevas, soovitatavalt iga päev samal ajal, võttes arvesse pärast annustamist  
eeldatavate toimete kõrgperioodi (54). Haigestumise ja surmajuhtude tuvastami-  
seks tuleb kemikaali manustamise perioodil kõik loomad vähemalt kaks korda  
päevas üle vaadata. Pikema kestusega uuringute puhul tuleb kõiki loomi kaaluda  
vähemalt kord nädalas ja katse lõpus. Sööda tarbimist tuleb mõõta igal sööda  
vahetamisel ja vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse  
joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks  
kord nädalas. Loomad, kellel avalduvad ülemäärase toksilisuse sümptomid, mis  
ei ole surmavad, tuleb humaanselt hukata enne katse lõppu; selliseid loomi  
komeedikatses tavaliselt ei kasutata.

**Uuritavate kudede valimine**

Kuna DNA-ahelate katkemisi (komeete) on võimalik uurida praktiliselt iga koe  
puhul, peaks koe (kudede) valiku põhjendus olema selgelt määratletud ning  
põhinema uuringu tegemise eesmärgil, võttes arvesse ka kõiki olemasolevaid  
andmeid uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise,  
genotoksilisuse, kantserogeensuse ja muu toksilise toime kohta. Olulised tegurid,  
mida tuleks kaaluda, peaksid hõlmama vähemalt järgmist: uuritava kemikaali  
manustamisviis (põhineb inimeste tõenäoliselt kokkupuuteviisil), eeldatav jaotu-  
mine kudedes ja imendumine, metabolismi osatähtsus ja võimalik toimetehha-  
nism. Kõige sagedamini on uuritud maksa ja selle organi kohta on kõige rohkem  
andmeid. Seepärast, kui ei ole taustteavet ja ei ole määratletud konkreetset huvi-  
pakkuvat kude, on põhjendatud maksaproovide võtmine, kuna see on peamine

▼ **M7**

ksenobiootikumide metaboliseerimise koht ning intensiivses kokkupuutes nii lähteaine(te) kui ka metaboliidi(metaboliitidega). Mõnel juhul võib kõige asjakohasem olla uurida otsese kokkupuute kohta (nt kemikaali suukaudse manustamise korral näärmemagu, kaksteistsõrmik või tühisool; sissehingamise teel manustamise korral kopsud). Täiendavate või alternatiivsete kudede valimisel tuleks lähtuda katse tegemise konkreetsetest põhjustest, kuid kasulik võib olla ka sama looma mitme koe uurimine, kui labor on tõendanud pädevust uurida neid kudesid ja pädevust uurida neid samaaegselt.

**Proovide valmistamine**

Järgmistes punktides (44–49) kirjeldatud protsesside puhul on oluline, et kõiki lahuseid või stabiilseid suspensioone kasutataks enne nende kasutustähtaja lõppu või need oleksid vajaduse korral värskelt valmistatud. Järgmistes punktides on ajad, mis kuluvad i) iga koe eemaldamiseks pärast lahkamist, ii) igast koest raku/tuumade suspensiooni valmistamiseks ja iii) suspensiooni töötlemiseks ja alusklaaside valmistamiseks, kõik samuti kriitilise tähtsusega muutujad (vt mõisted, 1. liide) ja iga etapi läbimiseks vastuvõetav ajavahemik tuleb määrata katsemeetodi juurutamise ja pädevuse tõendamise katsete ajal.

Loomad hukatakse humaansel viisil, mis on kooskõlas loomade heaolu käsitlivate kehtivate õigusaktidega ning loomkatsete asendamise, vähendamise ja täiustamise põhimõtetega, sobival ajal pärast uuritava kemikaali viimast manustamist. Valitud kude (koed) eemaldatakse ning osa võetakse komeedikatses jaoks; samal ajal ja samast kohast tuleb lõigata samasugune osa koest ja panna formaldehüüdi lahusesse või muusse sobivasse fiksiivis võimaliku histopatoloogilise analüüsi jaoks (vt punkt 55) vastavalt standardmeetodile (12). Komeedikatses võetud kude pannakse peenestamispuhvrisse, loputatakse piisava põhjalikkusega külma peenestamispuhvriga, et eemaldada verejäägid ja hoitakse jääkülmas peenestamispuhvril kuni töötlemiseni. Võib kasutada ka *in situ* perfusiooni, nt maksa või neeru korral.

Rakkude/tuumade isoleerimise kohta on avaldatud palju meetodeid. Nende hulka kuuluvad maksa ja neerude puhul kasutatav peenestamine, mao-soolestiku puhul limaskestast kaapimine, homogeenimine ja ensüümidega lõhustamine. JaCVAMi valideerimisuuringus uuriti ainult isoleeritud rakke ja seepärast on seoses meetodi juurutamisega ja võimalikkusega viidata ja pädevuse tõendamise ajal JaCVAMi uuringule eelistatav kasutada isoleeritud rakke. Siiski on näidatud, et katse tulemustes ei olnud olulist erinevust, kui isoleeritud rakkude asemel kasutati tuumasid (8). Võrreldavad tulemused saadi ka siis, kui rakkude/tuumade isoleerimiseks kasutati eri meetodeid (nt homogeenimine, peenestamine, ensümaatilise lõhustamine või filtrimine läbi võrgu) (55). Järelikult võib kasutada kas isoleeritud rakke või isoleeritud tuumasid. Laboril tuleb põhjalikult hinnata ja valideerida üksikrakkude/-tuumade isoleerimise koospetsiifilised meetodid. Nagu on arutatud punktis 40, võivad mõned kahjustused, mis viivad DNA-ahela selliste katkemisteni, mida saab määrata komeedikatses, olla väga lühiajalised (52, 53). Seepärast on oluline, et olenemata üksikrakkude/-tuumade suspensiooni valmistamiseks kasutatavast meetodist töödeldaks koed pärast loomade eutanasiat võimalikult kiiresti ning säilitataks neid tingimustes, milles kahjustuste kõrvaldamine väheneks (nt koe hoidmine madalal temperatuuril). Rakususpensioone tuleks hoida jääkülmana kuni kasutamiseni, nii et eri proovide vahelised erinevused oleksid minimaalsed ja et positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadaks asjakohased tulemused.

▼ **M7****MIKROSKOOBIPREPARAATIDE VALMISTAMINE**

Mikroskoobipreparaadid tuleb valmistada võimalikult kiiresti (soovitavalt ühe tunni jooksul) pärast üksikrakkude/-tuumade proovi valmistamist, kuid loomade surma ja mikroskoobipreparaadi valmistamise vaheline aeg peab olema rangelt kontrollitud ja valideeritud iga labori tingimustes. Mikroskoobipreparaatide valmistamisel ei tohiks rakususpensiooni ruumala, mis lisatakse madala sulamispunktiga agarosile (tavaliselt 0,5–1,0 %), vähendada madala sulamistemperatuuriga agarosiooni osakaalu alla 0,45 %. Optimaalne rakkude tihedus määratakse kujutise analüüsi süsteemi abil, mida kasutatakse komeetide hindamisel.

**Lüüsimine**

Ka lüüsimistingimused on kriitilise tähtsusega muutuja ja võivad takistada selliseid ahelakatkemisi, mis tulenevad teatud tüüpi DNA-muutustest (teatavad DNA alküülimised ja aluseaduktid). Seepärast on soovitatav, et lüüsimistingimused oleksid võimalikult ühesugused katse kõikide preparaate valmistamisel. Kui preparaadid on valmis, tuleb alusklaasid panna jahutatud lüüsimislahusesse vähemalt üheks tunniks (või järgmise hommikuni) temperatuuril ligikaudu 2–8 °C nõrga valgustuse (nt kollane valgus) tingimustes (või täielikus pimeduses), et vältida kokkupuudet valge valgusega, mis võib sisaldada UV-komponente. Pärast seda inkubatsiooniperioodi tuleks alusklaasid loputada, et eemaldada detergendi jäägid ja soolad, enne kui alustatakse leeliselise lahtikeerdumise etappi. Seda võib teha puhastatud vee, neutraliseerimispuhvri või fosfaatpuhvri abil. Kasutada võib ka elektroforeesipuhvrit. See säilitaks leeliselised tingimused elektroforeesikambris.

**Lahtikeerdumine ja elektroforees**

Alusklaasid tuleks panna juhuslikus järjestuses elektroforeesiseadme platvormile, mis on täielikult kaetud elektroforeesilahusega ja milles lahust on nii palju, et alusklaasid oleksid kogu aeg täielikult lahusega kaetud (ka katva kihi paksus peaks eri katsetes olema ühesugune). Komeedikatse tegemisel teist tüüpi elektroforeesiseadmetes, st aktiivse jahutamise, jahutusvee tsirkulatsiooni ja suure võimsusega toiteallika abil, põhjustab paksem lahusekiht suurema voolutugevuse, kui pinget hoitakse samasugune. Alusklaaside panemisel elektrolüüsivanni tuleks kasutada tasakaalustatud lahendust, et leevendada igasuguste trendide või äärefektide mõju ühes elektrolüüsivannis ja vähendada ka eri vannide kasutamisest tulenevat varieeruvust; see tähendab, et igas elektrolüüsikatses peab olema ühesugune arv alusklaase igalt uuringus kasutatud loomalt ja ühesugune arv proove igast doosirühmast, negatiivse ja positiivse kontrolli rühmast. Alusklaasid tuleks jätta vähemalt 20 minutiks lahusesse, et DNA keerduks lahti ning seejärel tehakse elektroforees kontrollitud tingimustes, millega katse tundlikkus ja dünaamiline vahemik viiakse maksimumini (et saavutada negatiivse ja positiivse kontrolli puhul sabas oleva DNA protsendi vastuvõetav tundlikkust maksimeeriv tase). DNA migreerumise tase on lineaarselt seotud elektroforeesi kestusega ja ka pingepotentsiaaliga (V/cm). JaCVAMi uuringu põhjal võiks pingepotentsiaal olla 0,7 V/cm vähemalt 20 minuti jooksul. Elektroforeesi kestust loetakse kriitilise tähtsusega muutujaks ja elektroforeesi aeg tuleks valida nii, et dünaamiline vahemik oleks optimaalne. Pikem elektroforeesi aeg (nt 30 või 40 minutit, et saavutada maksimaalset tundlikkust) põhjustab tavaliselt tugevama positiivse toime teadaolevate mutageenide puhul. Kuid pikk elektroforeesiaeg võib põhjustada ka kontrolli proovide ülemäärast migreerumist. Iga katse puhul tuleks kasutada ühesugust pinget ning muude näitajate varieerumine peaks olema teadaolevas kitsas vahemikus; näiteks JaCVAMi uuringus põhjustas pingepotentsiaal

▼ **M7**

0,7 V/cm lähtevoolutugevuse 300 mA. Puhverlahusekihi paksust tuleks kohandada, et saavutada vajalikud tingimused ja hoida neid kogu katse vältel. Voolutugevus elektroforeesi alguses ja lõpus tuleb registreerida. Seepärast tuleb labori algsete pädevuse tõendamise katsete ajal määrata iga uuritava koeliigi jaoks optimaalsed tingimused. Elektroforeesilahuse temperatuur kogu lahtikeerdumise ja elektroforeesi ajal peab olema madal, tavaliselt 2–10 °C (10). Elektroforeesilahuse temperatuur lahtikeerdumise alguses, elektroforeesi alguses ja lõpus tuleb registreerida.

Pärast elektroforeesi lõppu tuleb alusklaasid panna neutraliseerimispuhvrisse või neid sellega loputada vähemalt 5 minutit. Geele võib värvida ja hinnata „värskelt“ (nt 1–2 päeva jooksul) või need võib veetustada hilisemaks hindamiseks (nt 1–2 nädalat pärast värvimist) (56). Need tingimused peavad siiski olema valideeritud pädevuse tõendamise ajal; samuti tuleb koguda varasemaid andmeid ning säilitada need eraldi iga tingimuste komplekti jaoks. Viimasel juhul tuleks alusklaasid dehüdrateerida paigutamiseks absoluutsesse etanooli vähemalt 5 minutiks, lasta kuivada õhu käes ja hoida seejärel kas toatemperatuuril või külmikus kuni hindamiseni.

**Mõõtmismeetodid**

Komeete tuleb hinnata kvantitatiivselt, kasutades automaatset või poolautomaatset kujutiseanalüüsi süsteemi. Mikroskoobipreparaadid värvitakse sobiva fluoresteeruva värvainega, nagu SYBR Gold, Green I, propiidiumjodiid või etiidumbromiid ja mõõdetakse sobiva suurendusega (nt 200 korda) epifluorestsentsmikroskoobiga, mis on varustatud vajalike detektoritega või digikaameraga (nt CCD).

Rakud võib liigitada kolme kategooriasse, nagu on kirjeldatud komeedikujutiste atlas (57), nimelt hindamiskõlblik komeet, hindamist mitte võimaldav ja „siil“ (*hedgehog*, vt edasine arutelu, punkt 56). Artefaktide vältimiseks tuleb sabas oleva DNA % määramiseks hinnata ainult hindamiskõlblikke rakke (millel on selgelt määratletud pea ja saba ning mida ei mõjuta segavalt naaberrakud). Katseprotokollis ei ole vaja esitada andmeid selle kohta, kui palju oli hindamist mitte võimaldavaid rakke. Nn siilide sagedus tuleks kindlaks määrata nende visuaalse hindamise põhjal (kuna selgelt määratletud pea puudumine tähendab, et kujutise analüüsiga võivad need jääda tuvastamata) vähemalt 150 raku hulgas ühe proovi kohta) (vt edasine arutelu, punkt 56) ja registreerida eraldi.

Kõik alusklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult ja neid hinnatakse „pimesi“, nii et hindaja ei tea proovi töötlemise tingimusi. Iga proovi kohta (ühe looma ühe koe kohta) tuleb analüüsida vähemalt 150 raku (välja arvatud nn siilid, vt punkt 56). Smithi jt (2008) (5) analüüsi kohaselt annab piisava statistilise võimsuse 150 raku hindamine vähemalt 5 looma puhul igas doosirühmas (väiksema loomade arvu juures samaaegse positiivse kontrolli rühmas, vt punkt 29). Kui kasutatakse alusklaase, tuleks hinnata 2–3 alusklaasi proovi kohta, kui kasutatakse viiest loomast koosnevaid doosirühmi. Alusklaasil tuleb vaadelda mitut piirkonda, kus rakkude tihedus tagab selle, et sabad ei kattu. Alusklaasi serval asuvate alade hindamist tuleb vältida.

DNA-ahelate katkemisi komeedikatses võib mõõta erinevate sõltumatute näitajate järgi, sabas oleva DNA %, saba pikkus ja saba moment. Sobiva kujutiste analüüsi tarkvarasüsteemi abil võib mõõta kõik kolm näitajat. Siiski soovitatakse hindamiseks ja tulemuste tõlgendamiseks kasutada sabas oleva DNA protsenti (nimetatakse ka saba intensiivsuse protsendiks) (12, 40–42), mis määratakse sabas olevate DNA-fragmentide intensiivsuse järgi ja väljendatakse protsendina raku summaarsest intensiivsusest (13).

▼ **M7****Koekahjustus ja tsütotoksilisus**

Komeedikatse positiivsed tulemused ei pruugi olla tingitud üksnes genotoksilisusest; DNA migreerumise suurenemist võib põhjustada ka sihtkoe suhtes avalduv toksilisus (12, 41). Ja vastupidi, teadaolevate genotoksiinide korral võidakse täheldada madalat või mõõdukat tsütotoksilisust (12), mis tõendab, et komeedikatse üksinda ei võimalda eristada genotoksilisusest tingitud DNA migreerumise sellisest DNA migreerumisest, mille põhjustab tsütotoksilisus. Ent sellisel juhul, kui täheldatakse DNA migreerumise suurenemist, on soovitatav, et määrataks ka tsütotoksilisuse üks või mitu näitajat, kuna see võib aidata tulemusi tõlgendada. Kui koos DNA migreerumise suurenemisega esinevad selged tõendid tsütotoksilisusest tuleks suurenemise tõlgendamisel olla ettevaatlik.

Tsütotoksilisuse mõõtmiseks on soovitatud palju meetodeid ja nendest peetakse histopatoloogiliste muutuste uurimist koe suhtes avalduva toksilisuse määramise asjakohaseks meetodiks. DNA suurenenud migreerumisega seostatakse selliseid leide nagu põletik, rakkude infiltratsioon, apoptootilised või nekrootilised muutused, kuid nagu näitas JaCVAMi valideerimisuring (12), ei ole olemas selliste histopatoloogiliste muutuste kindlat loendit, mis oleksid alati seotud DNA migreerumise suurenemisega. Muutused kliinilise keemia näitajates (nt AST, ALT) võivad samuti anda kasulikku teavet koekahjustuste kohta ning kaaluda võib ka täiendavaid näitajaid, nagu kaspasi aktiveerumine, värvumine TUNELiga, värvumine aneksiin V-ga jne. Vähe andmeid on avaldatud siiski viimaste kasutamise kohta *in vivo* uuringutes ja mõned neist võivad olla vähem usaldusväärsed kui teised.

Nn siilid (või „pilved“ (*clouds*), „kummitusrakud“ (*ghost cells*)) on rakud, mille mikrokoobikujutisel on väike pea või seda ei olegi ning suured hägusad sabad; neid peetakse tugevasti kahjustatud rakkudeks, kuigi „siilide“ tekkimise põhjused on ebaselged (vt 3. liide). Nende välimuse tõttu ei ole sabas oleva DNA % mõõtmised kujutise analüüsi abil usaldusväärsed ja seetõttu tuleks „siile“ hinnata eraldi. „Siilide“ esinemine tuleb märkida ja esitada protokollis ning kõiki asjakohaseid suurenemisi, mida seostatakse uuritava kemikaali mõjuga, tuleks analüüsida ja tõlgendada ettevaatlikult. Teadmised uuritava kemikaali võimaliku toimemehhanismi kohta võivad aidata selliseid tulemusi tõlgendada.

**KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE****Andmete töötlemine**

Katsehik on üks loom ja seepärast tuleb tabelitena esitada nii andmed iga üksiku looma kohta kui ka koondandmed. Andmete hierarhilise olemuse tõttu soovitatakse iga alusklaasi puhul määrata sabas oleva DNA protsendi mediaanväärtus ja iga looma puhul arvutada mediaanväärtuste keskvärtus (12). Seejärel leitakse üksikloomade keskvärtuste keskmine iga doosirühma jaoks. Kõik need väärtused tuleb esitada katseprotokollis. Võib kasutada ka alternatiivseid lähenemisviise (vt punkt 53), kui see on teaduslikult ja statistiliselt põhjendatud. Statistilise analüüsi võib teha mitmesuguste lähenemisviiside abil (58–61). Kasutatava statistilise meetodi valimisel tuleb kaaluda, kas andmeid on vaja teisendada (näiteks logaritmine või ruutjuurteisendus) ja/või kas on vaja liita kõikidele (ka nullist erinevatele) arvudele mingi väike arv (nt 0,001), et leevendada nulliga võrduvate rakuväärtuste mõju, nagu on kirjeldatud eespool nimetatud viidetes. Üksikasjalikud juhendid, kuidas analüüsida töötlustega seotud ja soospetsiifilise muutujate interaktsioone, kui katses kasutatakse mõlemast soost loomi, ning saadud andmete edasist analüüsi, kui neis leitakse või ei leita erinevusi, on esitatud 2. liites. Protokollis tuleks esitada ka andmed toksilisuse kohta ja kliinilised sümptomid.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

Katse nõuetekohasuse tunnistamine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- a. Samaaegne negatiivse kontrolli katse loetakse nõuetekohaseks ja vastuvõetavaks labori varasemate negatiivse kontrolli katsete andmebaasi kandmiseks vastavalt punktis 16 kirjeldatud kriteeriumidele.



**▼M7**

- b. Samaaegne positiivse kontrolli katse (vt punkt 29) peab kutsuma esile sellise mõju, mis on kooskõlas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaasi kohase mõjuga ja peaks endast kujutama statistiliselt olulist suurenemist, võrreldes samaaegse negatiivse kontrolli katse tulemusega.
- c. Analüüsitud on piisav arv rakke ja doose (vt punktid 52 ja 36–38).
- d. Suurima doosi valiku kriteeriumid vastavad punktis 36 kirjeldatutele.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

Tingimused et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui:

- a. vähemalt ühe uuritud doosi korral on leitud statistiliselt oluline suurenemine võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga,
- b. suurenemine sõltub doosist, kui seda hinnatakse sobiva trendikatsesega,
- c. kõik tulemused on väljaspool varasemate katsete negatiivse kontrolli tulemuste jaotusvahemikku konkreetse liigi, vehiikuli, manustamisviisi, koe ja manustamiskordade arvu puhul.

Kui kõik need tingimused on täidetud, loetakse uuritav kemikaal võimeliseks põhjustama DNA-ahelate katkemisi kudedes, mida uuriti kõnealuses katsesüsteemis. Kui ainult üks või kaks neist kriteeriumidest on täidetud, vt punkt 62.

Tingimused et kõik katse nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui:

- a. mitte ühegi uuritud kontsentratsiooni juures ei leitud statistiliselt olulist suurenemist võrreldes samaaegse negatiivse kontrolliga,
- b. ei esine kontsentratsioonist sõltuvat suurenemist, kui seda hinnatakse sobiva trendikatsesega,
- c. kõik tulemused on varasemate katsete negatiivse kontrolli tulemuste jaotusvahemikus konkreetse liigi, vehiikuli, manustamisviisi, koe ja manustamiskordade arvu puhul,
- d. on esitatud otsesed või kaudsed tõendid, mis tõendavad sihtkoe kokkupuudet uuritava kemikaaliga või selle toksilisust sihtkoe suhtes.

Uuritav kemikaal loetakse sellisel juhul võimetuks põhjustama DNA-ahelate katkemisi kudedes, mida uuriti kõnealuses katsesüsteemis.

Selgelt positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja kinnitada.

Kui vastus ei olnud selgelt negatiivne ega selgelt positiivne (s.t mitte kõik punktides 59 või 60 loetletud kriteeriumid ei olnud täidetud) ning selleks, et aidata kindlaks teha tulemuste bioloogilist olulisust, tuleb andmeid hinnata eksperdihindanguga ja/või teha täiendavaid uuringuid, kui see on teaduslikult põhjendatud. Kasulik võib olla täiendavate rakkude hindamine (vajaduse korral) või korduskatse tegemine optimeeritud tingimuste kasutamisega (nt doosiintervallid, muud manustamisviisid, muud proovivõtuajad või muud koed).

Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust positiivse või negatiivse tulemuse kohta; sel juhul loetakse tulemus ebaselgeks.

**▼M7**

Positiivse või ebaselge tulemuse bioloogilise olulisuse hindamiseks on vaja teavet tsütotoksilisuse kohta sihtkoe suhtes (vt punktid 54–55). Kui positiivseid või ebaselgeid tulemusi täheldatakse üksnes selgete tsütotoksilisuse tõendite esinemise puhul, tuleb uuring lõpetada järeltulemusega, et teave genotoksilisuse kohta on ebaselge, välja arvatud juhul, kui on olemas piisav teave, mis toetaks lõplikku järeldust. Kui uuringu tulemus on negatiivne, kuid iga uuritud doosi korral avalduvad toksilisuse tunnused, võib olla soovitatav teha täiendav uuring mittetoksilise doosiga.

**Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet:

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, kui on olemas;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kasutamise lõpptähtaeg või kordusanalüüsi tegemise tähtaeg, kui see on teada.

*Ühe koostisosaga aine:*

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, SMILES või InChi kood, struktuurivalem, puhtus, lisandite keemiline määratlus vajaduse ja praktilise teostatavuse korral jne.

*Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid (UVCB) ja segud:*

- iseloomustatakse võimaluse korral koostisainete keemiliste nimetuste kaudu (vt eespool), kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste füüsikalised-keemiliste omaduste kaudu.

*Lahusti/vehiikul:*

- lahusti/vehiikuli valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja stabiilsus lahustis/vehiikulis, kui on teada;
- teatava koostisega dooside valmistamine;
- osutatud koostisega doosidega tehtud analüüsid (nt stabiilsus, homogeensus, nominaalsed kontsentratsioonid).

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin ja selle valimise teaduslik ja eetiline põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine, keskkonna rikastamine jne;
- iga looma mass katse alguses ja lõpus, sh kehamassi vahemik, keskväärtnus ja standardhälve iga rühma kohta.

*Katsetingimused:*

- positiivse ja negatiivse (vehiikuli/lahusti) kontrolli andmed;

**▼ M7**

- doosivahemiku määramise uuringu tulemused, kui see tehti;
- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritud kemikaali preparaadi valmistamise üksikasjad;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamistee põhjendus;
- süstimiskoht (subkutaanse ja intravenoosse uuringu puhul);
- proovide valmistamise meetodid, kui kasutati, histopatoloogiliste analüüside meetodid, eriti kemikaali puhul, mis põhjustas komeedikatses positiivse tulemuse;
- koe valimise põhjendused;
- meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis sihtkoesse või üldvereringesse, kui saadi negatiivsed tulemused;
- tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja selles uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) järgi, kui asjakohane;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused (nt toksiko-kineetilised andmed, kui kättesaadavad);
- valu leevendamise meetod, analgeesia;
- eutanaasia meetod;
- kudede eraldamise ja säilitamise kord;
- üksikrakkude/-tuumade suspensiooni valmistamise meetodid;
- kõikide reaktiivide allikad ja partiinumbrid (võimaluse korral);
- tsütotoksilisuse hindamise meetodid;
- elektroforeesi tingimused;
- kasutatud värvimismeetodid; ning
- komeetide hindamise ja mõõtmise meetodid.

*Tulemused:*

- iga looma üldkliiniline vaatlus enne katset ja kogu katse ajal;
- tõendid tsütotoksilisuse kohta, kui selliseid katseid tehti;

▼ M7

- rohkem kui üks nädal kestnud uuringu puhul: iga looma kehamass kogu katse ajal, sh iga rühma kohta kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve; sööda tarbimine;
- doosi-toime seos, kui esineb;
- iga koe ja looma kohta, sabas oleva DNA % (või muud valitud näitajad) ja mediaanväärtused iga alusklaasi puhul, keskväärtused iga looma puhul ja rühma keskväärtus;
- paralleelsed ja varasemad negatiivse kontrolli andmed, nende vahemikud, keskväärtused/mediaanväärtused ja standardhälbed iga hinnatud koe puhul;
- paralleelsed ja varasemad positiivse kontrolli andmed;
- muu koe kui maksa puhul doosi-toime vahelise sõltuvuse kõver positiivse kontrolli kemikaaliga. Selle võib võtta pädevuse tõendamise uuringuga kogutud andmetest (vt punktid 16–17) ja sellega koos peab olema esitatud põhjendus, koos viidetega olemasolevale kirjandusele, selle kohta, kas toime ulatus ja tulemuste hajuvus sobivad kontrollide tulemuste puhul kõnealuse koe jaoks;
- kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid; ning kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeriti positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;
- „siilide“ sagedus iga rühma ja iga looma kohta.

*Tulemuste arutelu**Kokkuvõte**Viited*

## KIRJANDUS

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), „Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*“, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114–32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), „The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing“, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245–54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), „Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31–5.
- (4) Burlinson, B. (2012), „The *in vitro* and *in vivo* Comet assays“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143–63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), „Recommendations for design of the rat Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233–40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), „Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45–51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), „The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review“, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47–63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), „Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206–21.

▼ M7

- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), „A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells“, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184–91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), „Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies“, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40–69.
- (11) OECD (2016), „Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015.“ ENV Publications. *Series on Testing and Assessment* No. 234, OECD, Paris.
- (12) OECD (2014), „Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens“, *Series on Testing and Assessment*, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), „Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay“, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86–94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), „The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans“, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207–14.
- (15) Collins, A.R (2004), „The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations“, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249–61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), „Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108–20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), „Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing“, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), „Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation“, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187–99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), „Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test“, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7–19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), „Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol“, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149–62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), „Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract“, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621–3.
- (22) Hartmann, A. (2004), „Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations“, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51–9.
- (23) Nesslany, F. (2007), „*In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28–41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), „A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175–8.

▼ M7

- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), „Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175–80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), „Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay“, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240–9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), „A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26–30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), „Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51–9.
- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), „*In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31–5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), „Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring“, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486–500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), „The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database“, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629–799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), „Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay“, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53–74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), „The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity“, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3–12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), „Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice“, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275–282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), „Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation“, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443–451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), „Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167–72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), „Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196–201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), „Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165–81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), „Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay“, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267–282.

▼ M7

- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), „Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals“, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7–16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), „Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup“, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31–5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), „Comet Assay measurements: a perspective“, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53–64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), „The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments“, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689–95.
- (44) Möller, P. *et al.* (2010), „Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group“, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109–11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), „Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial“, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113–23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), „Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions“, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41–45.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), „Compilation and use of genetic toxicity historical control data“, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87–90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) *Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* (ETS No. 123)
- (50) Käesoleva lisa peatükk B.8. *Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring.*
- (51) Käesoleva lisa peatükk B.29. *Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring.*
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), „Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells“, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141–45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), „The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells“, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35–41.
- (54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, *Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment* No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), „Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay“, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50–4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), „Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp. 45–51.
- (57) *Atlas of Comet Assay Images*, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), „Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies“, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109–19.

**▼ M7**

- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), „Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167–75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), „Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay“, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485–93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), „Statistical issues in the use of the Comet assay“, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171–82.



**▼ M7***1. liide***MÕISTED**

**Kemikaal** – aine või segu.

**Komeet** – nukleoidide kuju pärast elektroforeesi, sarnasuse põhjal komeetidega: pea on tuum ja saba koosneb DNAs, mis on migreerunud tuumast välja elektrivälja toimel.

**Kriitilise tähtsusega muutuja/näitaja** – see on meetodikapõhine muutuja, mille väike muutus võib avaldada suurt mõju katse lõppjärel dusele. Kriitilise tähtsusega muutujad võivad olla koespetsiifilised. Kriitilise tähtsusega muutujaid ei tohiks muuta, eriti ühe katse piires, võtmata arvesse, kuidas nende muutmine mõjutab katses uuritavat reaktsiooni, näiteks positiivse ja negatiivse kontrolliga saadud reaktsiooni ulatust ja varieeruvust. Katseprotokollis tuleks loetleda kõik kriitilise tähtsusega muutujate muutmised katse käigus või võrreldes labori tavaliise katse-eeskirjaga ning esitada iga muutmise põhjendus.

**Leeliseline üksikrakkude geelelektroforees** – tundlik meetod esmase DNA-kahjustuse määramiseks üksikraku/-rakutuuma tasandil.

**Saba intensiivsus või sabas oleva DNA protsent (%)** – see kujutab endast komeedi saba suhtelist intensiivsust, võrreldes summaarse intensiivsusega (pea ja saba kokku). See peegeldab DNA-ahela katkete hulka, mis on väljendatud protsendina.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

▼ **M7**

## 2. liide

**MITME FAKTORI MÄÄRAMIST VÕIMALDAV KATSEPLAAN  
SUGUDEVAHELISTE ERINEVUSTE KINDLAKSTEGEMISEKS IN  
VIVO KOMEEDIKATSES****Mitme faktori määramist võimaldav katseplaan ja selle analüüs**

Selle katseplaani korral kasutatakse vähemalt 5 isas- ja 5 emaslooma igal kontsentratsioonitasemel, seega vähemalt 40 looma (20 isas- ja 20 emaslooma, millele lisatakse asjakohased positiivse kontrolli katsed).

Kõnealune katseplaan on üks lihtsamaid mitme faktori analüüsi katseplaanide ja see on samaväärne kahefaktorilise dispersioonanalüüsiga, milles peamised faktorid on sugu ja kontsentratsioonitase. Andmete analüüsimiseks võib kasutada paljusid statistikatarkvara standardpakette, nt SPSS, SAS, STATA, Genstat, samuti võib kasutada R-keskkonda.

Analüüsiga jagatakse andmete dispersioon osadeks: sooga seotud dispersiooniks, kontsentratsiooniga seotud dispersiooniks ja dispersiooniks, mis on seotud soo ja kontsentratsiooni interaktsiooniga. Igaühte nendest liikmetest võrreldakse dispersiooni hinnanguga katses kasutatud samasooliste loomade rühmades samal kontsentratsioonil. Aluseks oleva meetoodika täielikud üksikasjad on esitatud paljudes standardsetes statistikaõpikutes (vt viited) ja statistikapakettide help-funktsiooni juhendites.

Analüüsis uuritakse edasi interaktsiooniliiget (sugu × kontsentratsioon) ANOVA tabelis<sup>(1)</sup>. Olulise interaktsiooniliikme puudumise korral annavad sugudevahelised või kontsentratsioonitasemete vahelised kombineeritud väärtused tasemete vahel kehtivad statistilised testid, mis põhinevad ANOVA rühmasisesel koondatud dispersiooni liikmel.

Analüüsi järgmises etapis jaotatakse kontsentratsioonidevahelise dispersiooni hinnang kontrastideks, millega saab testida kemikaali mõju tulemuste lineaarseid kontraste ja ruutkontraste kõigil kontsentratsioonitasemetel. Kui on olemas oluline interaktsioon (sugu × kontsentratsioon), võib ka selle liikme eraldada lineaarse interaktsiooni × sugu kontrastiks ja ruutinteraktsiooni × sugu kontrastiks. Need liikmed kujutavad endast statistilisi teste selle kohta, kas kemikaali mõju on mõlema soo puhul paralleelne või on kemikaalil eri sugudele erinev mõju.

Ühe rühma piires koondatud dispersiooni hinnangut saab kasutada keskväertuste erinevuse paariviisilisteks testideks. Neid võrdlusi võiks teha kahe soo keskväertuste vahel ja eri kontsentratsioonitasemete keskväertuste vahel, näiteks võrrelda eri kontsentratsioonitasemete keskväertusi negatiivse kontrolli väärtustega. Juhul, kui esineb oluline interaktsioon, võib võrrelda samast soost loomade puhul eri kontsentratsioonidega saadud tulemuste keskväertusi või eri sugudest loomade puhul sama kontsentratsiooniga saadud tulemuste keskväertusi.

**Viited**

Paljudes statistikaõpikutes käsitletakse lihtsast kahe faktori analüüsist kuni katsemeetoodika mudelite keerukamate vormideni ulatuvat mitmefaktoriliste mudelite teooriat, katseplaanide, meetoodikat, analüüsi ja tõlgendamist, mida on kasutatud katsemeetoodika kavandamisel. Järgmine loetelu ei ole ammendav. Mõnes raamatus esitatakse võrreldavate katseplaanide praktilised näited, mõnel juhul koos koodiga, kuidas analüüsida tulemusi mitmesuguste tarkvarapakettide abil.

<sup>(1)</sup> Statistikud, kes kasutavad modelleerimist, näiteks üldisi lineaarseid mudeleid (General Linear Models, GLM), võivad samale analüüsile läheneda teisel, kuid võrreldaval viisil; seejuures ei tarvitse nad tingimata tuletada traditsioonilist ANOVA tabelit, mis pärineb veel arvuticelsest ajastust, kui statistilisi näitajaid arvutati algoritmiliste lähenemisviiside abil.

▼ M7

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. ja Hunter, J.S. (1978), *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York; John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. ja Draper, N.R. (1987), *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons.
- (3) Doncaster, C.P. ja Davey, A.J.H. (2007), *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.
- (4) Mead, R. (1990), *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.
- (5) Montgomery D.C. (1997), *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.
- (6) Winer, B.J. (1971), *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.
- (7) Wu, C.F.J ja Hamada, M.S. (2009), *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons.



## 3. liide

## KATSEMETODI PRAEGUSED PIIRANGUD

Praeguse teadmiste seisu juures on *in vivo* komeedikatsesega seotud mitmed piirangud. Loodetakse, et need piirangud vähenevad või neid saab kitsamalt määratleda, kui meetodi rakendamise saadakse rohkem kogemusi selle kohta, kuidas katse võimaldab õiguslikus kontekstis anda vastuseid ohutusega seotud küsimustele.

1. Mõnda tüüpi DNA-kahjustused võivad olla lühiajalised, st need võidakse parandada liiga kiiresti selleks, et neid saaks vaadelda veel 24 tundi või rohkem pärast viimase doosi manustamist. Ei ole kindlaks tehtud lühiajaliste kahjustuste tüüpide loetelu, samuti ei ole selliste kemikaalide loetelu, mis võivad põhjustada selliseid kahjustusi, samuti ei ole teada, millise aja jooksul seda tüüpi kahjustusi saab tuvastada. Optimaalne proovivõtuaeg võib oleneda kemikaalist või kokkupuuteviisist ja proovivõtuajad tuleks määrata kineetilistest andmetest (näiteks aeg  $T_{max}$ , mille saavutatakse suurim kontsentratsioon vereplasmas või koes), kui sellised andmed on kättesaadavad. Enamikus käesoleva katsemeetodi aluseks olnud valideerimisuuringutes on kasutatud lahkamisaega 2 või 3 tundi pärast viimase doosi manustamist. Enamikus kirjanduses avaldatud uuringutes on viimane doos manustatud 2–6 tundi enne surmamist. Nende kogemuste põhjal soovitati seepärast katsemeetodis, et kui ei ole andmeid muude aegade kasuks, tuleks viimane doos manustada kindlaksmääratud ajahetkel vahemikus 2–6 tundi enne lahkamist.
2. Ei ole konkreetseid uuringuandmeid selle kohta, kas katse tundlikkus lühiajaliste DNA-kahjustuste kindlakstegemisel sõltub sööda või joogiveega manustamisest, võrreldes manustamisega toitmissondi abil. Kindlaks on tehtud DNA-kahjustused pärast sööda ja joogiveega manustamist, kuid teateid selliste katsete kohta on suhteliselt vähe; palju rohkem on kogemusi toitmissondiga ja intraperitoneaalse manustamise kohta. Seega võib katse tundlikkus olla vähenenud sööda või joogivee kaudu manustatavate kemikaalide puhul, mis tekitavad lühiajalisi kahjustusi.
3. Laboritevahelisi võrdlusuuringuid ei ole tehtud muude kudede kui maksa ja mao puhul, seepärast ei ole koostatud soovitusi, kuidas saavutada tundlikkust ja reprodutseeritavaid tulemusi muude kudede kui maksa puhul, nagu eeldatavaid positiivse ja negatiivse kontrolli vahemiku väärtusi. Ka maksa puhul ei saavutatud kokkulepet, milline peaks olema negatiivse kontrolli väärtuse alampiir.
4. Kuigi on olemas hulk avaldatud artikleid, milles näidatakse, et *in vitro* tsütotoksilisus avaldab segavat toimet, on olemas väga vähe *in vivo* andmeid ja seepärast ei saa soovitada ühtainsat tsütotoksilisuse näitajat. DNA suurenenud migreerumisega seostatakse selliseid histopatoloogilisi muutusi nagu põletik, rakkude infiltratsioon, apoptootilised või nekrootilised muutused, kuid nagu nähtus JaCVAMi valideerimisuuringust (OECD, 2014), ei põhjusta need muutused alati komeedikatses positiivseid tulemusi ja seega ei ole olemas selliste histopatoloogiliste muutuste kindlat loendit, mis oleksid alati seotud DNA migreerumise suurenemisega. Nn siile (või „pilvi“, „kummitusrakke“) on varem välja pakutud tsütotoksilisuse näitajatena, kuid nn siilide tekkimise etioloogia on ebaselge. On andmeid, mis viitavad sellele, et need võivad olla tingitud kemikaaliga seotud tsütotoksilisusest, mehhaanilisest/ensümaatilisest kahjustusest proovi valmistamise ajal (Guerard jt, 2014) ja/või uuritava kemikaali mingist äärmuslikumast genotoksilisest toimest. Teistest andmetest nähtub, et need tulenevad ulatuslikest, kuid võib-olla parandatavatest DNA-kahjustustest (Lorenzo jt, 2013).

▼ **M7**

5. Kudesid või rakkude tuumasid on edukalt külmutatud hilisemaks analüüsiks. Tavaliselt põhjustab see mõõdetava toime vehiikuli ja positiivse kontrolli katses (Recio jt, 2010; Recio jt, 2012; Jackson jt, 2013). Kui seda kasutatakse, peaks labor tõendama kompetentsust külmutamismeetodite suhtes ja kinnitama, et selliste katseloomade sihtkoos, kellele on manustatud vehiikulit, saavutatakse vastuvõetavalt madal sabas oleva DNA protsent ja et võib siiski veel määrata ka positiivseid vastuseid. Kirjanduses on kirjeldatud kudede külmutamise eri meetodeid. Paraku puudub praegu kokkulepe selle kohta, kuidas kudesid kõige paremini külmutada või sulatada ja kuidas hinnata, kas kemikaali toime võimalik muutumine võib mõjutada katse tundlikkust.
6. Üks hiljutine töö näitab, et kriitilise tähtsusega muutujate loetelu eeldatavasti lüheneb ja kriitiliste muutujate parameetreid saab täpsemini määratleda (Guerard jt, 2014).

**Viited**

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), „Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114–21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), „Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring“, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699–707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), „The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead“, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427–32.
- (4) OECD (2014), „Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens“, *Series on Testing and Assessment*, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), „Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol“, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), „Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101–13.

▼ **M8****B.63. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURING**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 421 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 421 võeti vastu 1995. aastal ühe esialgse reprodutiivtoksilisuse sõeluuringu katse-eeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).
2. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järeelmeelsetena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamiseks (3). Näiteks täiendati 2008. aastal OECD katsejuhendit nr 407 (käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel“) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 421 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arengu- perioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).
3. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 421 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reprodutiivtoksilisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (4).
4. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügooti arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B.35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

## LÄHTEKAALUTLUSED

5. Käesolevat sõeluuringumeetodit võib kasutada paljunemisvõimele ja/või arengule avalduva võimaliku mõju kohta esialgse teabe saamiseks kas kemikaalide toksikoloogiliste omaduste hindamise varajases etapis või probleemsete kemikaalide uurimisel. Seda võib kasutada ka osana esialgsete sõeluuringute seeriast, mille abil hinnatakse olemasolevaid kemikaale, mille kohta on vähe või ei ole üldse toksikoloogilisi andmeid, samuti ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajana (5).

## ▼M8

6. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgselt kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud loomade suhteliselt väikesest arvust annuserühmades, lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheledatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.
7. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (6) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 421 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekreetsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekreetsioonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.
8. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.
9. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumine ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
10. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelset päeval (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vaja teha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isaslooma sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheledatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.
12. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsükli), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümne päeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.
13. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiselele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).

**▼M8**

14. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisnähitudes suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

**MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

15. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui käesolevas katsemeetodis kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtutud OECD katsejuhendist nr 407 (see vastab käesoleva lisa peatükile B.7), kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle 20 % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

**Pidamis- ja söötmingimused**

16. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C ( $\pm$  3 °C). Ehkki suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, on sobivaim vahemik 50–60 %. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötamiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatul kogusel joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.
17. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.
18. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokollil lõpliku valmimiseni alles hoida.

**Loomade ettevalmistamine**

19. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad idenditakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

**Annuste ettevalmistamine**

20. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muud manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.



**▼M8**

21. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

**KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

22. Soovitatavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seejärel on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F<sub>1</sub>-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani.

**Annused**

23. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Annuste valimisel võib lähtuda ägeda mürgisuse hindamise katsetega saadud andmetest või korduvannustamisel põhinevate uuringute tulemustest. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.
24. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järk-järgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja teha väikseima annuse põhjal kindlaks täheldatava kahjuliku toime puudumise annuse (NOAEL). Sageli on optimaalne vähenevate annuste vaheline erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.
25. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju siseselektsioonisteedega seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

**Piirsalduskatse**

26. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees, ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga struktuurilt sarnaste ainetega saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirsalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suukaudsel manustamisel suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni.

## ▼M8

**Annuste manustamine**

27. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maosondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katses kasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.
28. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärasest toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna.

**Katse ajakava**

29. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada vähemalt kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemisele kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummaski soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.
30. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamisele päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taaslustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.
31. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

**Paaritamine**

32. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1: 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad suurema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

▼ **M8****Pesakonna suurus**

33. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurst korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummastki soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse hindamiseks.
34. Kui pesakonna suurst ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärme-hormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase emaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse hindamiseks.

**Elusloomadel tehtavad vaatlused***Kliinilised vaatlused*

35. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks kogu uuringuperioodi vältel teha vähemalt kord päevas ja mürgisusnähtude ilmnemisel sagedamini. Vaatlusi tuleks soovitatavalt teha igal päeval samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärgse eeldatava mõju maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida asjakohased muutused käitumises, raskele või kauakestnud sünnitusele viitavad ilmingud ja kõik mürgisusnähud, sealhulgas suremus. Registreeritavad andmed peaksid hõlmama mürgisusnähtude esinemise algusaega, ulatust ja kestust.

*Kehamass ja sööda/vee tarbimine*

36. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.
37. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

*Innatsükkel*

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsükli ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 22). Tupeäiged tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi

**▼M8**

laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelsel perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäiged ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (7, 8).

*Järglastega seotud näitajad*

39. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sünni võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.
40. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale punktis 35 kirjeldatud vaatluste tulemuste tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.
41. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglaste suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (9). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisa-de/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (10).

**Kliiniline biokeemiline analüüs**

42. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:
  - igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 33–34),
  - kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning
  - kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T<sub>4</sub>) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T<sub>4</sub> sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitatavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T<sub>4</sub> ja TSH) üldsisaldust.

43. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:
  - surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;
  - surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;
  - hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.

## ▼M8

44. Konkreetset hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvvaartused on müügil olevate eri katsekomplektide puhul erinevad.

**Patoloogiline analüüs***Täielik lahkamine*

45. Surmatud või uuringu vältel surnud täiskasvanud loomi tuleks kohe pärast surma makroskoopiliselt uurida mis tahes kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohtade arv. Lahkamispäeva hommikul tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist munasarja histopatoloogilise analüüsi tulemustega.
46. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärukotsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumise toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist.
47. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata välistele suguelunditele, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes. Kolmeteistkümnendal sünnijärgsel päeval tuleks võtta säilitamiseks kilpnääre iga pesakonna ühelt isaselt ja ühelt emaselt järglaselt.
48. Samuti tuleks säilitada kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), kilpnääre ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid. Munandite ja munandimanuste tavapärasel analüüsil ei soovitata kasutada fikseerimist formaliiniga. Nende kudede puhul võib vastuvõetava meetodina kasutada Bouini fikseerimislahust või muudetud Davidsoni lahust (11). Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõiela läbi torgata.

*Histopatoloogiline analüüs*

49. Suurima annusega töödeldud rühma ja kontrollrühma loomade puhul tuleks viia läbi munasarjade, munandite ja munandimanuste üksikasjalik histoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele ja munandite interstitsiaalrakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka teisi säilitatud elundeid, sealhulgas järglastelt ja täiskasvanud loomadelt saadud kilpnääret. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse muutusi, peaks analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave sise-sekretsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (11).

▼ **M8****ANDMED JA ARUANDLUS****Andmed**

50. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnenisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikult osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.
51. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuva väärtuste jaotuse analüüsiks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Ühtlasi võib rühmade väikesusest tulenevalt olla kasulik kasutada uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks varasemaid kontrollidega saadud andmeid (nt pesakonna suuruse kohta), kui need on olemas.

**Tulemuste hindamine**

52. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelunditele avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõimele ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.
53. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse kohta), kui need on olemas.
54. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrollle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

**Katseprotokoll**

55. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

— allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;

— uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;

**▼M8**

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

*Kandaine (vajaduse korral):*

- kandaine valimise põhjendus, kui kandaine ei ole vesi.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

*Katsetingimused:*

- annuste valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

*Tulemused:*

- kehamass / kehamassi muutused;
- söödatarbimine ja veetarbimine andmed, kui need on olemas;
- mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;
- tiinuse kestus;
- mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;
- kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöördumus või pöördumatus);
- normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;
- elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;
- järglaste kehamassi andmed;
- iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);

**▼M8**

- nisade esinemine isastel järglastel;
- kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);
- silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv, väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;
- katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;
- pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;
- andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;
- lahkamistulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);
- vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

*Tulemuste arutelu**Järeldused***Tulemuste tõlgendamine**

56. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel täheledatavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju (vt punktid 5 ja 6). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja hõlbustavad järgnevat uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (12). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu näri-listega tehtavate sisekretsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (11) esitatud teabest (sisekretsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

**KIRJANDUS**

- (1) OECD (1990). Kemikaalide töörühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reproduktiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (3) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 217. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.



**▼M8**

- (6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.
- (8) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.
- (9) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383–390.
- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 151. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

**▼M8***1. liide*

## MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (6))

Androgeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus – manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt T<sub>3</sub>) toimet.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradioli) toimet.

Arengutoksilisus – reprodutiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avaldud mürgisus – tiinele emasloomale avaldud kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju).

Ilmne mürgisus – üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal – aine või segu.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reprodutiivtoksilisus – kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemiskõhale või paljunemisevõimele.

Türeoidne aktiivsus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T<sub>3</sub>).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamise seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetsel eesmärgil kasutamiseks.

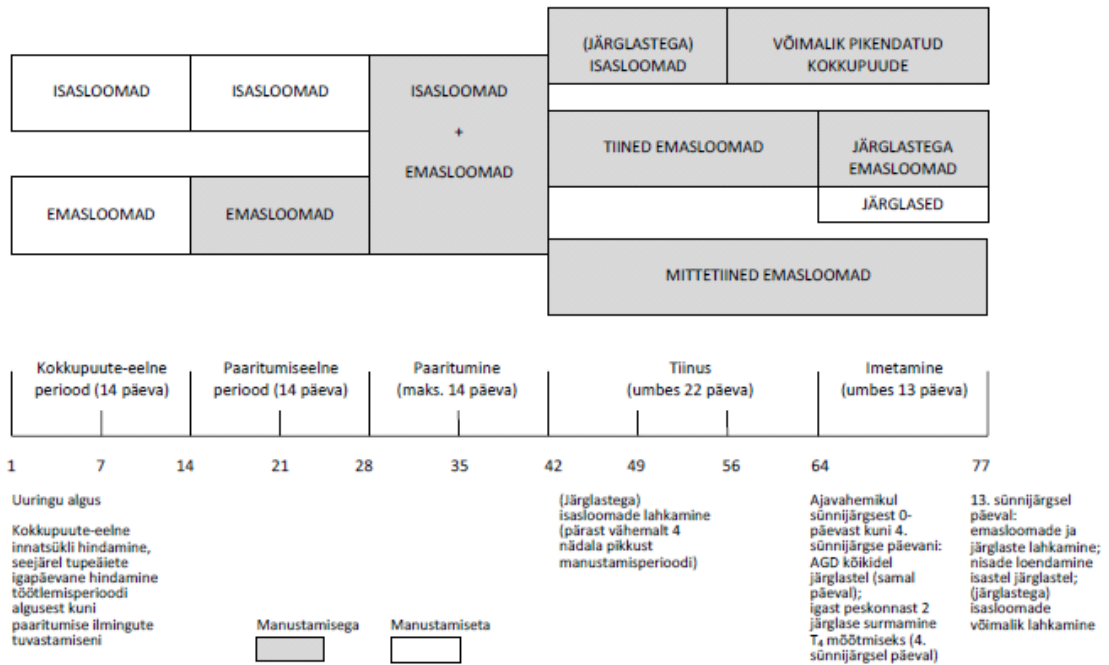
Viljakuse vähenemine – isas- või emasloomade paljunemiskõhale häire või paljunemisevõime langus.

Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β-östradiol).

## ▼ M8

## 2. liide

## UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA



▼ **M8**

## 3. liide

TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE AVALDUVA MÕJU KOHTA

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Paaride arv katse alguses ( <i>N</i> )					
Innatsükkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid ( <i>N</i> )					
Tiinestunud emasloomad ( <i>N</i> )					
Eostunud 1.–5. päeval ( <i>N</i> )					
Eostunud 6.–... ( <sup>1</sup> ) päeval ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus 22 päeva ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva ( <i>N</i> )					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad ( <i>N</i> )					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad ( <i>N</i> )					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					
Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					

▼ **M8**

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Annus (ühik)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					
<b>KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED</b>					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on $\geq 2$ kõrvalekalletega järglast					
<b>JÄRGLASTE KADU</b>					
<b>Sünnieelne/pesastumisjärgne (pesastunud embrüote arvu ja elusündide arvu vahe)</b>					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
$\geq 3$ järglast kaotanud emasloomad					
<b>Sünnijärgne (elusündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)</b>					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
$\geq 3$ järglast kaotanud emasloomad					
(!) Paaritusperioodi viimane päev.					

## ▼M8

**B.64. REPRODUKTIIV-/ARENGUTOKSILISUSE SÕELUURINGUT HÕLMAV KORDUVANNUSTAMISEL PÕHINEV MÜRGISUSUURING**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 422 (2016). Kemikaalide uurimist käsitlevaid OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengu arvessevõtmiseks korrapäraselt läbi. Algne sõeluuringut käsitlev katsejuhend nr 422 võeti vastu 1996. aastal ühe reprodutiiv-/arengutoksilisuse hindamist hõlmava korduvannustamisel põhineva sõeluuringu katseeskirja põhjal, mida arutati kahel ekspertide koosolekul, mis toimusid 1990. aastal Londonis (1) ja 1992. aastal Tokyos (2).
2. Käesoleva katsemeetodi puhul on reprodutiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring, mis põhineb liikmesriikides suures mahus toodetavate olemasolevate kemikaalide hindamiseks kasutatud algse meetodiga omandatud ja positiivseid kontrollaineid hõlmavatest ettevalmistavatest katsetest saadud kogemustel (3, 4), ühendatud korduvannustamisel avalduva mürgisuse uuringuga, mis on kooskõlas OECD katsejuhendiga nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7 „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring näriistel“).
3. Käesolevat katsemeetodit on ajakohastamise eesmärgil täiendatud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivate lõppnäitajatega, mis lisati järeelmeetmena lähtuvalt prioriteetsest tegevussuunast, mille OECD käivitas 1998. aastal eesmärgiga vaadata läbi olemasolevad ja töötada välja uued katsejuhendid, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist (5). Selles kontekstis täiendati 2008. aastal katsejuhendit nr 407 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.7) parameetritega, mis sobivad uuritavate kemikaalide endokriinse toime tuvastamiseks. Katsejuhendi nr 422 ajakohastamise eesmärk oli lisada sõeluuringut käsitlevasse juhendisse teatavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida saab hinnata juhul, kui kokkupuuteperiood hõlmab mõnda tundlikku arenguperioodi (sünnieelset või varajast sünnijärgset perioodi).
4. Peale selle lisati katsejuhendisse nr 422 täiendavad endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimiseks sobivad lõppnäitajad, mida sisaldab ka katsejuhend nr 443 (sellele vastab käesoleva lisa peatükk B.56 „Laiendatud ühe põlvkonna reprodutiivtoksilisuse uuring“); need lõppnäitajad valiti lähtuvalt ühest teostatavusuuringust, milles käsitletakse asjaomaste lõppnäitajate lisamisega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi, ning võimalikust vajadusest katsemeetodit nende lisamiseks kohandada (6).
5. Käesolev katsemeetod on kavandatud piiratud hulga andmete saamiseks uuritava kemikaali mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügooti arengule ja sünnitamisele. See ei ole ette nähtud kasutamiseks olemasolevate katsemeetodite B.31, B.34, B.35 või B.56 alternatiivina ega nende asendamiseks.

## LÄHTEKAALUTLUSED

6. Uuritava kemikaali mürgisust põhjustavate omaduste kindlakstegemiseks ja hindamiseks võib teha korduval suukaudsel manustamisel avalduva mürgisuse uuringu pärast seda, kui ägeda mürgisuse katsetest on saadud esialgsed andmed kemikaali mürgisuse kohta. Käesoleva meetodi kohane uuring võimaldab saada teavet võimalike terviseohtude kohta, mis avalduvad suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul toimuva korduva kokkupuute tagajärjel. Käesolev meetod hõlmab lihtsat korduvannustamisel põhinevat mürgisusuuringut, mida võib kasutada kemikaalide jaoks, mille puhul 90-päevase uuringu tegemine ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismahud ei ületa teatavat piiri), või eeluuringuna enne pikaajalise uuringu läbiviimist. Uuringu tegemisel tuleks järgida juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19, milles käsitletakse ohutuse hindamiseks kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kindlakstegemist, hindamist ja kasutamist humaanse sekkumise vajadusele viitavate näitajatena (7).

## ▼M8

7. Peale selle hõlmab käesolev katsemeetod ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuringut ning seepärast saab seda ühtlasi kasutada uuritava kemikaali toksikoloogiliste omaduste hindamise varajases etapis või probleemse kemikaali uurimisel esialgse teabe saamiseks võimaliku mõju kohta isas- ja emasloomade paljunemisvõimele, näiteks sugunäärmete talitlusele, paaritumiskäitumisele, eostumisele, sügoidi arengule ja sünnitamisele. Käesolev katsemeetod ei võimalda saada ammendavat teavet kõikide paljunemisvõime ja arenguga seotud aspektide kohta. Eelkõige lubab see tuvastada sünnieelse kokkupuute tagajärjel sünnijärgselt avalduvaid ilminguid ja sünnijärgsest kokkupuutest tulenevat mõju üksnes piiratud ulatuses. Käesoleva meetodiga ei saa koguda tõendeid, mis lubaksid lõplikult kinnitada paljunemisele/arengule avalduva mõju puudumist; see on muu hulgas tingitud lõppnäitajate selektiivsusest ja uuringu lühikesest kestusest. Täheledatavaid positiivseid tulemusi aga on võimalik muudest reproduktiiv-/arengutoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta.
8. Sisesekretoonisüsteemiga seotud näitajaid käsitlevaid tulemusi tuleks vaadelda endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (8) kontekstis. Nimetatud kontseptuaalses raamistikus on OECD täiendatud katsejuhendi nr 422 kohast meetodit käsitatud 4. taseme *in vivo* meetodina, mis võimaldab saada andmeid sisesekretoonisüsteemiga seotud lõppnäitajate kaudu tuvastatava kahjuliku mõju kohta. Sisesekretoonisüsteemist sõltuvat signaali ei pruugita eraldi võetuna siiski pidada piisavaks tõendiks selle kohta, et uuritava kemikaali puhul on tegemist endokriinfunktsiooni kahjustava kemikaaliga.
9. Käesoleva katsemeetodi puhul pööratakse ühtlasi suurt tähelepanu konkreetse lõppnäitajana vaadeldavale neuroloogilisele mõjule ja rõhutatakse loomade hoolika kliinilise jälgimise vajadust, et saada võimalikult palju teavet. Meetod peaks võimaldama teha kindlaks kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse, mida võib olla vaja täiendavalt põhjalikumalt uurida. Peale selle võib käesoleva meetodiga saada esialgset teavet immunoloogilise mõju kohta.
10. Täheledatavaid positiivseid tulemusi on võimalik muudest süsteemse mürgisuse, reproduktiiv-/arengutoksilisuse, neurotoksilisuse ja/või immunotoksilisuse uuringutest saadavate andmete puudumisel kasutada esialgseks ohuhindamiseks ning need aitavad teha otsuseid täiendavate uuringute tegemise vajaduse ja selliste uuringute ajastuse kohta. Katse tulemused võivad olla eriti kasulikud OECD sõeluuringute andmekogumi (SIDS) osana selliste olemasolevate kemikaalide hindamisel, mille kohta on vähe toksikoloogilist teavet või see puudub, ning sellist katset saab kasutada kahe eraldi katse asemel, milles hinnatakse vastavalt korduvannustamisel avalduvat mürgisust (OECD katsejuhend nr 407, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.7) ja reproduktiiv-/arengutoksilisust (OECD katsejuhend nr 421, mis vastab käesoleva lisa peatükile B.63). Samuti võib seda kasutada ulatuslikumate paljunemisvõimet/arengut käsitlevate uuringute jaoks annusevahemiku kindlaksmääramiseks ning muudel asjakohaseks peetavatel juhtudel.
11. Üldjuhul eeldatakse, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus on erinev. Seepärast võib kõnealuses ühendkatses kahe eraldi katse läbiviimisega võrreldes olla keerulisem teha kindlaks sobivad annusemäärad, mis võimaldaksid üheaegselt hinnata nii üldist süsteemset mürgisust kui ka konkreetset reproduktiiv-/arengutoksilisust. Peale selle võib üldise süsteemse mürgisusega seotud katsetulemuste tõlgendamine olla raskem kui korduvannustamisel põhineva eraldi katse tegemisel, eriti juhul, kui seeruminäitajaid ja histopatoloogilisi näitajaid ei analüüsita uuringus üheaegselt. Nende tehniliste aspektide keerukusest tulenevalt nõuab kõnealuse ühendatud sõeluuringu

## ▼M8

- läbiviimine ulatuslikke kogemusi mürgisuse hindamisel. Teisest küljest võimaldab selline ühendkatse peale väiksema arvu loomade kasutamise paremini eristada paljunemisele/arengule avalduvat otsest mõju mõjust, mis ilmneb muu (süsteemse) mõju tagajärjel.
12. Käesoleva meetodi puhul on manustamisperiood pikem kui tavapärasel 28-päevases korduvannustamisel põhinevas uuringus. Samal ajal on kummastki soost loomade arv igas rühmas väiksem kui olukorras, kus peale tavapärase 28-päevase korduvannustamisel põhineva uuringu tehakse veel ka reproduktiiv-/arengutoksilisuse sõeluuring.
  13. Käesoleva katsemeetodi puhul eeldatakse, et uuritavat kemikaali manustatakse suu kaudu. Muu manustamisviisi kasutamise korral võib olla vaja teha meetodis muudatusi.
  14. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
  15. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

16. Uuritavat kemikaali manustatakse astmeliselt suurenevates annustes mitme rühma isas- ja emasloomadele. Isasloomade puhul peaks manustamine toimuma vähemalt nelja nädala kestel kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani, sealhulgas surmamiseelsetel päevadel (see hõlmab vähemalt kahte paaritumiseelset nädalat, paaritumisperioodi ja umbes kahte paaritumisjärgset nädalat). Kuna isasloomadel on paaritumiseelne manustamisperiood piiratud kestusega, ei pruugi viljakus olla eriti tundlik munanditele avalduva mürgisuse näitaja. Seepärast on vajateha munandite üksikasjalik histoloogiline analüüs. Kahe nädala pikkust paaritumiseelset manustamisperioodi koos järgneva paaritumise/viljakuse jälgimisega ning manustamisperioodi üldkestusega vähemalt neli nädalat, millele järgneb isaslooma sugunäärmete üksikasjalik histopatoloogiline analüüs, peetakse enamiku isasloomal täheldatavate viljakusele ja spermatogeneesile avalduva mõju ilmingute tuvastamiseks piisavaks.
17. Emasloomade puhul peaks manustamine toimuma kogu uuringu kestel. See hõlmab kahte paaritumiseelset nädalat (eesmärk on jälgida vähemalt kahte tervet innatsükli), eostumisele eelnevat varieeruva pikkusega ajavahemikku, tiinuse kestust ja vähemalt kolmeteistkümnepäeva pikkust sünnitusjärgset perioodi, mis kestab kuni kavandatud surmamispäevale eelneva päevani ja hõlmab ka surmamiseelset päeva.
18. Kohanemisperioodile ja innatsükli manustamiselele hindamisele järgneva uuringu kestus sõltub emasloomade seisundist ning on umbes 63 päeva (vähemalt 14 päeva pikkune paaritumiseelne periood, (kuni) 14 päeva pikkune paaritumisperiood, 22 päeva pikkune tiinusperiood ja 13 päeva pikkune imetamisperiood).
19. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt mürgisusnähtude suhtes. Uuringu kestel surnud või surmatud loomad lahatakse ning uuringu lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.



**▼M8****MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

20. Käesolev katsemeetod on kavandatud kasutamiseks rotil. Kui katsejuhendis nr 422 kirjeldatud näitajaid hinnatakse mõne muu liigi närilistel, tuleks seda üksikasjalikult põhjendada. Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis, mille puhul on lähtunud katsejuhendist nr 407, kasutati ainsa liigina rotte. Ei tohiks kasutada liine, kus sigivus on väike või kus teadaolevalt esineb sageli arenguhäireid. Tuleks kasutada terveid varem paaritamata loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomi tuleks iseloomustada liigi, liini, soo, kehamassi ja vanuse järgi. Uuringu alguses peaksid kasutatavate loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ning mitte üle  $\pm 20$  % kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui uuring viiakse läbi pikaajalise või tervet põlvkonda hõlmava uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus soovitatavalt kasutada samast liinist ja sama päritolu loomi.

**Pidamis- ja söötmistingimused**

21. Kõik katsetoimingud peaksid vastama kohalikele laboriloomade hooldamise normidele. Katseloomade ruumi temperatuur peaks olema 22 °C ( $\pm 3$  °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal. Tuleks kasutada tehisvalgustust valgusrežiimiga 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest laborisööta ja piiramatus koguses joogivett. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada sööda sobivus uuritava kemikaali lisamiseks, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil.
22. Loomade pidamisel tuleks kasutada väikesi samasooliste isendite rühmi; loomi võib pidada eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud. Rühmas pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma. Paaritamine peaks toimuma selleks sobivas puuris. Tiined emasloomad tuleks paigutada igaüks eraldi puuri, kus on olemas pesamaterjal. Imetavad emasloomad paigutatakse igaüks eraldi puuri koos järglaskonnaga.
23. Sööta tuleks korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Asjaomase sööda proov tuleks kuni katseprotokollil lõpliku valmimiseni alles hoida.

**Loomade ettevalmistamine**

24. Terved noored täiskasvanud loomad jagatakse juhuvaliku alusel katsertühmadesse ja puuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud võimalik mõju oleks võimalikult väike. Loomad idenditakse üheselt ja neil lastakse enne uuringu algust puuris vähemalt viis päeva laboritingimustega kohaneda.

**Annuste ettevalmistamine**

25. Uuritavat kemikaali on soovitatav manustada suu kaudu, välja arvatud juhul, kui mõnda muu manustamisviisi peetakse sobivamaks. Uuritava kemikaali suukaudseks manustamiseks kasutatakse tavaliselt toitmissondi; selle asemel võib siiski kasutada ka sööda või joogiveega manustamist.
26. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Kui vähegi võimalik, on soovitatav esmalt kaaluda vesilahuse või veepõhise suspensiooni ja seejärel õlilahuse või õlipõhise suspensiooni (nt maisiõli) kasutamist ning pärast seda lahustamist mõnes muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul peaksid olema teada selle mürgisusnäitajad. Tuleks teha kindlaks uuritava kemikaali püsivus ja homogeensus kandeaines.

**▼ M8****KATSE KÄIK****Loomade arv ja sugu**

27. Soovitavalt peaks igas rühmas olema alguses vähemalt 10 isaslooma ja 12–13 emaslooma. Emasloomi hinnatakse kokkupuute eel innatsükli alusel ja loomad, kelle innatsükkel erineb tavapärasest 4–5 päeva pikkusest tsüklist, jäetakse uuringust välja; seepärast on soovitatav kasutada suuremat arvu emasloomi, et igas rühmas oleks lõpuks 10 emaslooma. Eeldatavalt tiinestub igas rühmas vähemalt 8 emaslooma – seda peetakse tavapäraselt minimaalseks vastuvõetavaks tiinestumismääraks –, välja arvatud juhul, kui ilmneb märkimisväärne mürgine mõju. Eesmärk on saada piisav arv tiineid emasloomi, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata uuritava kemikaali võimet mõjutada viljakust, tiinust, ema- ja imetamiskäitumist ning F<sub>1</sub>-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut eostamisest kuni kolmeteistkümnenda sünnijärgse päevani. Kui osa loomi on kavas surmata juba katse ajal, tuleks suurendada loomade arvu nende loomade arvu võrra, kes surmatakse plaanijärgselt enne katse lõppu. Tuleks kaaluda võimalust luua kontrollrühma ja suurima annusega töödeldava rühma juurde täiendrühm, millesse kuulub kummastki soost viis looma, et jälgida vähemalt 14 päeva jooksul pärast manustamise lõpetamist süsteemse mürgise mõju pöörduvust, püsivust või viivitusega avaldumist. Täiendrühma loomi ei paaritata ja neid ei kasutata seega reproduktiiv-/arengutoksilisuse hindamisel.

**Annused**

28. Üldjuhul tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja ühte kontrollrühma. Sobivate üldise mürgisuse andmete puudumisel võib kasutatavate annuste kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha annusevahemiku kindlaksmääramise uuringu, kus kasutatakse samast liinist ja sama päritolu loomi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda täpselt samal viisil kui katserühma loomi; ainus erinevus seisneb uuritava kemikaali manustamata jätmises. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleks võrdlusrühma loomadele manustada kandeainet suurimas kasutatavas koguses.
29. Annuste valimisel tuleks võtta arvesse kõiki kättesaadavaid mürgisusandmeid ja (toksiko)kineetilisi andmeid. Samuti tuleks arvesse võtta, et tiinete ja mittetiinete loomade tundlikkus võib olla erinev. Suurim annus tuleks valida nii, et kemikaal avaldaks mürgist mõju, kuid ei põhjustaks surma ega ilmseid kannatusi. Seejärel tuleks valida rida järk-järgult vähenevaid annuseid, mis võimaldaksid tõendada mõju sõltuvust annusest ja väikseima annuse puhul kahjuliku mõju puudumist. Sageli on eri annuste vaheline optimaalne erinevus kahe- kuni neljakordne ning üksteisest väga palju (näiteks üle 10 korra) erinevate annuste kasutamise asemel on tihti soovitatav lisada neljas katserühm.
30. Kui täheldatakse üldist mürgisust (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muid muutusi, mis ei pruugi olla tingitud mürgisusest (nt väiksem söödatarbimine, maksa suurenemine), tuleks täheldatud mõju sisesekretsioonisüsteemiga seotud lõppnäitajatele tõlgendada ettevaatusega.

**Piirsalduskatse**

31. Kui käesoleva meetodi kohaselt läbi viidud suukaudse manustamise uuringus, milles kasutatakse ainsa annusena annust vähemalt 1 000 mg kehamassi kilogrammi kohta päevas või sööda või joogiveega manustamise korral sellega samaväärset protsentuaalset sisaldust söödas või joogivees (see määratakse kindlaks kehamassi mõõtmise alusel), ei täheldata mürgist mõju ja kui mürgisus ei ole uuritava kemikaaliga struktuurilt sarnaste ainetega

## ▼M8

saadud andmete põhjal ootuspärane, ei pruugita pidada mitme eri annusega täismahus uuringu tegemist vajalikuks. Piirisalduskatse tulemused on kohaldatavad, kui inimese kokkupuutega seotud andmed ei viita vajadusele kasutada suuremat annusemäära. Muu manustamisviisi korral, näiteks sissehingamise teel või naha kaudu manustamisel võib uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest tulenevalt olla tihti vaja kasutada suurimat saavutatavat kokkupuutemäära.

**Annuste manustamine**

32. Uuritavat kemikaali manustatakse loomadele seitsmel päeval nädalas. Kui manustamiseks kasutatakse toitmissondi, tuleks kemikaali loomadele manustada ühe annusena maosondi või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Suurim korraga manustatav vedelikukogus sõltub katselooma suurusest. See kogus ei tohiks olla suurem kui 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada koguses 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katseskasutatava vedelikukoguse varieeruvuse minimeerimiseks tuleks reguleerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni nii, et lahuse maht oleks kõikide annuste puhul ühesugune; see ei ole nõutav ärritava või söövitava uuritava kemikaali puhul, mille mõju kontsentratsiooni suurenedes tavaliselt tugevneb.
33. Sööda või joogiveega manustatava uuritava kemikaali puhul on oluline tagada, et seda kasutatakse koguses, mis ei muuda tavapärasest toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas muutumatut kontsentratsiooni söödas (ppm) või looma kehamassi suhtes muutumatut annusemäära; tuleks täpsustada, kumba võimalust kasutatakse. Toitmissondi kaudu manustatava uuritava kemikaali puhul peaks manustamine toimuma igal päeval sarnasel kellaajal ning annusemäära tuleks vähemalt kord nädalas kohandada, et see püsiks looma kehamassi suhtes muutumatuna. Kui ühendkatse viiakse läbi pikaajalise või täismahus reproduktiivtoksilisuse uuringu eeluuringuna, tuleks mõlemas uuringus kasutada samasugust sööta.

**Katse ajakava**

34. Annuste manustamist tuleks kummagi soo puhul alustada kaks nädalat enne paaritamist pärast seda, kui loomadel on lastud vähemalt viis päeva kohaneda ja emasloomi on hinnatud lähtuvalt innatsükli tavapärasest kestusest (töötlemisele kahe nädala pikkuse perioodi vältel). Uuringu ajakava peaks olema selline, et innatsükli hindamist alustatakse varsti pärast seda, kui loomad on saanud täielikult suguküpseks. See aeg võib olla eri rotiliinidel ja eri laborites veidi erinev: näiteks Sprague Dawley rottidel saabub suguküpsus 10 nädala vanuses ja Wistari rottidel umbes 12 nädala vanuses. Järglastega emasloomad tuleks surmata 13. sünnitusjärgsel päeval või veidi hiljem. Järglastega emasloomi ja järglasi ei pea tingimata surmama samal päeval, kui järglastega emasloomadel eelistatakse lasta enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda. Sünnitamispäeva (päev, mil sünnitus lõpeb) loetakse sünnitusjärgseks 0-päevaks. Emasloomad, kellel ei täheldata paaritumise ilminguid, surmatakse 24–26 päeva pärast paaritumisperioodi viimast päeva. Paaritumisperioodi vältel jätkatakse kummastki soost loomadele kemikaali manustamist. Isasloomadele manustamist tuleks paaritumisperioodi järgselt jätkata vähemalt seni, kuni manustamisperioodi algusest on möödunud kokku minimaalselt 28 päeva. Seejärel loomad surmatakse või teise võimalusena jätkatakse neile kemikaali manustamist, et viia võimaluse korral läbi teine paaritamine, kui seda peetakse asjakohaseks.
35. Tiinestunud emasloomade puhul tuleks igapäevast manustamist jätkata kogu tiinuse vältel ning vähemalt kuni 13. sünnitusjärgse päevani, sealhulgas nimetatud päeval, või kuni surmamisele päevani. Uuringute puhul, kus uuritavat kemikaali manustatakse sissehingamise teel või naha kaudu, tuleks manustamist jätkata vähemalt kuni 19. tiinuspäevani, sealhulgas nimetatud päeval, ning taaslustada seda võimalikult varakult ja mitte hiljem kui 4. sünnitusjärgsel päeval.

**▼M8**

36. Järelvaatluste jaoks ette nähtud täiendühma kasutamisel jäetakse sellise rühma loomad paaritamata. Neid tuleks pärast järglastega emasloomade esimest plaanijärgset surmamist pidada veel vähemalt 14 päeva ja selle aja jooksul ei tohiks neile kemikaali manustada, et oleks võimalik hinnata mürgise mõju viivitusega avaldumist või selle püsivust või mürgisest mõjust taastumist.
37. Katse skemaatiline ajakava on esitatud 2. liites.

**Innatsükkel**

38. Enne töötlemise alustamist tuleks jälgida innatsükli ning valida selle alusel uuringusse emasloomad, kelle tsükkel on korrapärane (vt punkt 27). Tupeäideid tuleks igapäevaselt hinnata ka alates töötlemisperioodi algusest kuni paaritumise ilmingute tuvastamiseni. Kui on kahtlus, et innatsükkel võib pärast manustamise alustamist ägeda stressi mõjul muutuda, võib katseloomi laboris 2 nädala vältel uuritava kemikaaliga töödelda ning seejärel koguda paaritumiseelset perioodil innatsükli jälgimiseks vähemalt kahe nädala jooksul iga päev tupeäideid ja jätkata jälgimist ka paaritumisperioodil, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et mitte kahjustada limaskesta, kuna see võib põhjustada pseudotiinuse teket (8, 9).

**Paaritamine**

39. Käesoleva meetodi kohases uuringus tuleks üldjuhul kasutada paaritamisel suhet 1: 1 (üks isasloom ühe emaslooma kohta). Erandi võib teha juhul, kui isasloomad juhtuvad surema. Emaslooma tuleks hoida sama isaslooma juures seni, kuni täheldatakse paaritumise ilminguid või on möödunud kaks nädalat. Emasloomi tuleks igal hommikul uurida sperma või tupekorgi esinemise suhtes. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil paaritumise toimumine leiab kinnitust (leitakse tupekork või spermat). Kui paaritamine ebaõnnestub, võib kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks osutunud isasloomaga.

**Pesakonna suurus**

40. Neljandal sünnijärgsel päeval võib iga pesakonna suurus korrigeerida; selleks kõrvaldatakse juhuvaliku alusel üleliigsed järglased nii, et pesakonda jääks sõltuvalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest võimalikult täpselt neli või viis järglast kummagi soo kohta. Üleliigsetest järglastest kahelt tuleks võtta vereproov, moodustada nendest koondproov ja kasutada seda seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse määramiseks. Järglaste selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi või anogenitaalse vahemaa (AGD) alusel, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste järglaste arv ei võimalda jätta pesakonda nelja või viit järglast kummastki soost, on vastuvõetav ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast). Kui pesakond jääks kõrvaldamise tagajärjel väiksemaks kui kõrvaldamisega saavutatav soovitud sihtarv (8 või 10 järglast pesakonna kohta), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui kõrvaldamisega saavutatava soovitud sihtarvuga võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse hindamiseks.
41. Kui pesakonna suurus ei korrigeerita, surmatakse 4. sünnijärgsel päeval igast pesakonnast kaks järglast ning neilt võetakse vereproov seerumi kilpnäärmehormoonisisalduse mõõtmiseks. Võimaluse korral peaksid kõnealused kaks järglast igast pesakonnast olema emased, et võimaldada isaste järglaste kasutamist nisade esinemise hindamiseks; see soovitus ei kehti juhul, kui kõnealuse kahe järglase eemaldamisel ei jääks pesakonda ühtki emast, keda uuringu lõpus hinnata. Kui pesakonda jääks kõrvaldamise tagajärjel vähem kui 8 või 10 järglast (olenevalt kasutatava rotiliini puhul tavapärasest pesakonna suurusest), ei kõrvaldata ühtki järglast. Kui pesakonna tavapärase suurusega võrreldes on üle ainult üks järglane, kõrvaldataksegi vaid üks järglane, kellelt võetakse vereproov võimalikuks seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse hindamiseks.

▼ **M8****Vaatlused**

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, igal päeval soovitatavalt samal ajal või samadel aegadel; seejuures tuleks võtta arvesse manustamisjärge eeldatava mõju maksimaalse avaldumise aega. Tuleks registreerida loomade tervislik seisund. Kõiki loomi kontrollitakse haigestumise ja surmajuhude tuvastamiseks vähemalt kaks korda päevas.
43. Kõikide paaritatavate loomade puhul tuleks läbi viia üksikasjalikud kliinilised vaatlused üks kord enne uuritava kemikaali manustamist (võimaldamaks sama loomaga saadud tulemuste võrdlemist) ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha standardalal väljaspool looma pidamiseks kasutatavat puuri ja igal vaatluste tegemise päeval soovitatavalt samal kellajal. Tulemused tuleks hoolikalt registreerida; selleks tuleks soovitatavalt kasutada katset läbi viivas laboris selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja vaatlusi teeksid soovitatavalt isikud, kes ei ole asjaomasest töötlemisest teadlikud. Tuleks registreerida vähemalt järgmised ilmingud: nahal, karvastikus, silmades ja limaskestadel täheldatavad muutused, sekreetide ja eritiste esinemine ning autonoomse närvisüsteemiga seotud ilmingud (nt pisaravoolus, piloereksioon, pupillide suuruse muutus, ebaharilik hingamisrütm). Peale selle tuleks registreerida muutused kõnnakus, kehahoius ja selles, kuidas loomad nendega ümberkäimisele reageerivad, samuti klooniliste ja tooniliste liigutuste esinemine, stereotüüpia (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine), raske või kauakestnud sünnitus ja kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine) (10).
44. Uuringu kestel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel isasloomal ja viiel emasloomal hinnata ühel korral sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (8, 9, 11), haardetugevust (12) ja mootorset tegevust (13). Asjaomaste võimalike meetodite täpsem kirjeldus on esitatud vastavate viidete kohastes allikates. Viidatud meetodite asemel võib siiski kasutada ka muid meetodeid. Isasloomadel tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia manustamisperioodi lõppjärgus veidi enne plaanijärgset surmamist, kuid enne hematoloogiliseks uuringuks või kliiniliseks biokeemiliseks analüüsiks vereproovi võtmist (vt punktid 53–56, sh joonealune märkus 1). Emasloomad peaksid nende funktsionaalsete vaatluste ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis ja neid tuleks soovitatavalt vaadelda ühel korral viimasel imetamisnädalal (nt 6.–13. imetamispäeval) veidi enne plaanijärgset surmamist. Ajavahemik, mille vältel järglased on emast eraldatud, peaks olema võimalikult lühike.
45. Uuringu lõppjärgus ühel korral tehtavad funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta, kui uuring viiakse läbi järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse 90-päevase uuringu või pikaajalise uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks kõnealused funktsionaalsed vaatlused läbi viia vastava järeluuringu käigus. Teisest küljest aga võivad käesoleva meetodi kohase korduvannustamisel põhineva uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgnevalt tehtava subkroonilise mürgisuse uuringu või pikaajalise uuringu jaoks annusemäärade valimist.
46. Funktsionaalsed vaatlused võib erandkorras ära jätta ka rühmade puhul, kus täheldatakse nii ulatuslikke mürgisusnähte, et see mõjutab märkimisväärselt funktsionaalse hindamise tulemuslikkust.
47. Tiinuse kestus tuleks registreerida; selle arvutamisel lähtutakse tiinuse 0-päevast. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult varakult hinnata, et teha kindlaks järglaste arv ja sugu, surmultsünnid, elussünnid, kängunud järglaste (vastavatest kontrolljärglastest palju väiksemate järglaste) arv ja silmaga nähtavate kõrvalekallete esinemine.

**▼M8**

48. Elus järglased tuleks loendada ja määrata nende sugu ning pesakonda tuleks kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Peale paaritavatel loomadel tehtavate vaatluste tulemuste (vt punktid 43–44) tuleks registreerida ka kõik järglaste ebatavalise käitumise ilmingud.
49. Kõikidel järglastel tuleks ajavahemikul sünnijärgsest 0-päevast kuni 4. sünnijärgse päevani mõõta ühel ja samal päeval AGD. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normaliseerida järglase suurust kajastava näitaja, soovitatavalt kehamassi kuupjuure suhtes (14). Isastel järglastel tuleks 12. või 13. sünnijärgsel päeval loendada nisa-de/areoolide arv, nagu on soovitatud OECD katsejuhendis nr 151 (15).

**Kehamass ja sööda/vee tarbimine**

50. Isas- ja emasloomi tuleks kaaluda esimesel manustamispäeval ning seejärel vähemalt kord nädalas, samuti surmamise ajal. Tiinuse ajal tuleks emasloomi kaaluda tiinuse 0-päeval, 7., 14. ja 20. päeval, samuti tuleks neid kaaluda 24 tunni jooksul pärast sünnitust (sünnitusjärgsel 0-päeval või 1. päeval) ning vähemalt 4. ja 13. sünnitusjärgsel päeval. Nimetatud vaatluste tulemused tuleks esitada eraldi iga täiskasvanud looma kohta.
51. Paaritumiseelsel perioodil ning tiinuse ja imetamise ajal tuleks söödatarbimist mõõta vähemalt kord nädalas. Paaritumisperioodil ei ole söödatarbimise mõõtmine kohustuslik. Kui uuritavat kemikaali manustatakse veega, tuleks eelnimetatud perioodidel mõõta ka veetarbimist.

**Hematoloogiline analüüs**

52. Uuringu vältel tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viiel emasloomal ja viiel isasloomal viia ühel korral läbi hematoloogiline analüüs järgmistele näitajatele määramiseks: hematokrit, hemoglobiinisaldus, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri tüüpi leukotsüütide arv, vereliistakute arv ja vere hüübimisaeg/hüübimisvõime. Kui uuritav kemikaal või mõni selle võimalikest metaboliitidest on või võib olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha muu hulgas kindlaks veel ka methemoglobiinisaldus ja Heintzi kehakeste esinemine.
53. Vereproov tuleks võtta kindlaksmääratud kohast. Emasloomad peaksid proovivõtu ajal olema sarnases füsioloogilises seisundis. Tiinuse algusaja varieeruvusega seotud praktilistest raskustest tulenevalt võib emasloomadelt vereproovi võtta juba paaritumiseelse perioodi lõpus, selmet võtta see loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Isasloomadelt tuleks vereproov võtta loomade humaanse surmamise käigus või vahetult enne seda. Teise võimalusena võib isasloomadelt vereproovi samuti võtta paaritumiseelse perioodi lõpus, kui emasloomade puhul eelistatakse seda proovivõtuaega.
54. Vereproove tuleks säilitada sobivates tingimustes.

**Kliiniline biokeemiline analüüs**

55. Kliinilise biokeemilise analüüsi jaoks, mille eesmärk on hinnata kudedes avalduvat olulist mürgist mõju ning konkreetset mõju neerudele ja maksale, tuleks kasutada kõnealuse igast rühmast valitud viie emaslooma ja viie

## ▼M8

isaslooma vereproove. Loomadel on soovitatav enne vereproovi võtmist hommikuni paastuda<sup>(1)</sup>. Plasma või seerumi analüüs peaks hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, kolesterooli üldsisalduse, karbamiidi, kreatiini, valgu üldsisalduse ja albumiini, vähemalt kahe maksarakkudele avalduvale toimele osutava ensüümi (näiteksalaniini aminotransferaasi, aspartaadi aminotransferaasi ja sorbitooli dehüdrogenaasi) ning sapphapete määramist. Teatavatel juhtudel võib kasulikku teavet saada veel muude (maksas või mujal toodetud) ensüümide ja bilirubiini määramisest.

56. Vereproovid võetakse kindlaksmääratud kohast järgmise kava alusel:

- igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt 4. sünnijärgsel päeval, kui järglaste arv seda võimaldab (vt punktid 40-41),
- kõikidelt järglastega emasloomadelt ja igas pesakonnas vähemalt kahelt järglaselt surmamise ajal 13. päeval ning
- kõikidelt täiskasvanud isasloomadelt surmamise ajal.

Kõiki vereproove säilitatakse sobivates tingimustes. Järglastelt 13. päeval võetud vereproovides ja täiskasvanud isasloomade vereproovides analüüsitakse kilpnäärmehormoonide (T<sub>4</sub>) sisaldust seerumis. Kui see on asjakohane, hinnatakse T<sub>4</sub> sisaldust ka järglastega emasloomade vereproovides ja järglastelt 4. päeval võetud vereproovides. Kui see on asjakohane, võib soovi korral mõõta ka muude hormoonide sisaldust. Järglaste vere võib kilpnäärmehormoonide analüüsimiseks pesakonnakaupa kokku koondada. Soovitatavalt tuleks mõõta kilpnäärmehormoonide (T<sub>4</sub> ja TSH) üldsisaldust.

57. Uuringu viimasel nädalal võib igast rühmast juhuvaliku alusel valitud viielt isasloomalt koguda teatud kindla aja jooksul uriiniproovi ja määrata uriinaanalüüsi käigus järgmised näitajad: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus ja veresisaldus / vererakkude sisaldus.

58. Peale selle tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate seerumimarkerite uurimist. Kui uuritav kemikaal on oma teadaolevatest omadustest tulevalt võimeline mõjutama asjaomast ainevahetusprofiili või kui esineb sellekohane kahtlus, peaks määramine muu hulgas hõlmama veel ka kaltsiumi, fosfaati, paastumisjärgselt määratavaid triglütseriide ja glükoosi, teatavaid hormone, methemoglobiini ja koliini esteraasi. Kõnealused näitajad tuleb igal konkreetsel juhul eraldi kindlaks määrata.

59. Hormoonide määramisel võivad varieeruvust ja absoluutset kontsentratsiooni mõjutada järgmised tegurid:

- surmamise aeg tulenevalt asjaolust, et hormoonide kontsentratsioon ööpäeva jooksul muutub;

<sup>(1)</sup> Mitme seerumist või plasmast määratava näitaja, eelkõige glükoosi mõõtmisel on soovitatav hommikuni paastuda, peamiselt seepärast, et söömise korral oleks tulemuste varieeruvus paratamatult suurem ning see segaks nõrgema mõju tuvastamist ja muudaks andmete tõlgendamise raskeks. Teisest küljest aga võib hommikuni paastumine häirida (tiinete) loomade üldist ainevahetust ning mõjutab piimaeritust ja imetamiskäitumist, samuti võib see muuta igapäevast uuritava kemikaaliga kokkupuutumise määra, eelkõige uuringutes, kus kasutatakse söödaga manustamist. Kui loomadel lastakse hommikuni paastuda, tuleks kliiniline biokeemiline analüüs teha isasloomade puhul uuringu neljandal nädalal pärast funktsionaalsete vaatluste läbiviimist. Järglastega emasloomi tuleks pärast järglaste eemaldamist (seda tehakse näiteks 13. sünnijärgsel päeval) veel ühe päeva elus hoida. Neil tuleks lasta 13. imetamispäevast 14. imetamispäeva hommikuni paastuda ja kasutada kliiniliste biokeemiliste näitajate määramiseks surmamise ajal võetud vereproovi.

**▼M8**

- surmamisviis – tuleks hoiduda tekitamast loomadele tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsiooni;
  - hormoonide määramise komplektid, milles kasutatavad standardkõverad võivad olla erinevad.
60. Konkreetselt hormoonide määramiseks ette nähtud eri plasmaproovid tuleks koguda umbes samal kellaajal. Hormoonisisalduse analüüsimisel saadavad arvvaartused on müügilevate eri katsekomplektide puhul erinevad.
61. Kui varasemad võrdlusandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliiniliste biokeemiliste näitajate määramist enne manustamisperioodi algust või soovitatavalt loomadel, kes ei kuulu ühessegi katserühma. Emasloomade puhul tuleb andmete saamiseks kasutada imetavaid loomi.

**PATOLOOGILINE ANALÜÜS****Täielik lahkamine**

62. Kõikidele uuringus kasutatud täiskasvanud loomadele tuleks teha täielik, põhjalik lahkamine, mille käigus uuritakse hoolikalt keha välispinda, kõiki avausi ning kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks registreerida pesastumiskohade arv. Lahkamispäeval tuleks analüüsida tupeäiet, et teha kindlaks innatsükli etapp ja võimaldada korreleerimist emassuguelundite histopatoloogilise analüüsi tulemustega.
63. Kõikide täiskasvanud isasloomade munandid ja munandimanused ning eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tuleks vajaduse korral vabastada nende külge jäänud kudedest ja kuivamise ärahoidmiseks tuleks elundite märgmass määrata võimalikult kiiresti pärast nende väljalõikamist. Peale selle võib soovi korral kaaluda isasloomade puhul sellised elundid nagu pärakutõsturlihase ja sibulakäsnkeha-lihase kompleks, Cowperi näärmed ja sugutilukk ning emasloomade puhul munasarjade paar (märgmass) ja emakas (koos emakakaelaga); kui seda tehakse, peaks kaalumise toimuma võimalikult kiiresti pärast elundite väljalõikamist. Kõikide täiskasvanud loomade munasarjad, munandid, munandimanused, suguelundid ja kõik makroskoopiliste kahjustustega elundid tuleks säilitada.
64. Kõikidelt täiskasvanud isas- ja emasloomadelt ning igast pesakonnast ühelt isaselt ja ühelt emaselt 13 päeva vanuselst järglaselt võetud kilpnääret tuleks säilitada fikseerimislahuses, mis on järgneva kavandatud histopatoloogilise analüüsi läbiviimiseks kõige sobivam. Kilpnäärme massi võib määrata pärast fikseerimist. Liigsed koed tuleks samuti eemaldada väga ettevaatlikult alles pärast fikseerimist, et kudesid mitte kahjustada. Koekahjustus võib mõjutada histopatoloogilise analüüsi tulemusi. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade humaanset surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes (vt punkt 56).



## ▼M8

65. Peale selle tuleks igast rühmast juhuvaliku alusel valitud vähemalt viielt täiskasvanud isas- ja emasloomalt (juhuvalik ei hõlma loomi, kes on leitud olevat surmaeelses seisundis ja/või on enne uuringu lõppu humaanselt surmatud) võtta maks, neerud, neerupealised, harknääre, põrn, aju ja süda, eemaldada vastavalt vajadusele nende külge jäänud koed ning määrata kuivamise ärahoidmiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist nende märgmass. Nii koetüübi kui ka kavandatud järgneva histopatoloogilise uuringu jaoks kõige sobivamas fikseerimislahuses tuleks säilitada järgmisi kudesid: kõik silmaga nähtavate kahjustustega koed, aju (representatiivsed piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealised, põrn, süda, harknääre, hingetoru ja kopsud (säilitamiseks täidetakse need fikseerimislahusega ja sukeldataksejärel lahusesse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähemal asuva lümfisõlme tuleks võtta labori kogemustest lähtuvalt veel teinegi lümfisõlm (16)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluunärv), soovitatavalt lihase läheduses, skeletilihase ning luu koos luuüdiga (lõik või teise võimalusena värskelt aspireeritud luuüdi preparaat). Munandid on soovitatav fikseerida Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse sukeldamise teel (16, 17, 18); formaliinis fikseerimine ei ole nende kudede puhul soovitatav. Fikseerimislahuse kiire sissetungimise võimaldamiseks võib elundi kummaski otsas valkjaskesta ettevaatlikult väikese sügavuseni nõelaga läbi torgata. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Tuleks säilitada ka kõik elundid, mida uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt peetakse tõenäoliseks sihtelundiks.
66. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud mõju kohta võib saada väärtuslikku teavet järgmiste kudede uurimisel: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanäärmed ja neerupealised. Isaslooma rinnanäärmetes aset leidvad muutused on ebapiisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega ainete suhtes. Punktis 65 loetlemata elundite/kudede analüüsimine ei ole kohustuslik.
67. Surnud järglasi ja 13. sünnijärgsel päeval või varsti pärast seda surmatud järglasi tuleks miinimumnõudena väliselt hoolikalt uurida silmaga nähtavate kõrvalekallete suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata väliste suguelundite, mida tuleks uurida arenguhäirete ilmingute suhtes.

**Histopatoloogiline analüüs**

68. Kontrollrühmast ja suurima annusega töödeldud rühmast valitud loomadelt pärit säilitatud elundite ja kudede puhul tuleks viia läbi täismahus histopatoloogiline uuring (seejuures tuleks pöörata erilist tähelepanu spermatogeneesi etappidele isaslooma sugunäärmetes ja munandite interstitsiaalrakustruktuuri histopatoloogilisele analüüsile). Vajaduse korral võib uurida ka järglastelt ja ülejäänud täiskasvanud loomadelt võetud kilpnääret. Kui suurima annusega töödeldud rühmas täheldatakse manustamisega seotud muutusi, peaks kõnealune analüüs hõlmama ka teiste annuserühmade loomi. Täiendav üksikasjalik teave sisesekreetsioonisüsteemi kudede väljalõikamise, fikseerimise, neist lõikude tegemise ja nende histopatoloogilise analüüsi kohta on esitatud histopatoloogilise analüüsi juhendis (10).
69. Tuleks uurida kõiki silmaga nähtavaid kahjustusi. NOAELi kindlakstegemise hõlbustamiseks tuleks analüüsida ka teiste annuserühmade loomade sihtelundeid, eelkõige sellistest rühmadest pärit sihtelundeid, mida iseloomustavate tulemuste põhjal saab väidetavalt määrata kindlaks NOAELi.

▼ **M8**

70. Täiendühma kasutamise korral tuleks histopatoloogilise analüüsi raames hinnata neid kudesid ja elundeid, kus katserühmade loomade puhul täheldati mõju avaldumist.

**ANDMED JA ARUANDLUS****Andmed**

71. Andmed tuleks esitada iga looma kohta eraldi. Peale selle tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtliku tabeli kujul, kus on iga katserühma puhul toodud ära loomade arv katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arv ning surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, mürgisusnähtudega loomade arv, mürgisusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise mõju ilmnemisaeg, kestus ja tugevus, histopatoloogiliste muutuste liik ja kõik asjakohased andmed pesakonna kohta. Paljunemisele/arengule avalduva mõju hindamiseks väga kasulikuks osutunud aruandevorm kokkuvõtliku tabeli kujul on esitatud 3. liites.
72. Numbrilisi tulemusi tuleks võimaluse korral hinnata asjakohase üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Eri annuste puhul täheldatud mõju võrdlemisel tuleks hoiduda mitme t-testi kasutamisest. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis. AGD ja nisade esinemise statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonnas ilmnevat mõju. Vajaduse korral käsitatakse analüüsiüksusena pesakonda. Järglaste kehamassi statistiline analüüs peaks põhinema iga üksiku järglase andmetel ning seejuures tuleks arvesse võtta pesakonna suurust. Uuringu piiratud ulatusest tulenevalt on tulemuste olulisuse tuvastamiseks tehtava statistilise analüüsi väärtus paljude lõppnäitajate, eelkõige paljunemisega seotud lõppnäitajate puhul piiratud. Mõned kõige sagedamini kasutatavatest meetoditest, eelkõige parameetrilised testid keskmise suundumuse näitajate analüüsiks, on ebasobivad. Statistilise analüüsi kasutamisel tuleks valida meetod, mis on uuritava muutuja väärtuste jaotuse analüüsiks sobiv, ning see valik tuleks teha enne uuringu alustamist.

**Tulemuste hindamine**

73. Käesoleva meetodi kohase mürgisusuuringu tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt täheldatud mõjust, lahkamistulemustest ja mikroskoopilistest leidudest. Hindamine hõlmab seose kindlakstegemist uuritava kemikaali annuse ja kõrvalekallete – sealhulgas silmaga nähtavate kahjustuste, tuvastatud sihtelundite avalduva mõju, viljatuse, kliiniliste kõrvalekallete, paljunemisvõime ja pesakonnale avalduva mõju, kehamassi muutuste, suremusele avalduva mõju ja mis tahes muu mürgise mõju – esinemise või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel.
74. Isasloomade töötlemise lühiajalisuse tõttu tuleks isasloomade paljunemisele avalduva mõju hindamisel vaadelda munandite ja munandimanuste histopatoloogilise analüüsi tulemusi koos viljakusandmetega. Ühtlasi võib uuringutulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks olla kasulik kasutada kontrollidega saadud varasemaid paljunemist/arengut käsitlevaid andmeid (nt pesakonna suuruse, AGD, nisade esinemise või seerumi T<sub>4</sub>-sisalduse kohta), kui need on olemas.
75. Kvaliteedikontrolli eesmärgil on soovitatav koguda kontrolle käsitlevaid varasemaid andmeid ja arvutada arvandmete jaoks variatsioonikordajad, eriti näitajate puhul, mis on seotud endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide kindlakstegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlusalusena käsiloleva uuringu tulemuste hindamiseks.

**▼M8****Katseprotokoll**

76. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
  - uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- ühest koostisosast koosnev aine:
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
  - kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest.

*Kandeaine (vajaduse korral):*

- kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine ei ole vesi.

*Katseloomad:*

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmisandmed jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- liigi valimise põhjendus, kui katseloom ei ole rott.

*Katsetingimused:*

- annuste valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali valmistise / söödavalmistise, saavutatud kontsentratsioonide ning valmistise püsivuse ja homogeensuse kohta;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral andmed söödas/joogivees sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendamiseks tegelikuks annuseks (mg kehamassi kilogrammi kohta päevas);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- järglaste surmamise korral üksikasjalik kirjeldus surmatavate järglaste juhusliku valimise korra kohta.

*Tulemused:*

- kehamass / kehamassi muutused;
- vajaduse korral söödatarbimine ja veetarbimine;

**▼M8**

- mürgise mõju andmed kummagi soo ja iga annusemäära kohta, sealhulgas viljakusele ja tiinusele avalduva mõju ning mis tahes muude mürgisusnähtude kohta;
- tiinuse kestus;
- mürgisus või muu mõju paljunemisele, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;
- kliiniliste ilmingute laad, raskusaste ja kestus (nähtude pöördumus või pöördumatus);
- sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamise tulemused;
- hematoloogilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;
- kliinilise biokeemilise analüüsi tulemused koos asjaomaste võrdlusväärtustega;
- normaalse või ebanormaalse innatsükliga täiskasvanud emasloomade arv ja tsükli kestus;
- elussündide arv ja pesastumisjärgne kadu;
- silmaga nähtavate kõrvalekalletega järglaste arv; väliste suguelundite makroskoopilise hindamise tulemused, kängunud järglaste arv;
- katse vältel suremise aeg või teave selle kohta, et loomad olid kuni surmamiseni elus;
- pesastunud embrüote arv, pesakonna suurus ja pesakonna kaal mõõtmishetkel;
- järglaste kehamassi andmed;
- iga järglase AGD (ja kehamass AGD mõõtmise päeval);
- nisade esinemine isastel järglastel;
- kilpnäärmehormoonide sisaldus järglastelt 13. päeval võetud proovides ja täiskasvanud isasloomade proovides (ning järglastega emasloomade proovides ja järglastelt 4. päeval võetud proovides, kui seda on mõõdetud);
- andmed järglastega loomade kehamassi kohta surmamise hetkel ning selliste loomade elundite massi kohta;
- lahkamistulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorbeerumise kohta (kui on olemas);
- vajaduse korral tulemuste statistilise analüüsi andmed.

*Tulemuste arutelu*

*Järeldused*

## ▼M8

**Tulemuste tõlgendamine**

77. Kirjeldatud uuring võimaldab hinnata annuste korduval manustamisel täheldatavat paljunemisele/arengule avalduvat mürgist mõju. Kuna rõhk on seatud nii üldise mürgisuse kui ka reprodutiiv-/arengutoksilisuse lõppnäitajate hindamisele, võimaldavad uuringu tulemused eelkõige eristada üldise mürgisuse puudumisel paljunemisele/arengule avalduvat mõju sellisest mõjust paljunemisele/arengule, mis avaldub üksnes kontsentratsioonil, mille juures kemikaal on mürgine ka järglaste vanematele (vt punktid 7–11). Saadud tulemused võivad viidata vajadusele teha täiendavaid uuringuid ja võivad hõlbustada järgnevate uuringute kavandamist. Paljunemise ja arenguga seotud tulemuste hõlpsamaks tõlgendamiseks tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 43 (19). Käesoleva katsemeetodi puhul võib olla kasu näri-listega tehtavate sisesekretsioonisüsteemi ja paljunemisega seotud katsete tulemuste histoloogilist hindamist käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 106 (16) esitatud teabest (sisesekretsiooni)elundite ja tupeäiete ettevalmistamise ja hindamise kohta.

**KIRJANDUS**

- (1) OECD (1990). Kemikaalide töөрühma ja halduskomitee 14. ühiskoosoleku koosolekudokument nr 1. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (2) OECD (1992). Ajutise eksperdirühma esimehe aruanne reprodutiivtoksilisust käsitlevate sõeluuringumeetodite alase koosoleku kohta. Tokyo, 27.–29. oktoober 1992. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (3) Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., ja Hayashi, Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol. Sci.* 19: 141–149.
- (4) Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y., ja Tobe, M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 89–95.
- (5) OECD (1998). Endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise (EDTA) OECD rakkerühma esimese koosoleku aruanne. 10.–11. märts 1998. Taotluse korral kättesaadav Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioonist Pariisis.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 217. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

## ▼M8

- (8) Goldman, J. M., Murr, A. S., ja Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B* 80(2): 84–97.
- (9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons. Väljaandes: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization. Auston, C. R., ja Short, R. V. (toim.), Cambridge, New York.
- (10) Rahvusvaheline kemikaaliohutuse programm (IPCS) (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., ja Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- (12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., ja Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- (13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., ja MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- (14) Gallavan, R. H. Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., ja Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383–390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 151. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 106. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (17) Hess, R. A., ja Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Väljaandes: Methods in Reproductive Toxicology. Chapin, R. E., ja Heindel, J. J. (toim.), Academic Press, San Diego, CA. Lk 52–85.
- (18) Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., ja Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicol. Pathol.* 30: 524–533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 43. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

**▼M8***1. liide*

## MÕISTED (VT KA OECD JUHENDDOKUMENT NR 150 (20))

Androgeensus kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik androgeen (nt testosteroon).

Annus manustatav uuritava kemikaali kogus. Annust väljendatakse uuritava kemikaali kogusena massiühikutes katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks milligrammides kehamassi kilogrammi kohta päevas) või kemikaali püsiva kontsentratsioonina söödas.

Annustamine üldmõiste, mis hõlmab annust, selle manustamise sagedust ja annustamise kestust.

Antiandrogeensus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku androgeeni (nt testosterooni) toimet.

Antitüreoidne aktiivsus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku kilpnäärmehormooni (nt T<sub>3</sub>) toimet.

Antiöstrogeensus kemikaali võime pärssida imetaja organismis loodusliku östrogeeni (nt 17β-östradioli) toimet.

Arengutoksilisus reproduktiivtoksilisuse ilming, mis avaldub järglaste sünnieelse, perinataalse või sünnijärgse struktuuri- või funktsioonihäirena.

Emale avaldub mürgisus tiinule emasloomale avaldub kahjulik mõju, mis on spetsiifiline (otsene mõju) või mittespetsiifiline (kaudne mõju) ning on seotud tiinusega.

Ilmne mürgisus üldmõiste, mille abil kirjeldatakse uuritava kemikaali manustamise järel täheldatavaid selgeid mürgisusnähte. Kõnealused nähud peaksid olema ohu hindamiseks piisavad ja sellised, et manustatava annuse suurendamisega kaasnevad eeldatavalt tõsised mürgisusnähud ja tõenäoliselt ka surm.

Kemikaal aine või segu.

NOAEL lühend, millega tähistatakse annusemäära, mille juures ei täheldata kahjulikku toimet. Tegemist on suurima annusega, mis ei põhjusta manustamisest tingitud kahjulikke ilminguid.

Reproduktiivtoksilisus kahjulik mõju järglastele ja/või isas- või emasloomade paljunemisfunktsioonile või paljunemisvõimele.

Türeoidne aktiivsus kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik kilpnäärmehormoon (nt T<sub>3</sub>).

Uuritav kemikaal iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine teaduslik protsess, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi rakendamise seotud nõudeid ja piiranguid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja sobivust konkreetset eesmärgil kasutamiseks.

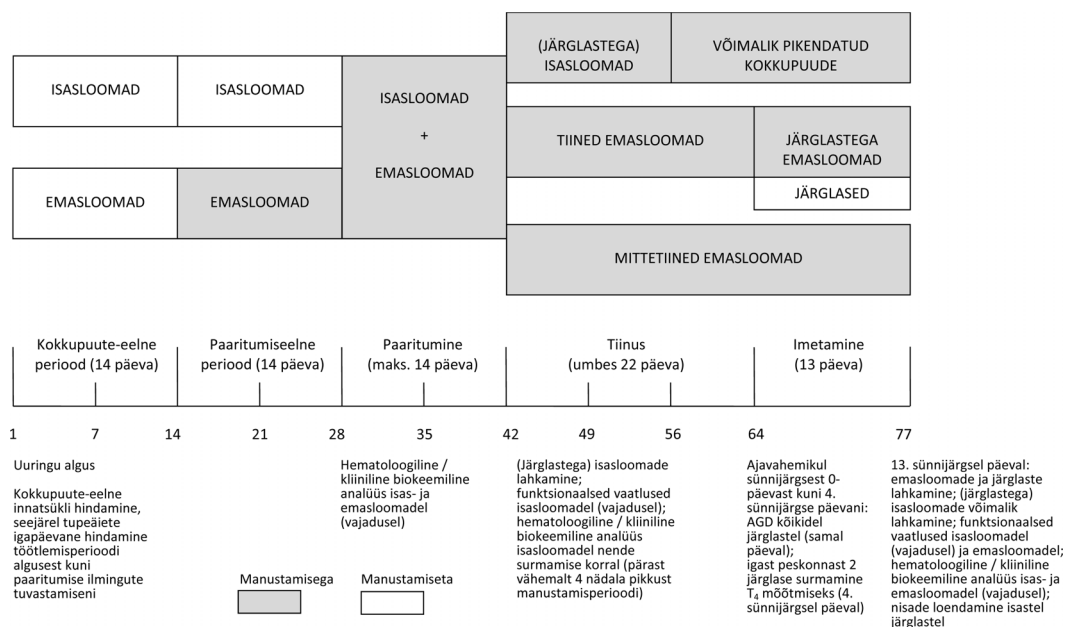
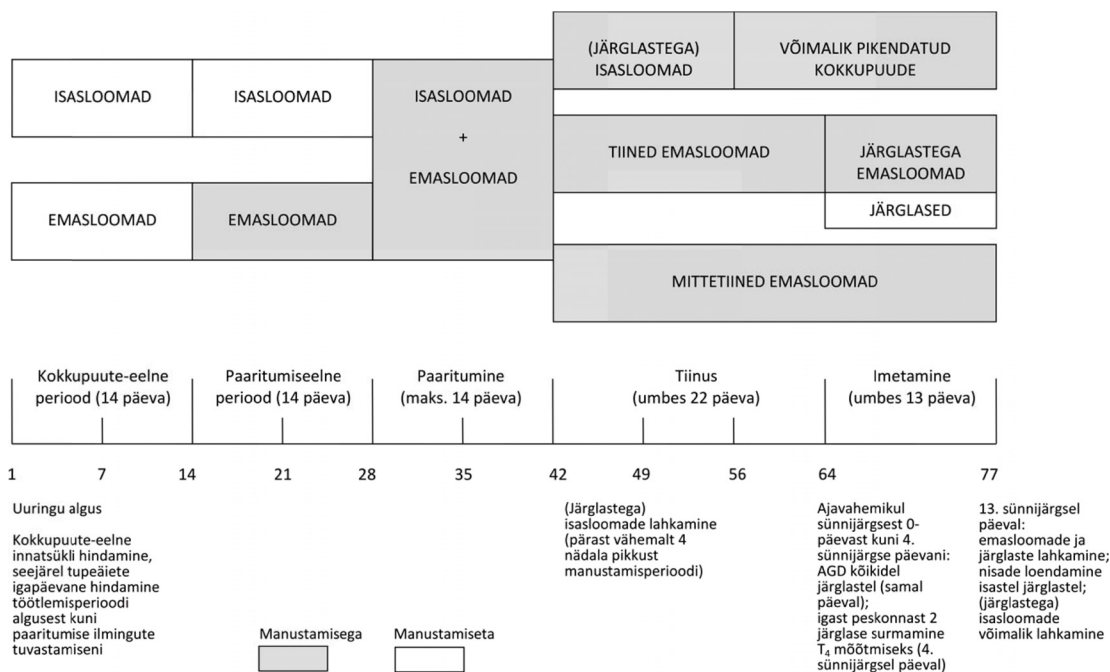
Viljakuse vähenemine isas- või emasloomade paljunemisfunktsiooni häire või paljunemisvõime langus.

Östrogeensus – kemikaali võime toimida imetaja organismis samal viisil kui looduslik östrogeen (nt 17β-östradiol).

## ▼ M8

## 2. liide

UURINGU MAKSIMUMKESTUSELE VASTAV TÄISPIKAL 14-PÄEVASEL PAARITUMISPERIOODIL PÕHINEV KATSE SKEMAATILINE AJAKAVA





## ▼ M8

## 3. liide

TABELI KUJUL KOKKUVÕTLIK ARUANNE PALJUNEMISELE/ARENGULE AVALDUVA MÕJU KOHTA

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
	0 (kontroll)	...	...	...	...
Annus (ühik)					
Paaride arv katse alguses ( <i>N</i> )					
Innatsükkel (vähemalt keskmine pikkus ja ebaregulaarsete tsüklite esinemissagedus)					
Emasloomad, kellel täheldatakse paaritumise ilminguid ( <i>N</i> )					
Tiinestunud emasloomad ( <i>N</i> )					
Eostunud 1.–5. päeval ( <i>N</i> )					
Eostunud 6.–.... <sup>(1)</sup> päeval ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus ≤ 21 päeva ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus 22 päeva ( <i>N</i> )					
Tiinuse kestus ≥ 23 päeva ( <i>N</i> )					
Elusalt sündinud järglastega emasloomad ( <i>N</i> )					
4. sünnijärgse päevani elus püsinud järglastega emasloomad ( <i>N</i> )					
Pesastunud embrüote arv tiinestunud emaslooma kohta (keskmine)					
Elussündide arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
4. päevani elus püsinud järglaste arv järglastega emaslooma kohta (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) sünnihetkel (keskmine)					
Sugude vahekord (isased/emased) 4. päeval (keskmine)					
Pesakonna kaal sünnihetkel (keskmine)					
Pesakonna kaal 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass sünnihetkel (keskmine)					
Järglaste kehamass AGD mõõtmise hetkel (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine)					
Järglaste AGD samal sünnijärgsel päeval ajavahemikul sündimispäevast kuni 4. päevani (isasloomade keskmine, emasloomade keskmine; märkida sünnijärgne mõõtmispäev)					
Järglaste kehamass 4. päeval (keskmine)					
Järglaste kehamass 13. päeval (keskmine)					

▼ **M8**

VAATLUSED	VÄÄRTUSED				
Nisade esinemine isastel järglastel 13. päeval (keskmine)					
<b>KÕRVALEKALLETEGA JÄRGLASED</b>					
Järglastega emasloomad, kellel on 0 kõrvalekalletega järglast					
Järglastega emasloomad, kellel on 1 kõrvalekalletega järglane					
Järglastega emasloomad, kellel on $\geq 2$ kõrvalekalletega järglast					
<b>JÄRGLASTE KADU</b>					
<b>Sünnieelne (pesastunud embrüote arvu ja elussündide arvu vahe)</b>					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
$\geq 3$ järglast kaotanud emasloomad					
<b>Sünnijärgne (elussündide arvu ja 13. sünnijärgse päevani elus püsinud järglaste arvu vahe)</b>					
0 järglast kaotanud emasloomad					
1 järglase kaotanud emasloomad					
2 järglast kaotanud emasloomad					
$\geq 3$ järglast kaotanud emasloomad					
<sup>(1)</sup> Paaritusperioodi viimane päev.					

## ▼M8

B.65. *IN VITRO* MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETOD NAHASÖÖVITUSE UURIMISEKS

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 435 (2015). Nahasöövituse on Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS (Globally Harmonized System) (1) ning Euroopa Liidu määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (CLP-määrus),<sup>(1)</sup> esitatud määratluse kohaselt pöördumatu nahakahjustuse, st marrasknahast pärisnahani ulatava nähtava nekroosi tekkinine uuritava kemikaali pealekandmise tagajärjel. Käesolev katsemeetod, mis on samaväärne ajakohastatud OECD katsejuhendiga nr 435, on *in vitro* membraanibarjääri katsemeetod, mis saab kasutada söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks. Katsemeetodis kasutatakse tehismembraani, mis on kavandatud söövitavatele kemikaalidele reageerima sarnaselt loomanahale *in situ*.
  
2. Nahka söövitavat toimet on tavapäraselt hinnatud, kandes uuritavat kemikaali elusloomade nahale ja hinnates nahakahjustuse ulatust pärast kindla perioodi möödumist (2). Peale käesoleva meetodi on söövitavate kemikaalide kindlakstegemiseks kasutatava standardse küüliku *in vivo* nahakatse (käesoleva lisa peatükk B.4, samaväärne OECD katsejuhendiga nr 404) (2) alternatiividena vastu võetud mitu muud *in vitro* katsemeetodit (3, 4). ÜRO GHSi astmelise katsetamise ja hindamise strateegia nahka söövitava toime hindamiseks ja klassifitseerimiseks ning OECD juhenddokumendis nahaärrituse/söövitusega seotud katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta soovatakse kasutada valideeritud ja heaks kiidetud *in vitro* katsemeetodeid moodulite 3 ja 4 kohaselt (1, 5). Kõnealuse katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi raames kirjeldatakse mitut moodulit, milles teabeallikad ja analüüsivahendid on rühmitatud, ning i) antakse suuniseid, kuidas lõimida ja kasutada olemasolevaid katse- ja muud andmeid kemikaalide võimaliku nahka ärritava ja nahka söövitava toime hindamiseks ja ii) pakutakse välja lähenemisviisi juhuks, kui on vaja teha täiendavaid katseid, kaasa arvatud juhuks, kui saadakse negatiivsed tulemused (5). Selle modulaarse lähenemisviisi korral saab kasutada *in vitro* katsemeetoditega saadud positiivseid tulemusi kemikaali klassifitseerimiseks söövitavana, ilma et oleks vaja täiendavaid loomkatseid; seega vähendatakse ja täiustatakse loomade kasutamist ja välditakse nende kasutamisega kaasneva võivaid valu ja kannatusi.
  
3. Valideerimisuuringud viidi läbi *in vitro* membraanibarjääri mudeliga, mis on müügil nimega Corrositex<sup>®</sup> (6, 7, 8) ja millega 163 ainet ja segust koosneva andmebaasi järgi oli kogutäpsus nahka söövitava toime prognoosimisel 79 % (128/163), tundlikkus 85 % (76/89) ning spetsiifilisus 70 % (52/74) (7). Tunnustatud nõuetekohasuse alusel on seda valideeritud võrdlusmeetod (VRM) soovitatav kasutada astmelise katsetamise strateegia osana kemikaalide võimalik nahka söövitava toime hindamisel (5, 7). Enne kui *in vitro* membraanibarjääri mudeliga katsemeetodit nahasöövituse uurimiseks võib kasutada regulatiivsel eesmärgil, tuleb kooskõlas eelnevalt kindlaksmääratud toimivusnõuetega (10) kindlaks teha selle usaldusväärsus, asjakohasus (täpsus) ja selle kavandatud kasutusega seotud piirangud, et tagada selle sarnasus valideeritud võrdlusmeetodiga (9). Andmete vastastikune tunnustamine vastavalt OECD kokkuleppele tagatakse ainult pärast seda,

<sup>(1)</sup> Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353/1, 31.12.2008).

## ▼M8

kui mis tahes uus või ajakohastatud kavandatud meetod on toimivusnõudeid järgides läbi vaadatud ja lisatud samaväärsesse OECD katsejuhendisse. Praegu on OECD katsejuhendiga nr 435 hõlmatud ainult üks *in vitro* ja käesoleva katsemeetod müügil oleva Corrositex<sup>®</sup>i mudeliga.

4. Teised katsemeetodid nahka söövitava toime uurimiseks põhinevad rekonstrueeritud inimnahal (OECD katsejuhend nr 431) (3) ja isoleeritud rotinaha kasutamisel (OECD katsejuhend nr 430) (4). Käesoleva katsejuunise järgi saab söövitavaid kemikaali jagada kolme ÜRO GHSi kohasesse söövitavuse alamkategoriasse ja söövitusohu järgi kolme ÜRO veopakendi rühma. Käesolev katsejuhend võeti esmakordselt vastu 2006. aastal ja seda ajakohastati 2015. aastal, et viidata katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi juhenddokumendile ning ajakohastada pädevuse tõendamise ainete loendit.

## MÕISTED

5. Kasutatud mõisted on esitatud liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Selles katsemeetodis kirjeldatud katse-eeskiri võimaldab kvalitatiivselt analüüsida söövitavaid uuritavaid kemikaale ning jagada need ÜRO GHSi / CLP-määruse kohastesse alamkategoriasse (tabel 1). Peale selle võib sellist katsemeetodit kasutada otsustamiseks konkreetsete kemikaalide, nt orgaaniliste ja anorgaaniliste hapete, happederivaatide<sup>(1)</sup> ja aluste söövitavate ja mittesöövitavate omaduste üle teatavate veokatsete puhul (7, 11, 12). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse valideeritud võrdlusmeetodile (7) sarnanevat üldmeetodikat. See katsemeetod ei anna asjakohast teavet nahaärrituse kohta, seega tuleb märkida, et katsemeetodiga B.46 (samaväärne OECDkatsejuhendiga nr 439) uuritakse spetsiaalselt *in vitro* sellist tervise mõju nagu nahaärritus (13). Nahale pärast ühekordset kokkupuudet avalduva paikse toime täielikuks hindamiseks tuleb juhinduda OECD juhenddokumendist katsete tegemist ja hindamist käsitleva ühtse lähenemisviisi kohta (5).

Tabel 1

ÜRO GHSi kohane nahka söövitava aine kategooria ja alamkategoriad<sup>(1)</sup>

Söövituskategooria (1. kategooria) (ametiasutustele, kes alamkategoriaid ei kasuta)	Võimalikud söövituse alamkategoriad <sup>(1)</sup> (ametiasutustele, kes kasutavad alamkategoriaid, sealhulgas CLP-määrust)	Söövitav vähemalt ühe looma puhul kolmest	
		Kokkupuuteaeg	Vaatlus
Söövitav	Söövitav, alamkategooria 1A	≤ 3 minutit	≤ 1 tund
	Söövitav, alamkategooria 1B	> 3 minutit / ≤ 1 tund	≤ 14 päeva
	Söövitav, alamkategooria 1C	> 1 tund / ≤ 4 tundi	≤ 14 päeva

<sup>(1)</sup> ELis kohaldatakse CLP-määrust, milles on esitatud kolm nahka söövitava aine alamkategoriat: 1A, 1B ja 1C.

7. Valideeritud võrdlusmeetodi (7) puuduseks on asjaolu, et paljud mittesöövitavad kemikaalid ja mõned söövitavad kemikaalid ei tarvitse esialgse sobivuskatse (vt punkt 13 alusel) uurimiseks sobida. Sageli ei sobi uurimiseks

<sup>(1)</sup> Happederivaadid ei ole konkreetne klass ning on üldiselt määratletud kui happest kas otseselt, muundamis- või asendusreaktsiooni käigus saadud kemikaal. Sellesse klassi kuuluvad anhüdriidid, halogeenhapped, soolad ja muud liiki kemikaalid.

▼ **M8**

kemikaalide vesilahused, mille pH on vahemikus 4,5...8,5; 85 % kõnealuse pH-vahemikuga uuritud kemikaalidest osutusid loomkatsetel mittesöövitavaks (7). *In vitro* membraanibarjääri meetodit võib kasutada tahkete ainete (vees lahustuvad või mittelahustuvad), vedelike (vesilahused või mitte) ja emulsioonide uurimiseks. Kuid uuritavaid kemikaale, mis sobivuskatsel tuvastatavat muutust (nt värvuse muutust valideeritud võrdlusmeetodi kemikaalide detekteerimissüsteemis) esile ei kutsu, ei saa membraanibarjääri meetodiga uurida ning nende uurimiseks tuleks kasutada muid katsemeetodeid.

## KATSE PÕHIMÕTE

8. Katsesüsteem koosneb kahest osast: sünteetilisest makromolekulaarsest biobarjäärist ja kemikaalide detekteerimissüsteemist; selle katsemeetodiga tuvastatakse kemikaalide detekteerimissüsteemi abil membraanibarjääri kahjustus, mille on põhjustanud söövitav uuritav kemikaal pärast sünteetilise makromolekulaarse membraanibarjääri pinnale kandmist (7) eeldatavast sama(de) söövitusemehhanismi(de) järgi mis toimivad elusorganismi nahal.
9. Membraanibarjääri läbimist saab mõõta mitme toiminguga või kemikaali detekteerimissüsteemiga, sealhulgas pH indikaatori värvuse muutuse või mõne muu indikaatorlahuse omaduse muutusega barjääri all.
10. Membraanibarjäär peab olema ettenähtud kasutamiseks nõuetekohane, st asjakohane ja usaldusväärne. Muu hulgas peavad olema tagatud preparaatide ühtsed barjääriomadused, st barjääri säilimine mittesöövitavate kemikaalide suhtes ja võimalus liigitada kemikaalid söövituseomaduste järgi erinevatesse ÜRO GHSi söövitavuse alamkategooriatesse (1). Klassifitseerimine põhineb ajal, mis kuulub kemikaali läbitungimiseks membraanibarjäärist ja indikaatorlahuseni jõudmiseks.

## PÄDEVUSE TÕENDAMINE

11. Enne käesoleval meetodil põhinevat *in vitro* membraanibarjääri meetodi rutiinset kasutamist tuleb laboril tõendada oma tehnilist pädevust, klassifitseerides õigesti tabelis 2 soovitud kaksteist pädevuse kontrolli ainet. Olukorras, kus loetletud aine ei ole kättesaadav, või kui see on põhjendatud, võib kasutada muud ainet (nt võrdluskemikaalide loetelust (10)), mille puhul on kättesaadavad piisavad võrdlusandmed *in vivo* ja *in vitro* katsete kohta, eeldusel, et järgitakse samu valikukriteeriumeid nagu esitatud tabelis 1.

Tabel 2

Pädevuse kontrolli ained <sup>(1)</sup>

Aine <sup>(2)</sup>	CASi nr	Aineklass	<i>In vivo</i> ÜRO GHSi kohane alamkategooria <sup>(3)</sup>	<i>In vitro</i> ÜRO GHSi kohane alamkategooria <sup>(3)</sup>
Boortrifluoriidihüdraat	13319-75-0	Anorgaanilised happed	1A	1A
Lämmastikhape	7697-37-2	Anorgaanilised happed	1A	1A
Fosforpentakloriid	10026-13-8	Anorgaaniliste hapete prekursorid	1A	1A
Valerüülkloriid	638-29-9	Hapete kloriidid	1B	1B
Naatriumhüdroksiid	1310-73-2	Anorgaanilised alused	1B	1B

## ▼M8

Aine <sup>(2)</sup>	CASi nr	Aineklass	<i>In vivo</i> ÜRO GHSi kohane alamkategoria <sup>(3)</sup>	<i>In vitro</i> ÜRO GHSi kohane alamkategoria <sup>(3)</sup>
1-(2-aminoetüül)piiperasiin	140-31-8	Alifaatsed amiinid	1B	1B
Benseensulfonüülkloriid	98-09-9	Hapete kloriidid	1C	1C
<i>N,N</i> -dimetüülbensüülamiin	103-83-3	Aniliinid	1C	1C
Tetraetüleenpentamiin	112-57-2	Alifaatsed amiinid	1C	1C
Eugenool	97-53-0	Fenoolid	MS	MS
Nonüülakrülaat	2664-55-3	Akrülaadid/ metakrülaadid	MS	MS
Naatriumvesinikkarbonaat	144-55-8	Anorgaanilised soolad	MS	MS

(<sup>1</sup>) Eespool loetletud kahesteistkümmet ainet seas on igast ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategorias kolm ainet ja kolm mittesöövitavat ainet; kõik ained on kaubanduses kättesaadavad ja ÜRO GHSi alamkategoriasse on nad määratud *in vivo* katsel saadud kvaliteetsete tulemuste alusel. Need ained on võetud loendist, mis sisaldab 40 ainet, mis omakorda kuuluvad miinimumloendisse kemikaalidest, mis on kindlaks määratud struktuurilt ja funktsioonilt valideeritud katsemeetodiga sarnaste katsemeetodite täpsuse ja usaldusvärsuse tõendamiseks, ning valiti 163 võrdluskemikaali seast, mida algselt kasutati võrdlusmeetodi (Corrositex<sup>®</sup>) valideerimiseks (7, 10, 14). Sellise valimise eesmärk oli, et võimaluste piires oleks valikuga hõlmatud kemikaalid, mis: kutsuvad esile söövitusreaktsiooni kogu vahemikus, mida valideeritud võrdlusmeetodiga on võimalik mõõta või prognoosida (st on mittesöövitavad või kuuluvad ÜRO I, II ja III söövitavate ainete pakendirühma); esindavad samu aineklasse, mida kasutati valideerimisel; on hästi teada oleva keemilise struktuuriga; andsid valideeritud võrdlusmeetodiga korratavaid tulemusi; andsid *in vivo* võrdluskatsel üheselt mõistetavaid tulemusi; on müügil ja mille kõrvaldamine ei ole seotud ülemääraste kuludega (14).

(<sup>2</sup>) Uuritavad ained puhtal kujul või puhtusastmega  $\geq 90$  %.

(<sup>3</sup>) ÜRO pakendirühmad I, II ja III vastavad ÜRO GHSi alamkategoriatele 1A, 1B ja 1C. MS: mittesöövitav.

## METOODIKA

12. Järgmistes punktides kirjeldatakse söövitavate omaduste hindamiseks kasutatava tehismembraanibarjääri katsemeetodi (7, 15) osi ja meetodikaid, mis põhinevad praegusel valideeritud võrdlusmeetodil, st müügil oleval Corrositex<sup>®</sup>-iga kasutataval meetodil. Membraanibarjääri, sobivuskatsel kasutatavad ja indikaatorlahused ning lahused, mis võimaldavad klassifitseerimist, võib sünteesida, valmistada või osta, nagu valideeritud võrdlusmeetodi puhul ostetakse Corrositex<sup>®</sup>. Saadaval on valideeritud katsemeetodi katse-eeskirja näidis (7). Katsed tuleb läbi viia toatemperatuuril (17–25 °C) ja nende osad peavad vastama järgmistele tingimustele.

## Uuritava kemikaali sobivuskatse

13. Enne membraanibarjääri katse tegemist tehakse sobivuskatse, et selgitada välja, kas kemikaali detekteerimissüsteem suudab uuritavat kemikaali avastada. Kui kemikaali detekteerimissüsteem uuritavat kemikaali avastada ei suuda, ei sobi membraanibarjääri katsemeetod selle konkreetse uuritava kemikaali võimalike söövitavate omaduste hindamiseks ja selleks tuleks kasutada teistsugust katsemeetodit. Sobivuskatses kasutatav kemikaali detekteerimissüsteem ja valitsevad kokkupuutetingimused peavad imiteerima järgnevas membraanibarjäärikatses toimuvat kokkupuudet.

## Uuritava kemikaali ajakategooria katse

14. Kui see on katsemeetodi juures asjakohane, peab sobivuskatse läbinud uuritav kemikaal läbima ka ajakategooria katse, st sõelkatse, millega eristatakse tükseisest nõrgad ja tugevad happed ja alused. Näiteks valideeritud võrdlusmeetodis kasutatakse ajakategooria katset selleks, et teha kindlaks, millist ajavahemikku kahest võimalikust kasutada, võttes aluseks leitud

**▼M8**

puhvermahtuvuse suuruse. Olenevalt uuritava kemikaali puhvermahtuvusest tuleks söövitavate omaduste ja ÜRO GHSi nahasöövituse alamkategoriate kindlaksmääramisel kasutada kaht erinevat läbimisaja vahemikku.

**MEMBRAANIBARJÄÄRI KATSEMEETODI OSAD****Membraanibarjäär**

15. Membraanibarjäär koosneb kahest osast: Makromolekulaarne veepõhine valgugeel ja läbitav tugimembraan. Valgugeel peab olema vedelikele ja tahketele ainetele läbitungimatu, kuid see võib muutuda läbitavaks söövitamise tulemusena. Valmis konstrueeritud membraanibarjääri tuleb hoida eelnevalt kindlaksmääratud tingimustes, mis välistavad geeli riknemise, nt kuivamise, mikroobide kasvu, kihistumise, pragunemise vms, mis halvendaks selle toimivust. Tuleb kindlaks määrata vastuvõetav säilitusaeg ja pärast selle möödumist membraanibarjääri preparaate mitte kasutada.
  
16. Läbitav tugimembraan pakub valgugeelile mehaanilist tuge geelistumise ja uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal. Tugimembraan peaks takistama geeli kortsustumist ja nihkumist ning laskma hästi läbi kõiki uuritavaid kemikaale.
  
17. Valgugeel, mis koosneb näiteks keratiinist, kollageenist või valkude segust, mis moodustavad geelimaatriksi, on uuritava kemikaali sihtobjekt. Valgumaterjal kantakse tugimembraani pinnale ja lastakse enne membraanibarjääri indikaatorlahuse kohale seadmist geelistuda. Valgugeel peab olema läbivalt ühtlase paksuse ja tihedusega, ilma õhumullide ja muude defektideta, mis võiksid mõjutada selle funktsionaalset terviklikkust.

**Kemikaalide detekteerimissüsteem**

18. Indikaatorlahus, mis on sama mis sobivuskatses kasutatud, peab reageerima uuritava kemikaali olemasolule. Kasutada tuleb värvainest või värvainete segust pH-indikaatorit, nt kresoolpunast või metüüloranži, mis uuritava kemikaali olemasolule reageerides värvi muudavad. Mõõtesüsteem võib olla visuaalne või elektrooniline.
  
19. Detekteerimissüsteeme, mis on välja töötatud tuvastama uuritava kemikaali läbiminekut membraanibarjäärist, tuleb hinnata asjakohasuse ja usaldusväärsuse seisukohast, et teha kindlaks avastatavate kemikaalide hulk ja kvantitatiivne avastamispiir.

**KATSE KÄIK****Katsemetodi osade kokkupanek**

20. Membraanibarjäär paigutatakse indikaatorlahust sisaldavasse viaali (või katseklaasi), nii et tugimembraan on indikaatorlahusega täielikus kontaktis ja õhumulle ei esine. Tuleb olla ettevaatlik, et barjääri terviklikkus säiliks.

**▼M8****Uuritava kemikaaliga töötlemine**

21. Membraanibarjääri pealmisele pinnale kantakse hoolikalt ühe kihina sobiv kogus (nt 500 µl vedelikku või 500 mg pulbristatud tahket ainet (7)) uuritavat kemikaali ja aetakse ühtlaselt laiali. Iga uuritava kemikaaliga tehakse sobiv hulk paralleelproove, nt neli (7), samuti tehakse paralleelsed kontrollproovid (vt punktid 23–25). Registreeritakse uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmise aeg. Et tagada lühikese söövitusaaja täpne registreerimine, ei kanta uuritavat kemikaali paralleelproovidega viaalidesse samaaegselt.

**Membraanibarjääri läbimise mõõtmine**

22. Iga viaali jälgitakse ning registreeritakse ajahetk, mil indikaatorlahus esmakordselt muutub, st barjäär läbitakse, samuti tehakse kindlaks kemikaali pealekandmisest membraanibarjääri läbimiseni kulunud aeg.

**Kontrollproovid**

23. Katsetes, kus koos uuritava kemikaaliga kasutatakse kandeainet või lahustit, peab kandeaine või lahusti membraanibarjäärisüsteemiga sobima, st see ei tohi muuta membraanibarjääri süsteemi terviklikkust ega uuritava kemikaali söövitavaid omadusi. Vajaduse korral tuleb uuritava kemikaaliga paralleelselt teha kontrollproov lahusti (või kandeainega), et veenduda lahusti sobivuses membraanibarjäärisüsteemiga.
  
24. Selleks, et hinnata katsesüsteemi vastuvõetavat toimivust, tehakse uuritava kemikaaliga paralleelselt katse positiivse (söövitava) kontrollprooviga, mille söövitavad omadused on keskmised, nt  $110 \pm 15$  mg naatriumhüdrosiidiga (ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategooria 1B) (7). Söövitava uuritava kemikaali suhtelise söövituspotsiaali hindamiseks võib kasutada teist positiivset kontrollproovi ainet, mis kuulub uuritava kemikaaliga samasse aineklassi. Positiivsetesse kontrollproovidesse tuleb valida ained, mille söövitavad omadused on keskmise tugevusega (nt ÜRO GHSi alamkategooriasse 1B kuuluvad ained), et avastada muutusi läbitungimisaegades, mis võib olla lubamatult pikem või lühem kui kindlaksmääratud võrdlusväärtus, näidates seega, et katsesüsteem ei toimi nõuetekohaselt. Sellisel juhul on vähe kasu äärmiselt söövitavatest (ÜRO GHSi alamkategooria 1A) ja mitesöövitavatest kemikaalidest. Söövitav kemikaal, mis kuulub ÜRO GHSi alamkategooriasse 1B, võimaldaks avastada liiga pikka või liiga lühikest läbitungimisaega. Nõrgalt söövitavat ainet (ÜRO GHSi alamkategooria 1C) võib kasutada positiivses kontrollproovis, et mõõta, kui järjepidevalt on katsemeetodiga võimalik eristada nõrgalt söövitavaid ja mitesöövitavaid kemikaale. Olenevatest lähenemisviisidest tuleks positiivse kontrollproovidega saadud vastuvõetavate tulemuste vahemik välja töötada laboris varem kasutatud positiivsete kontrollproovidega saadud läbitungimisaegade vahemiku (nt keskvärtus  $\pm 2-3$  standardhälvet) alusel. Iga uuringu käigus tuleb määrata positiivse kontrollproovi täpne läbitungimisaeg, et tuvastada vastuvõetavast vahemikust väljapoole langevad kõrvalekalded.
  
25. Paralleelselt uuritava kemikaaliga tuleb teha katse ka negatiivse (mitesöövitava) kontrollprooviga (nt 10 % sidrunhape, 6 % propioonhape (7)), mis on veel üks kvaliteedikontrolli meede membraanibarjääri funktsionaalse terviklikkuse tõendamiseks.



## ▼M8

## Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

26. Vastavalt iga ÜRO GHSi söövitavate omaduste alamkategorია kohta kindlaksmääratud ajaparametritele kasutatakse uuritava kemikaali söövitavate omaduste prognoosimiseks uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjääri läbimiseni kulunud aega (minutites). Et uuringut saaks lugeda nõuetekohaseks, peab paralleelne positiivne kontrollproov andma eeldatava läbitungimisaja (st 8–16 minutit, kui positiivse kontrollainena kasutatakse naatriumhüdrosiidi), paralleelne negatiivne kontrollproov ei tohi olla söövitav ja lahusti kontrollproov, kui seda uuritakse, et tohi olla söövitav ega muuta uuritava kemikaali söövituspotsentsiaali. Enne käesoleval katsemeetodil põhineva meetodi rutiinset kasutamist peaksid laborid tõendama oma tehnilist pädevust, kasutades tabelis 2 soovitatud kahteistkümmet ainet. Niisuguste käesoleva katsemeetodi alusel välja töötatud samalaadsete meetodite puhul, mis on valideeritud võrdlusmeetodiga (14) struktuurilt ja funktsioonilt sarnased, tuleks kasutada eelnevalt kindlaksmääratud toimevõimeid, et tõendada uue meetodi usaldusväärsust ja täpsust enne selle kasutamist regulatiivsel eesmärgil (10).

## Tulemuste tõlgendamine ja uuritavate kemikaalide klassifitseerimine söövitava toime järgi

27. Uuritava kemikaali membraanibarjäärile kandmisest barjäärist läbitungimiseni kulunud aja (minutites) järgi klassifitseeritakse uuritav kemikaal ÜRO GHSi söövitavate ainete alamkategoriasse (1) ja ÜRO pakendirühma (16), kui see on asjakohane. Iga soovitatava katsemeetodi jaoks tehakse kindlaks läbitungimisaja läviväärtused kõigi kolme söövitavate omaduste alamkategorია puhul. Läbitungimisaja läviväärtuste kohta lõpliku otsuse tegemisel tuleb arvestada vajadust minimeerida söövitusohu alahindamist ja madalamasse kategorias klassifitseerimist (st valenegatiivseid tulemusi). Praeguse katsejuhendi kohaselt tuleks kasutada Corrositex<sup>®</sup>iga kehtivaid läbitungimisaja läviväärtusi, mis on esitatud tabelis 3, sest see on ainus katsemeetod, mis hetkel katsejuhendile vastab (7).

Tabel 3

Corrositex<sup>®</sup>i prognoosimismudel

Keskmine läbitungimisaja (min)		Prognoositav ÜRO GHSi kategooria <sup>(3)</sup>
1. kategooria uuritav kemikaal <sup>(1)</sup> (määratud meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	2. kategooria uuritav kemikaal <sup>(2)</sup> (määratud meetodi kategoriseerimiskatse alusel)	
0–3 min	0–3 min	Söövitav võimalik alamkategorია 1A
> 3 kuni 60 min	> 3 kuni 30 min	Söövitav võimalik alamkategorია 1B
> 60 kuni 240 min	> 30 kuni 60 min	Söövitav võimalik alamkategorია 1C
> 240 min	> 60 min	Mittesöövitav

(1) Suure puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)

(2) Väikese puhvermahtuvusega uuritavad kemikaalid (6)

(3) ÜRO GHSi alamkategoriad 1A, 1B ja 1C vastavad ÜRO I, II ja III pakendirühmale

**▼M8****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

28. Uuritava kemikaaliga ja positiivse(te) kontrollproovi(de)ga saadud aeg (minutites), mis kulus pealekandmisest barjääri läbimiseni, tuleb esitada tabelina, kus on näidatud nii eraldi andmed iga paralleelproovi kohta kui ka iga katse keskmine tulemus  $\pm$  standardhälve.

**Katseprotokoll**

29. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Uuritav kemikaal ja kontrollained*

- Ühest koostisosast koosnev aine: kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;
- mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu: võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest omadustest;
- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- tarnija ja partii number, kui see on olemas;
- vajaduse korral teave uuritava kemikaali / kontrollaine töötlemise kohta enne katset (näiteks soojendamine, peenestamine);
- uuritava kemikaali püsivus ja aegumiskuupäev või kordusanalüüsi tegemise tähtpäev, kui see on teada;
- säilitustingimused.

*Kandeaine*

- Identimisandmed, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud ruumala;
- kandeaine valimise põhjendus.

*Kasutatud in vitro membraanibarjäär ja meetodika, sealhulgas tõendatud täpsus ja usaldusvärsus**Katsetingimused:*

- kasutatud aparatuur ja preparaadi ettevalmistusmeetodid;
- kasutatud *in vitro* membraanibarjääri tarnija ja koostis;
- indikaatorlahuse koostis ja omadused;
- avastamismeetod;
- uuritava kemikaali ja kontrollainete kogused;
- paralleelproovide arv;
- ajakategooria katse kirjeldus ja selle valimise põhjendus;

**▼M8**

- pealekandmismeetod;
- vaatluse aeg;
- kasutatud hindamis- ja klassifitseerimiskriteeriumide kirjeldus;
- Katsemetodi kasutamise pädevuse tõendamine, analüüsides asjaomaseid kemikaale enne meetodi rutiinset kasutamist.

*Tulemused*

- Iga uuritava ja kontrollprooviga igal paralleelkatsel saadud andmed tabelina;
- muude täheldatud toimete kirjeldus;
- tuletatud klassifikatsioon(id) viitega kasutatud prognoosimudelile ja/või otsustamiskriteeriumidele.

*Tulemuste arutelu**Järeldused***KIRJANDUS**

- (1) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO), *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 5. täiendatud väljaanne, United Nations, New York ja Genf, 2013. Kättesaadav aadressil [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- (2) Käesoleva lisa peatükk B.4, „Äge nahaärritus, söövitus“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk B.40bis, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutatav katsemetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.40, „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanselelektritakistuse (TER) mõõtmine“.
- (5) OECD (2015), „Guidance Document on an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 203), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. ja Liebsch, M. (1998), „The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team“, *Toxicology In Vitro*, nr 12, lk 483–524.
- (7) ICCVAM (1999), „Corrositex<sup>®</sup>. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM“, NIEHS, NIH Publication (nr 99–4495).
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. ja Maibach H.I. (1994), „Dermal Corrosion, the Corrositex<sup>®</sup> System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization“, *Alternative Methods in Toxicology*, nr 10, lk 37–45.

**▼M8**

- (9) OECD (2005), „Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment“, Environmental, Health and Safety Publications, Series on testing and Assessment (nr 34).
- (10) OECD (2014), „Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435“, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/chemical-safety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- (11) ECVAM (2001), „Statement on the Application of the CORRO-SITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing“, ECVAMi teadusliku nõuandekomitee 15. istungjärk, ISPRA; Itaalia. ATLA nr 29, lk 96–97.
- (12) USA Transpordiministerium (2002), *Exemption DOT-E-10904* (5. täiendatud väljaanne), (20. september 2002), Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Käesoleva lisa peatükk B.46, „Nahasöövituskatse *in vitro*: rekonstrueeritud inimese epidermist (RHE) kasutatav katsemeetod“, ICCVAM (2004), „ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion“, NIEHS, NIH Publication (nr 04–4510). Kättesaadav aadressil [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal\\_docs/ps/ps044510.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf).
- (14) USA Keskkonnakaitseamet (1996), „Method 1120, Dermal Corrosion“. Kättesaadav aadressil <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Ühinenud Rahvaste Organisatsioon (ÜRO) (2013), *UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations*, 18. täiendatud väljaanne (peatükk 2.8), UN, 2013. Kättesaadav aadressil [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18\\_Volume1\\_Part2.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf).

▼ **M8***Liide***MÕISTED**

**Täpsus:** katsemeetodiga saadud tulemuste ja nõuetekohaste võrdlusväärtuste kokkulangevuse määär. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks olulistest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (9).

**Kemikaal:** aine või segu.

**Kemikaalide detekteerimissüsteem:** visuaalne või elektrooniline mõõtesüsteem indikaatorlahusega, mis reageerib uuritava kemikaali või muude kemikaalide olemasolule või elektrokeemilise reaktsiooni toimumisele nt pH-indikaatorvärv-aine või värvainete segu värvuse muutusega.

**Vastavus:** katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategooriline tulemus, on üks asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse mõnikord ka täpsuse tähenduses ja määratletakse kõigi nende uuritavate kemikaalide osakaaluna, mis saadud positiivse või negatiivse tulemuse alusel klassifitseeritakse õigesti. Vastavus on tugevas sõltuvuses positiivset tulemust andvate kemikaalide esinemissagedusest uuritavate kemikaalide hulgas (9).

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem):** süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskaardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

**IATA:** Integrated Approach on Testing and Assessment – ühtne lähenemisviis katsete tegemisele ja hindamisele.

**Segu:** kahest või enamast ainest koosnev segu või lahus.

**Ühest koostisosast koosnev aine:** aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles ühe peamise koostisosa sisaldus on vähemalt 80 massiprotsenti.

**Mitme koostisosaga aine:** aine, mis on määratletud oma kvantitatiivse koostisega, milles rohkem kui ühe peamise koostisosa kontsentratsioon on  $\geq 10$  % ja  $< 80$  % (massiprotsendid). Mitme koostisosaga aine saadakse tootmisprotsessi käigus. Erinevus segu ja mitme koostisosaga aine vahel seisneb selles, et segu saadakse kahe või enama aine kokku segamisel, ilma et toimuks keemilist reaktsiooni. Mitme koostisosaga aine saadakse keemilise reaktsiooni tulemusel.

**MS:** mittesõovitav

**Toimivusnõuded:** valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. See hõlmab järgmist: i) olulisemad katsemeetodi osad; ii) valideeritud katsemeetodi nõuetekohase toimivuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) sarnased usaldusväärsuse ja täpsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (9).

**▼ M8**

**Asjakohasus:** mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat mõju, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või prognoosida huvipakkuvat bioloogilist mõju. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi täpsuse (vastavuse) aspekti (9).

**Usaldusväärsus:** iseloomustab katsemeetodi korratavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusvääruse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline korratavus (9).

**Tundlikkus:** kõigi positiivsete/reaktsioonivõimeliste kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

**Nahasöövitus *in vivo*:** naha pöördumatu kahjustuse tekitamine, läbi epidermise pärisnahka (dermasse) ulatuv nähtav nekroos, mis tekib kuni neljatunnisel kokkupuutel katseainega. Tüüpilised söövitusnähud on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14-päevase vaatlusperioodi lõpuks ilmnev värvimuutus naha valastumise tõttu, täielik alopeetsia ja armistumine. Ebaselgete kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilise analüüsi tegemist.

**Spetsiifilisus:** kõigi niisuguste negatiivsete/mittereageerivate kemikaalide osakaal, mis katsemeetodiga klassifitseeritakse õigesti. Spetsiifilisusega iseloomustatakse katsemeetodi täpsust, kui saadud tulemusi saab kategoriseerida, ning see on oluline aspekt katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

**Aine:** looduslik või tootmisprotsessi teel saadud keemiline element ja selle ühendid, kaasa arvatud stabiilsuse säilitamiseks vajalikud lisained ja tootmisprotsessist tingitud lisandid, välja arvatud mis tahes lahusti, mida on võimalik aine stabiilsust vähendamata ja selle koostist muutmata eraldada.

**Uuritav kemikaal:** iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB:** tundmatu või muutuva koostisega ained, kompleksed reaktsioonisaadused või bioloogilist päritolu materjalid.

▼ **M8**

**B.66. STABIILSE TRANSFEKTSIOONIGA TRANSAKTIVATSIOONI *IN VITRO* KATSEMEETODID, MILLEGA AVASTATAKSE ÖSTROGEENIRETSEPTORITE AGONISTE JA ANTAGONISTE**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼M8

B.67. TÜMIDIINI KINAASI GEENIL PÕHINEVAD *IN VITRO* GEENIMUTATSIOONIKATSED IMETAJARAKKUDEGA

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 490 (2016). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi ja täiendatakse, et võtta arvesse teaduse arengut, regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Hiire lümfoomi katse (MLA) ja TK6-katse, milles kasutatakse tümidiini kinaasi (TK) lookust, olid varem hõlmatud katsemeetodiga B.17. Genotoksilisuse uuringute rahvusvahelise seminari (IWGT) MLA ekspertide tööühm on välja töötanud rahvusvaheliselt ühtlustatud soovitusel katsemeetodi nõuetekohasuse kriteeriumide ja andmete tõlgendamise kohta MLA korral (1, 2, 3, 4, 5) ja need soovitusel on hõlmatud käesoleva uue katsemeetodiga B.67. Käesoleva katsemeetod on kirjutatud MLA jaoks, samuti TK6-katse jaoks, kuna viimases kasutatakse samuti TK lookust. Kuigi MLAd on regulatiivsel eesmärgil laialdaselt kasutatud, on TK6 kasutus palju harvem. Näitajate sarnasusest hoolimata ei ole kaks rakuliini üksteisega asendatavad ning regulatiivsetes kavades võidakse õiguspäraselt väljendada konkreetse regulatiivse eesmärgiga seoses eelistust ühe või teise katse suhtes. Näiteks on MLA valideerimine tõendanud selle sobivust mitte üksnes geenimutatsioonide tuvastamiseks, vaid ka selle kindlakstelemiseks, kas uuritav kemikaal võib indutseerida struktuurse kromosoomi aberratsiooni. Käesolev katsemeetod kuulub geneetilise toksikoloogia katsemeetodite seeriasse. OECD on välja töötanud dokumendi, milles on esitatud kokkuvõtlik teave geneetilise toksikoloogia valdkonna katsete kohta ning ülevaade genotoksilisust käsitlevates OECD katsejuhendites tehtud viimastest muudatustest (6).
2. Käesoleva meetodi kohaste imetajarakkudega läbi viidavate *in vitro* geenimutatsioonikatsete eesmärk on tuvastada kemikaalide põhjustatud geenimutatsioone. Kõnealustes katsetes kasutatakse rakuliine, mis võimaldavad tuvastada otsemutatsioone reportergeenides, täpsemalt endogeenset tümidiini kinaasi geenis (inimese rakkudes *TK* ja näriliserakkudes *Tk*, käesolevas katsemeetodis viidatakse neile koos kui geenile *TK*). Käesolev katsemeetod on ette nähtud kasutamiseks kahe rakuliiniga: hiire lümfoomi rakuliin the L5178Y  $TK^{+/-}$ -3.7.2C (üldise nimetusega L5178Y) ja inimese lümfoblastoidi rakuliin TK6 (üldise nimetusega TK6). Kuigi kahe rakuliini päritolu, rakkude kasvamine, p53-staatus jms varieerub, saab TK-geenimutatsioonikatsete mõlema rakutüübiga läbi viia sarnasel viisil, nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.
3. Tümidiini kinaasi geeni autosoomsus ja heterosügootsus võimaldavad tuvastada eluvõimelisi kolooniaid, mille rakkudel esineb ensüümi tümidiini kinaasi defitsiit mutatsiooni  $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$  tagajärjel. Kõnealune defitsiit võib olla *TK*-geeni mõjutavate sündmuste tagajärg, kusjuures sündmusteks võivad olla nii geenimutatsioonid (punktmutatsioonid, raaminihkemutatsioonid, väikesed deletsioonid jms) kui ka kromosoomidega toimuvad sündmused (suured deletsioonid, kromosoommutatsioonid ja mitootiline rekombinatsioon). Viimased sündmused väljenduvad heterosügootsuse kaoga, mis on tuumor-supressor geeni tavaline geneetiline muutus inimesel kasvaja tekke puhul. Teoreetiliselt saab MLAd tuvastada mitoosikävi kahjustusest ja/või mitootilisest mittelahknemisest põhjustatud terve *TK*-geeni kandva kromosoomi kadu. Kombineeritud tsütogeneetiline ja molekulaaranalüüs näitavad tõepoolest selgesti, et MLA TK-mutandid on mittelahknemise tagajärg. Kuid tõendite kaalukusest nähtub, et *TK*-geenimutatsioonikatsetega ei ole võimalik usaldusväärselt tuvastada aneugeene, kui kohaldatakse standardseid tsütotoksilisuse kriteeriume (nagu käesolevas katsemeetodis kirjeldatud), ning seetõttu ei sobi nimetatud katsed aneugeenide tuvastamiseks (7, 8, 9).



## ▼M8

4. *TK*-geenimutatsioonikatsetes luuakse kaks erinevat *TK*-mutantide fenotüübi-klassi; normaalse kasvuga mutandid, mis kasvavad sama kiirusega nagu *TK* heterosügootsed rakud, ning aeglase kasvuga mutandid, mille kasvamisel on populatsiooni kahekordistumisaeg pikenenud. Normaalse kasvuga ja aeglase kasvuga mutante nimetatakse MLA korral suurte kolooniate ja väikeste kolooniatega mutantideks ning *TK6* korral vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega mutantideks. Nii suurte kui ka väikeste kolooniatega MLA mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on uuritud täpsemalt (8, 10, 11, 12, 13). Vara tekkivate kolooniate ja hilja tekkivate kolooniatega *TK6* mutantide molekulaarset ja tsütogeneetilist olemust on samuti täpsemalt uuritud (14, 15, 16, 17). Mõlemat tüüpi rakkude aeglase kasvuga mutandid on saanud geneetilise kahjustuse, mis hõlmab oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, mille tulemusena kahekordistumise aeg pikeneb ja kolooniad moodustuvad hiljem või on väikesed (18). Aeglase kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis põhjustavad suuri struktuurimuutusi kromosoomi tasandil. Rakud, mille kahjustus ei hõlma oletatavat/oletatavaid kasvu regulaatorgeeni või -geene *TK*-lookuse lähedal, kasvavad vanemrakkudele sarnase kiirusega ja neist saavad normaalse kasvuga mutandid. Peamiselt normaalse kasvuga mutantide tekkimist on seostatud kemikaalidega, mis toimivad peamiselt punktmutageenidena. Sellest tulenevalt on oluline loendada nii aeglase kui ka normaalse kasvuga mutante, et leida kõik mutandid ja saada ülevaade uuritava kemikaali põhjustatud kahjustuste liigist või liikidest (mutageenid vs. klastogeneenid) (10, 12, 18, 19).
5. Katsemeetod on koostatud nii, et see annaks üldist teavet nii MLA kui ka *TK6* kohta ning spetsiifilisi suuniseid kummagi katse kohta eraldi.
6. Kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. *In vitro* katsete puhul tuleb metabolismi aktiveerimiseks üldjuhul kasutada eksogeenset allikat. Eksogeenne metabolismi aktiveerimise süsteem ei võimalda täielikult matkida *in vivo* tingimusi.
8. Tuleks hoiduda kasutamast tingimusi, mille puhul võib saada valepositiivseid tulemusi, mis ei ole põhjustatud uuritava kemikaali interaktsioonist raku geneetilise materjaliga (st võib esineda vastastikmõju katsesüsteemiga); sellised tingimused hõlmavad pH või osmolaalsuse muutusi, söötmekoostisomadega reageerimist (20, 21) või liiga suurt tsütotoksilisust (22, 23, 24). MLA ja *TK6*-katse puhul loetakse liiga suureks tsütotoksilisuseks punktis 28 määratletud soovitatavat suurimat tsütotoksilisuse määra ületavat tsütotoksilisust. Lisaks tuleb tähelepanu pöörata sellele, et uuritavad kemikaalid, mis on tümidini analoogid või käituvad sellisena, võivad raku töötlemise ajal suurendada muteerumissagedust muude spontaansete mutantide selektiivse kasvu teel ning nende nõuetekohaseks hindamiseks tuleb kasutada täiendavaid katsemeetodeid (25).
9. Tehislike nanomaterjalide uurimiseks võib olla vaja käesolevat katsemeetodit kohandada, kuid neid kohandusi ei ole käesolevas katsemeetodis kirjeldatud.
10. Enne kui kasutada käesolevat meetodit segu korral, et saada andmeid kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks, tuleb kaaluda, kas see katse annab selle eesmärgi jaoks piisavaid tulemusi ja kui annab, siis miks. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

## ▼M8

11. Muteerunud rakud, millel  $TK^{+/-}$  →  $TK^{-/-}$ -mutatsiooni tulemusel puudub ensüümi tümidüüni kinaasi aktiivsus, on resistentsed pürimidiini analoogi trifluorotümidüüni (TFT) tsütotoksiliste mõjude suhtes. Rakud, kus on olemas  $TK$ , on tundlikud TFT suhtes, mis pärsib rakkude ainevahetust ja peatab rakkude edasise jagunemise. Seega on muteerunud rakud võimelised TFT juuresolekul paljunema ja nähtavaid kolooniaid moodustama, kuid ensüümi  $TK$  sisaldavad rakud seda ei suuda.

## KATSE PÕHIMÕTE

12. Rakususpensioon viiakse sobivaks ajavahemikuks (vt punkt 33) kokkupuutesse uuritava kemikaaliga – nii koos metabolismi aktiveeriva eksogeense allikaga kui ka ilma selleta (vt punkt 19) – ning seejärel külvatakse rakud ümber, et hinnata tsütotoksilisust ja võimaldada fenotüübi avaldumist enne mutantide selekteerimist. Tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse MLA korral suhtelist kogukasvu (vt punkt 25) ja  $TK6$  korral suhtelist ellujäämist (vt punkt 26). Töödeldud kultuure hoitakse söötmes piisava aja jooksul, mis on iseloomulik igale rakutüübile (vt punkt 37), võimaldamaks saavutatud mutatsioonide fenotüüpide avaldumist võimalikult lähedal optimaalsele tasemele. Fenotüübi avaldumise järgselt külvatakse teadaolev arv rakke muteerumissageduse määramiseks nii söötmesse, mis sisaldab muteerunud kolooniate tuvastamist võimaldavat selektiivainet, kui ka selektiivaineta söötmesse, et teha kindlaks kloonimistõhusus (eluvõimelisus). Sobiva inkubatsiooniperioodi lõppedes kolooniad loendatakse. Muteerumissagedus arvutatakse muteerunud kolooniate arvu põhjal, mida on korrigeeritud lähtuvalt kloonimistõhususest mutantide selekteerimise ajal.

## MEETODI KIRJELDUS

## Ettevalmistused

*Rakud*

13. MLA korral: kuna MLA on välja töötatud  $L5178Y$  rakkude alaliini  $TK^{+/-}$ -3.7.2C kasutades ning selle kasutamine seda katsemeetodit iseloomustab, tuleb MLA korral kasutada seda konkreetset alaliini. Rakuliin  $L5178Y$  on saadud DBA-2 hiire tüümuse lümfoomist, mille on esile kutsunud metüülkolantreen (26). Clive ja kaastöötajad töötlesid  $L5178Y$  rakke (Clive'i tähistus  $TK^{+/+}$ -3) etüülmetaansulfonaadiga ja eraldasid  $TK^{-/-}$  (tähistus  $TK^{-/-}$ -3.7) kloonid, kasutades selektiivainena bromodeoksüüridiini.  $TK^{-/-}$  kloonist eraldati spontaanne  $TK^{+/-}$  kloon (tähistus  $TK^{+/-}$ -3.7.2.) ja alamkloon (tähistus  $TK^{+/-}$ -3.7.2C) ning iseloomustati neid MLAs kasutamiseks sobivana (27). Rakuliini karüotüüp on avaldatud (28, 29, 30, 31). Modaalne kromosoomiarv on 40. Leidub üks metatsentrilinekromosoom (t12;13), mis tuleb loendada ühe kromosoomina. Hiire  $TK$  lookus asub kromosoomi 11 distaalses otsas. Rakuliinil  $L5178Y$   $TK^{+/-}$ -3.7.2C on mutatsioonid mõlemas p53 alleelis ning see toodab muteerunud p53 valku (32, 33).  $TK^{+/-}$ -3.7.2C rakuliini p53 seisund mõjutab tõenäoliselt seda, kuidas on katsega võimalik tuvastada ulatuslikke kahjustusi (17).
14.  $TK6$  korral:  $TK6$  on inimese lümfoblastoidi rakuliin. Vanemrakuliin on Epstein-Barri viiruse toimele transformeerunud rakuliin WI-L2, mis algselt saadi päriliku sferotsütoosiga 5aastaselt meesisikult. Esimene isoleeritud kloon HH4 mutageniseeriti ICR191ga ja saadi  $TK$  heterosügootne rakuliin  $TK6$  (34).  $TK6$  rakud on peaaegu diploidsed ja esindav karüotüüp on 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Inimese  $TK$  lookus asub kromosoomi 17 pikas õlas.  $TK6$  on p53 sisaldav rakuliin, sest selle mõlemas alleelis on metsiktüüpi p53 järjestus ning see ekspresseerib üksnes metsiktüüpi p53 valku (36).

**▼M8**

15. Nii MLA kui ka TK6 puhul on soovitatav, et katselabor rakkude tüvikultuuri luues või uuendades veenduks *Mycoplasma* puudumises, kontrolliks rakkude karüotüüpi või värviks TK lookusega kromosoomid ning kontrolliks populatsiooni kahekordistumise aegu. Katselaboris kasutatavate rakkude puhul tuleb teha kindlaks normaalne rakutsüklikus kuluv aeg ja see peab vastama rakkude kohta avaldatud iseloomulikele näitajatele (16, 19, 37). Tüvikultuuri säilitatakse  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures või madalamal temperatuuril ning kasutatakse kõigi rakkude töökultuuride valmistamiseks.
16. Enne suure hulga krüosäilitatud töökultuuride valmistamist või otse enne katses kasutamist võib olla vajalik puhastada kultuur eelnevalt leiduvatest muteerunud rakkudest (kui lahusti kontrollproovi muteerumissagedus (MF) jääb juba lubatavatesse piiridesse – vt tabel 2 MLA kohta). Selleks kasutatakse metotreksaati (aminopteriini), et selekteerida rakud, mis ei ole TK defitsiidiga, ning lisatakse kultuurile tümidiini, hüpoksaantiini ja glütsiini (L5178Y) või 2'-deoksütsütiidiini (TK6), et tagada TK sisaldusega rakkude optimaalne kasv (19, 38, 39) (ja TK6 kohta (40)). Üldised nõuanded rakkude säilitamise hea tava kohta ning konkreetsed nõuanded L5178Y ja TK6 rakkude kohta on esitatud allikates (19, 31, 37, 39, 41). Laboritele, kus on vaja tüvikultuure MLA või TK6 alustamiseks või uusi tüvikultuure, on ligipääsetav hästi iseloomustatud rakkudega rakupank (37).

**Söötmed ja kultiveerimistingimused**

17. Mõlema katsemeetodi korral tuleks rakukultuuride kasvatamisel kasutada sobivat söödet ja sobivaid inkubeerimistingimusi (nt kasvunõud, 5 % CO<sub>2</sub>-sisaldusega niiske atmosfäär, inkubeerimistemperatuur 37 °C). Kultiveerimisel tuleks alati järgida tingimusi, millega tagatakse rakkude püsimine logaritmilises kasvufaasis. On väga oluline valida söötmed ja kasvutingimused nii, et oleks tagatud rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodil ning optimaalne kloonimine nii muteerunud kui ka muteerumata rakkude puhul. MLA ja TK6 korral on oluline ka see, et kultiveerimistingimused tagaksid nii suurte / vara tekkivate kolooniatega kui ka väikeste / hilja tekkivate kolooniatega Tk mutantide optimaalse kasvu. Rohkem üksikasju kultiveerimise, kaasa arvatud vajaduse kohta hobuseseerum soojusega korralikult inaktiveerida, kui kasutatakse RPMI söödet, on leitavad allikatest (19, 31, 38, 39, 40, 42).

**Rakukultuuride ettevalmistamine**

18. Rakkude paljundamiseks tüvikultuurist külvatakse need söötmesse sellise tihedusega, et rakkude eksponentsiaalne kasv suspensioonis jätkuks kogu töötlemis- ja ekspressiooniperioodi vältel.

**Metabolismi aktiveerimine**

19. L5178Y jaTK6 rakkude kasutamise korral tuleks kasutada eksogeenseid metabolismisüsteeme, sest nende rakkude endogeenne metaboliseerimisvõime on ebapiisav. Kui ei ole teisiti põhjendatud, soovatakse vaikevalikuna kõige sagedamini kasutatavat süsteemi, milleks on näriliste (tavaliselt roti) maksast valmistatud postmitokondriline fraktsioon S9, millele on lisatud kofaktor ning mida on töödeldud ensüümide induktoritega, nagu Aroclor 1254 (43, 44, 45) või fenobarbitaali ja  $\beta$ -naftoflavooni kombinatsiooniga (46, 47, 48, 49, 50, 51). Viimati nimetatud kombinatsiooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (52) ning seon osutunud segafunktsiooniga oksüdaaside induktorina sama

**▼M8**

tõhusaks kui Aroclor 1254 (45, 46, 47, 48, 49). S9-fraaktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonivahemikus 1–2 % (mahuprotsent), kuid lõplikus katesöötmes võib kontsentratsiooni suurendada kuni 10 %-ni (mahuprotsent). Kasutatava eksogeense metabolismi aktiveerimise süsteemi või ensüümiinduktori liigi ja kontsentratsiooni valikut võib mõjutada uuritava kemikaali klass.

**Uuritava kemikaali ettevalmistamine**

20. Enne rakkude töötlemist tuleks tahke uuritav kemikaal lahustada sobivas lahustis ja vajaduse korral tuleks saadud lahust lahjendada (vt punkt 21). Vedelat uuritavat kemikaali võib lisada otse katsesüsteemi või seda enne lisamist lahjendada. Gaasilise või lenduva kemikaali kasutamisel tuleks standardmeetodit asjakohaselt muuta, näiteks viia kemikaaliga töötlemine läbi suletud kultiveerimisnõus (53, 54, 55). Uuritav kemikaal tuleks katseks ette valmistada vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui püsivuse andmetest nähtub, et kemikaali säilitamine on vastuvõetav.

**KATSETINGIMUSED****Lahustid**

21. Lahusti tuleks valida nii, et oleks tagatud uuritava kemikaali optimaalne lahustumine, kuid lahusti ei mõjutaks samal ajal negatiivselt katse käiku näiteks rakkude kasvu kiiruse või uuritava kemikaali omaduste muutmise, kultiveerimisnõuga reageerimise või metabolismi aktiveerimise süsteemi kahjustamise teel. Esmajärjekorras soovitatakse võimaluse korral kaaluda veepõhise lahusti (või söötme) kasutamist. Tavalised lahustid on näiteks vesi või dimetüülsulfoksiid. Üldjuhul ei tohiks töötlustapis kasutatavas lõppsöötmes orgaanilise lahusti sisaldus ületada 1 % (mahuprotsent) ja veepõhise lahusti (füsioloogiline lahus või vesi) sisaldus ei tohiks ületada 10 % (mahuprotsent). Kui kasutatakse muid kui tavaliselt kasutatavaid lahusteid (nt etanooli või atsetooni), tuleb nende kasutamiseks esitada andmed, millest nähtub nende kokkusobivus uuritava kemikaali ja katsesüsteemiga ning genotoksilise toime puudumine kasutatava kontsentratsiooni juures. Selliste tõendavate andmete puudumisel on oluline lisada katsesse kemikaaliga töötlemata kontrollproovid (vt 1. liide, määratlused), et tõendada valitud lahustist tuleneva kahjuliku või mutageense toime puudumist.

**TSÜTOTOKSILISUSE MÕÖTMINE JA TÖÖTLEMISKONTSENTRATSIOONIDE VALIMINE**

22. Uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooni valimisel tuleks hoiduda valimast kontsentratsiooni, mille puhul on võimalik saada valepositiivseid tulemusi, näiteks tulenevalt liiga suurest tsütotoksilisusest (vt punkt 28), söötmes sadenemisest (vt punkt 29) või pH või osmolaalsuse olulisest muutumisest (vt punkt 8). Kui uuritav kemikaal muudab lisamise hetkel oluliselt söötme pH-d, võib pH reguleerimiseks lisada töötlemiseks kasutatavasse lõppsöötmesse puhvrit, et hoida ära valepositiivsete tulemuste saamist ja säilitada sobivad kultiveerimistingimused.
23. Kontsentratsioonide valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest ja muudest kaalutlustest (vt punktid 27–30). Ehkki tsütotoksilisuse hindamine eelkatses võib põhikatses kasutatavate kontsentratsioonide täpsemaks kindlakstegemiseks kasulikuks osutada, ei ole eelkatse tegemine kohustuslik. Põhikatses on tsütotoksilisuse mõõtmine igas kultuuris vajalik ka juhul, kui tsütotoksilisust on eelnevalt juba hinnatud. Kui tehakse vahemiku leidmise katse, peab see hõlmama suurt kontsentratsioonide vahemikku ning selle võib lõpetada kas 1. päeval pärast töötlemist või pikendada seda ekspresseerimiseni ja mutantide selekteerimiseni 2. päeval (kui selgub, et kasutatavad kontsentratsioonid on selleks sobivad).

## ▼M8

24. Tsütotoksilisust tuleks määrata iga üksiku katsekultuuri ja kontrollkultuuri puhul: MLA (2) ja TK6 (15) korral kasutatavad meetodid on määratletud rahvusvaheliselt kokkulepitud tavaga.
25. Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist kogukasvu, mille määratlesid esmakordselt Clive ja Spector 1975. aastal (2). See näitaja hõlmab suhtelist suspensioonikasvu (katsekultuur vs. lahusti kontrollproov) rakkude töötlemise ajal, ekspresseerimisega ja kloonimise suhtelist tõhusust (katsekultuur vs. lahusti kontrollproov) mutantide selekteerimise ajal (2). Tuleks võtta arvesse, et suhteline suspensioonikasv hõlmab igasugust rakkude arvu võimalikku vähenemist, mis töötlemise ajal katsekultuuris tekib (vt valemid 2. liites).
26. TK6 korral: tsütotoksilisuse hindamiseks tuleks kasutada suhtelist ellujäämist, st võrrelda vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusust, mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, negatiivsete kontrollproovidega, mille ellujäämuseks loetakse 100 % (vt valem 2. liites).
27. Kemikaali tuleks hinnata vähemalt neljal nõuetekohasuse kriteeriumidele (sobiv tsütotoksilisuse määr, rakkude arv jne) vastaval katsekonsentratsioonil (see ei hõlma lahusti kontrollproovi ega positiivseid kontrollproove). Katse läbiviimisel on soovitatav kasutada iga katsekonsentratsiooni puhul kahte paralleelkultuuri, ent võib kasutada ka suuremat arvu paralleelkultuure või ühteainsat kultuuri. Iga konsentratsiooni puhul tuleks paralleelkultuuridega saadud tulemused esitada eraldi, kuid andmeanalüüsi jaoks võib need koondata (55). Uuritavate kemikaalide puhul, mille tsütotoksilisus on väike või millel see puudub, sobivad tavaliselt konsentratsioonid, mis erinevad üksteisest umbes kaks kuni kolm korda. Tsütotoksilisuse avaldumise korral, tuleb konsentratsioonid valida nii, et need kataksid tsütotoksilisuse vahemiku alates konsentratsioonist, mille juures avaldub tsütotoksilisus (nagu on kirjeldatud punktis 28), ja hõlmama konsentratsioonid, mille juures esineb mõõdukas ja väike (või olematu) tsütotoksilisus. Paljudel uuritavatel kemikaalidel on konsentratsiooni-vastuse kõver järsu tõusuga ning tsütotoksilisuse täieliku vahemiku katmiseks või konsentratsioonist-vastuse sõltuvuse üksikasjalikuks uurimiseks võib olla vaja kasutada üksteisest vähem erinevaid konsentratsioone ja enam kui nelja konsentratsiooni, eriti olukorras, kus on vaja teha korduskatse (vt punkt 70). Enam kui nelja konsentratsiooni kasutamine võib osutada eriti oluliseks, kui kasutatakse ühteainsat kultuuri.
28. Kui suurima konsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim konsentratsioon valida nii, et MLA puhul saavutataks suhteline kogukasv 10–20 % ning TK6 puhul suhteline ellujäämus 10–20 % (punkt 67).
29. Raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul, mis ei ole tsütotoksiline konsentratsioonidel, mis on väiksemad kui vähim konsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, peaks suurimal analüüsitaval konsentratsioonil olema pärast uuritava kemikaaliga töötlemise lõppemist täheldatav hägusus või silma või invertmikroskoobiga nähtav sade. Isegi kui tsütotoksilisus avaldub suuremal konsentratsioonil kui vähim konsentratsioon, mille juures kemikaal ei lahustu, on soovitatav teha katse ainult ühe sellise konsentratsiooniga, mille juures tekib hägusus või nähtav sade, sest sade võib toimet moonutada. Kuna MLA ja TK6 korral kasutatakse suspendeeritud kultuure, tuleb eriti hoolikalt veenduda, et sade ei mõjuta katse käiku. Enne katse alustamist võib olla kasulik määrata ka kemikaali lahustuvus sөөtmes.

## ▼ M8

30. Kui ei täheldata ei sadet ega liigset tsütotoksilisust, peaks suurim katsekonsentratsioon olema vähim järgmistest kontsentratsioonidest: 10 mM, 2 mg/ml või 2 µl/ml (57, 58). Kui uuritava kemikaali koostis ei ole määratav, näiteks kui see on tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsiooni-saadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB), keskkonnast saadud ekstrakt vms, võib juhul, kui ei täheldata kemikaali piisavat tsütotoksilisust, olla vaja selle iga koostisosa kontsentratsiooni suurendamiseks kasutada suuremat maksimumkontsentratsiooni (nt 5 mg/ml). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59).

**Kontrollproovid**

31. Iga katserežiimi puhul tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid kontrollproove (vt punkt 21), mis koosnevad üksnes töötlemiseks kasutatavale söömele lisatud lahustist ja mida käideldakse samamoodi kui töödeldud kultuure.
32. Paralleelseid positiivseid kontrollproove on vaja, et tõendada labori pädevust kasutatud katsete meetodika tingimustel määrata mutageene ja eksogeense metaboolse aktivatsiooni süsteemi tõhusust (kui asjakohane) ning tõendada suutlikkust nii väikeste / hilja tekkivate kui ka suure / vara tekkivate TK mutantide piisaval tuvastamisel. Positiivsete kontrollainete näited on esitatud allpool tabelis 1. Kui see on põhjendatud, võib positiivse kontrollainena kasutada mõnda muud ainet. Kuna *in vitro* genotoksilisuse katsed imetajarakkudega on piisavalt standarditud lühiajaliste (3–4 tundi) töötluste puhul, mis tehakse paralleelkatsetena metaboolse aktivatsiooniga või ilma selleta, kasutades sama kestusega töötlust, võib positiivse kontrollproovi osas piiruda metaboolset aktiveerimist vajava mutageeniga. Sel juhul võimaldab üheainsa kõnealuse positiivse kontrollprooviga saadud tulemus tõendada nii metabolismi aktiveerimise süsteemi toimimist kui ka katsesüsteemi reageerimisvõimet. Pikaajalise töötluste jaoks (st 24 tundi ilma S9-fraktsioonita), kui seda kasutatakse, peab siiski olema oma positiivne kontrollproov, sest töötluste kestus erineb sellest, mida kasutatakse metaboolse aktivatsiooniga katses. Iga positiivset kontrollainet puhul tuleks kasutada ühes või mitmes kontsentratsioonis, mille juures võib eeldada, et saadakse korratavad ja tuvas-tatavad, tausttasest ületavad tulemused, mis võimaldavad tõendada katsesüsteemi tundlikkust, ning samal ajal ei tohiks tulemused olla mõjutatud käes-olevas katsete meetodis sätestatud piirmäära ületavast tsütotoksilisusest (vt punkt 28).

Tabel 1

**Labori pädevuse hindamiseks ja positiivsete kontrollainete valimiseks soovitatavad etalonained**

Kategooria	Aine	CASi nr
1. Metaboolse aktivatsioonita toimivad mutageenid		
	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3
	Mitomütsiin C	50-07-7
	4-nitrokinoliin-N-oksiid	56-57-5
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad mutageenid		
	Benso[ <i>a</i> ]püree	50-32-8
	Tsüklofosfamiid (monohüdraat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetüülbensantratseen	57-97-6
	3-metüülkolantreen	56-49-5

▼ **M8****METOODIKA****Uuritava kemikaaliga töötlemine**

33. Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava kemikaaliga nii metabolismi aktiveerimise süsteemi juuresolekul kui ka ilma selleta. Kokkupuuteperiood peab olema sobiva pikkusega (tavaliselt piisab 3–4 tunnist). Tuleks siiski märkida, et inimravimite puhul võivad need nõuded olla teistsugused (59). Kui MLA korral annab lühiajaline töötlemine negatiivsed tulemused ja leidub teavet, mille kohaselt oleks vaja pikemat töötlemist [nt nukleosiidi analoogid, halvasti lahustuvad kemikaalid (5, 59)], tuleks kaaluda katse tegemist pikema, nt 24-tunnise töötlemisega ilma S9-fraktsioonita.
34. Rakkude minimaalse arvu valimisel iga katsekultuuri (nii kontroll- kui ka töödeldud kultuuride) ja iga katsetapi jaoks tuleks lähtuda spontaanse muteerumise sagedusest. Üldsuunisena tuleks igas katsekultuuris töödelda ja ümber külvata piisav hulk rakke, et tagada igas katsetapis (töötlemine, fenotüübi ekspressioon ja mutantide selektsioon) vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 mutandi spontaanse teke (56).
35. MLA puhul on soovituslik vastuvõetav spontaanse muteerumise sagedus vahemikus  $35\text{--}140 \times 10^{-6}$  (agarivariant) ja  $50\text{--}170 \times 10^{-6}$  (mikroitiiterplaadi variant) (vt tabel 2). Selleks, et saada igas katsekultuuris vähemalt 10, kuid ideaaljuhul 100 töötleses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt  $6 \times 10^6$  raku. Sellise arvu rakkude töötlemine ja rakkude piisava arvu tagamine ekspresseerumise ning mutantide selekteerimiseks vajaliku kloonimise etappides tagab katse igas etapis piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (mõõdetuna 10 % suhtelise kogukasvuna) (19, 38, 39).
36. TK6 korral jääb spontaanse muteerumise sagedus üldjuhul vahemikku  $2\text{--}20 \times 10^{-6}$ . Selleks, et saada igas kultuuris vähemalt 10 töötleses ellujäänud, spontaanselt tekkinud mutanti, on vaja töödelda vähemalt  $20 \times 10^6$  raku. Sellise arvu rakkude töötlemine tagab piisava arvu (10 või rohkem) spontaanselt tekkinud mutante ka juhul, kui kultuure töödeldakse kontsentratsioonidel, mis on 90 % ulatuses tsütotoksilised (suhteline ellujäämus 10 %). Peale selle tuleb ekspressiooniperioodi vältel kultiveerida ja mutantide selekteerimiseks välja külvata piisaval arvul rakke (60).

**Fenotüübi avaldumise aeg ning tsütotoksilisuse ja muteerumissageduse mõõtmine**

37. Töötlemisperioodi lõppedes kasvatatakse rakke teatava ajavahemiku jooksul, et võimaldada äsja tekkinud mutantide fenotüübi optimaalset või sellelähedast avaldumist; ajavahemik oleneb kasutatavast rakuliinist. MLA korral on fenotüübi avaldumise periood 2 päeva. TK6 korral on fenotüübi avaldumise periood 3–4 päeva. Kui kasutatakse 24-tunnist töötlemist, algab avaldumisperiood pärast töötlemise lõppu.
38. Fenotüübi avaldumise perioodi jooksul loendatakse rakke iga päev. MLA korral kasutatakse päevaseid rakkude arve päevase suspensioonikasvu arvu-  
tamiseks. Pärast 2-päevast avaldumisperioodi suspendeeritakse rakud nii selektiivainet sisaldavas kui ka ilma selektiivaineta söötmes, et teha kindlaks mutantide arv (selekteerimisplaadid) ja kloonimistõhusus (eluvõimelisuse plaadid). MLA korral on kaks võrdselt tunnustatud meetodit mutantide selektiivseks kloonimiseks: üks pehmes agaris ja teine vedelsöötmes 96 süvendiga plaatidel (19, 38, 39). TK6 korral kloonitakse vedelsöötmetes 96 süvendiga plaatidel (16).

**▼M8**

39. *TK* mutantide puhul on ainus soovitatav selektiivaine trifluorotümidin (TFT) (61).
40. *MLA* korral loendatakse agariplaate ja mikrotiiterplaate pärast 10–12-päevast inkubeerimist. *TK6* korral loendatakse mikrotiiterplaatidel vara tekkivaid mutante 10–14 päeva möödudes. Aeglase kasvuga (hilja tekkivate) *TK6* mutantide avastamiseks on vaja rakkudele pärast vara tekkivate mutantide loendamist lisada söödet ja TFT-d ning inkubeerida plaate veel 7–10 päeva (62). Punktides 42 ja 44 on arutletud aeglase ja normaalse kasvuga *TK* mutantide loendamise üle.
41. *MLA* puhul sobivad, mõlemat meetodit (agar ja mikrotiiterplaat) hõlmavad arvutused on esitatud 2. liites. Muteerumissageduse arvutamiseks *MLA* agarimeetodi korral loendatakse kolooniad ja kohandatakse mutantide kolooniate arvu kloonimistõhususe järgi. *MLA* ja *TK6* mikrotiiterplaadimeetodi korral tehakse kloonimistõhusus nii selekteerimis- kui ka kloonimistõhususe plaatidel kindlaks vastavalt Poissoni jaotusele (63). Muteerumissagedus arvutatakse nende kahe kloonimistõhususe alusel.

**Mutantide kolooniate iseloomustamine**

42. Kui *MLA* meetodil uuritav kemikaal on positiivne (vt punktid 62–63), tuleks kolooniaid iseloomustada nende arvu või kasvukiirusega vähemalt ühes uuritavas kultuuris (tavaliselt suurim vastuvõetav positiivne kontsentratsioon) ning negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. Kui uuritav kemikaal on negatiivne (vt punkt 64), tuleks mutantide kolooniaid iseloomustada nende arvuga negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides. *MLA* mikrotiiterplaadimeetodi korral määratletakse väikese kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad alla 25 % süvendi diameetrist, ja suure kolooniaga mutandid kui mutandid, mis katavad üle 25 % süvendi diameetrist. Agari-meetodi korral kasutatakse mutantide kolooniate loendamiseks ja suuruse määramiseks kolooniate automaatloendurit. Üksikasjalikud lähenemisviisid kolooniate suuruse määramisele on esitatud kirjandusallikates (19, 38, 40). Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist.
43. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei suure ega väikese kolooniaga mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioon ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).
44. *TK6*: Normaalse ja aeglase kasvuga mutandid eristatakse üksteisest erinevate inkubatsiooniaegade abil (vt punkt 40). *TK6* puhul loendatakse üldiselt kõigis kultuurides, kaasa arvatud negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides nii vara kui ka hilja tekkivad mutandid. Kolooniate iseloomustamine negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides on vajalik, et tõendada uuringute asjakohast läbiviimist. Uuritavat kemikaali ei saa lugeda negatiivseks, kui positiivses kontrollproovis ei tuvastata piisavalt ei vara ega hilja tekkivaid mutante. Kolooniate iseloomustust võib kasutada üldise teabe saamiseks uuritava kemikaali võime kohta põhjustada punktmutatsioon ja/või kromosoomidega toimuvaid sündmusi (punkt 4).



▼ **M8****Labori pädevus**

45. Laboris peaks enne katsemeetodi rutiinset kasutamist olema katse läbiviimiseks piisava kogemuse tõendamiseks tehtud katseseeria positiivse kontrollainena kasutatud etalonainetega, millel on eri toimemehhanismid (tabelis 1 loetletud ainete hulgast valitud ained, millest vähemalt üks vajab toimimiseks metabolismi aktiveerimist ja vähemalt üks seda ei vaja), ning mitmesuguste negatiivsete kontrollainetega (sealhulgas töötlemata kultuurid ja mitmesugused lahustid/kandeained). Selliste positiivsete ja negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused peaksid olema kooskõlas kirjanduse andmetega. Seda nõuet ei kohaldata kogemusega laborite puhul, kui on olemas varasemate tulemuste andmebaas, nagu on määratletud punktides 47–50. MLA korral peavad nii positiivsete kui ka negatiivsete kontrollainetega saadud tulemused olema kooskõlas IWGT soovitusetega (vt tabel 2).
46. Valitud positiivseid kontrollaineid (vt tabel 1) tuleks uurida nii lühiajalise kui ka pikaajalise töötusega (kui pikaajalist töötust kasutatakse) aktiveerimata metabolismi tingimustes ning lühiajalise töötusega aktiveeritud metabolismi tingimustes, et tõendada mutageensete kemikaalide tuvastamise ja metabolismi aktiveerimise süsteemi tõhususe kindlakstegemise võimekust, samuti rakkude kasvatingimuste sobivust töötlemise, fenotüübi avaldumise ja mutantide selekteerimise ajal ning kasutatavate hindamismeetodite asjakohasust. Kõnealuste valitud ainete puhul tuleb katsesüsteemi tundlikkuse ja dünaamilise kasutusulatus sobivuse tõendamiseks valida kontsentratsioonivahemikud nii, et oleks võimalik saada korratavaid, taustaset ületavaid ja kontsentratsioonist sõltuvaid tulemusi.

**Varasemad andmed kontrollproovide kohta**

47. Laboris tuleks kindlaks teha:
- positiivsete kontrollainetega saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus,
  - negatiivsete kontrollainetega (töötlemata rakud, lahusti kontrollproov) saadud varasemate tulemuste vahemik ja jaotus.
48. Kui hangitakse algandmeid varasemate negatiivsete kontrollproovide tulemuste jaotuse määramiseks, peavad paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed olema kooskõlas kontrollproovide kohta avaldatud andmetega. Kontrollproovidega saadud tulemuste jaotuse lähteandmetele üha uute katseandmete lisandumisel peaksid paralleelsete negatiivsete kontrollproovidega saadavad tulemused jääma ideaaljuhul selle jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 % (64, 65).
49. Laboris negatiivsete kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas peaks algselt hõlmama vähemalt 10 katse andmeid, kuid soovitatavalt peaks see sisaldama vähemalt 20 võrreldavates tingimustes tehtud katse andmeid. Laboris tuleks kasutada kvaliteedikontrolli meetodeid, näiteks kontrollkaarte (nt vastavuse kontrollkaardid või X-tüüpi kontrollkaardid (65)), et teha kindlaks, kui suures ulatuses positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide andmed varieeruvad, ja tõendada, et laboris kasutatav meetoodika on usaldusväärne (66). Üksikasju ja soovitusi aja jooksul andmete kogumise ja kasutamise kohta võib leida kirjandusest (64).
50. Negatiivsete kontrollproovidega saadud andmed peaksid hõlmama muteerumissagedust ühes või soovitatavalt mitmes paralleelses kultuuris, nagu on kirjeldatud punktis 27. Paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused peaksid ideaaljuhul jääma labori varasemate kontrollproovi tulemuste jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %. Kui negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemused jäävad väljapoole kõnealust usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %, võivad need olla kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste jaotuses arvessevõtmiseks vastuvõetavad juhul, kui tegemist ei ole äärmuslike väärtustega ning on tõendatud, et katsesüsteem on usaldusväärne (vt punkt 49), ja puuduvad tõendid selle kohta, et tegemist on tehnilise vea või inimliku eksimusega.

**▼M8**

51. Katsete meetodika mis tahes muudatuse puhul tuleks kaaluda, kas see mõjutab katseandmete vastavust laboris kontrollproovidega varem saadud olemasolevatele andmetele. Iga olulise mittevastavuse korral tuleks luua uus kontrollproovidega saadud varasemate tulemuste andmebaas.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste esitamine**

52. Nii MLA kui ka TK6 korral kuuluvad esitatavate andmete hulka nii töötlemata kui ka kontrollkultuuridega saadud andmed, mis on vajalik tsütotoksilisuse (vastavalt suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus) ja muteerumissageduse arvutamiseks allpool kirjeldatud viisil.
53. MLA korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline suspensioonikasv, suhteline kogukasv, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning mutantide kolooniate arv (agarivariandi korral) või tühjade süvendite arv (mikrotiiterplaadi variandi korral). Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga miljoni ellujäänud raku kohta. Kui vastus on positiivne, esitatakse väikese ja suure koloonia muteerumissagedused (ja/või protsentuaalne osakaal muteerumise üldsagedusest), mis on leitud uuritava kemikaali vähemalt ühe kontsentratsiooniga (tavaliselt suurim positiivne kontsentratsioon), negatiivse kontrollprooviga ja positiivse kontrollprooviga. Negatiivse vastuse korral tuleb esitada negatiivse kontrollproovi ja positiivse kontrollprooviga saadud väikese ja suure koloonia muteerumissagedused.
54. TK6 korral tuleb iga üksiku kultuuri kohta esitada suhteline ellujäämus, kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ning tühjade süvendite arv vara ja hilja tekkivate mutantide puhul. Muteerumissagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga ellujäänud rakkude arvu kohta ning see peaks hõlmama muteerumise üldsagedust ning vara ja hilja tekkivate mutantide muteerumissagedust (ja/või protsentuaalselt osakaalu muteerumise üldsagedusest).

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

55. Nii MLA kui ka TK6 korral peavad enne konkreetse uuritava kemikaali üldiste tulemuste määramist olema täidetud järgmised kriteeriumid:
- katse on tehtud kahes eri tingimuses (lühiajaline töötlus metabolismi aktiveerimisega ja ilma selleta, vt punkt 33), välja arvatud juhul, kui neist ühe puhul on saadud positiivsed tulemused;
  - analüüsitud rakkude ja kontsentratsioonide arv on piisav (vt punktid 27 ja 34–36);
  - suurima kontsentratsiooni valimise kriteeriumid on kooskõlas kriteeriumidega, mis on kirjeldatud punktides 28–30.

*Negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide nõuetekohasuse kriteeriumid*

56. IWGT MLA ekspertide töörühma tehtud analüüs suure hulga MLA andmete kohta andis tulemuseks rahvusvahelise konsensuse MLA konkreetsete nõuetekohasuse kriteeriumide osas (1, 2, 3, 4, 5). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi negatiivsete ja positiivsete kontrollproovide vastuvõetavuse kindlakstegemiseks ning MLAgas saadud üksikainete tulemuste hindamiseks. TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörühm ei ole seda hinnanud.

▼ **M8**

57. MLA korral tuleb iga katse juures hinnata, kas töötlemata/lahusti kontrollproov vastab IWGT MLA tööühma koostatud nõuetekohasuse kriteeriumidele ((4) ja tabel 2 allpool) järgmiste näitajate poolest: 1) muteerumissagedus (tuleb arvestada, et IWGT nõuetekohased muteerumissagedused on MLA agari- ja mikrotiiterplaadi variandi puhul erinevad); 2) kloonimistõhusus mutantide selekteerimise ajal ja 3) suspensioonikasv lahusti kontrollproovis (valemid on leitavad 2. liites).

Tabel 2

**MLA nõuetekohasuse kriteeriumid**

Näitaja	Pehme agari meetod	Mikrotiiterplaadi meetod
Muteerumissagedus:	$35-140 \times 10^{-6}$	$50-170 \times 10^{-6}$
Kloonimistõhusus	65–120 %	65–120 %
Suspensioonikasv	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)	8–32-kordne (3–4-tunnine töötlus) 32–180-kordne (24-tunnine töötlus, kui seda kasutatakse)

58. Samuti tuleb MLA korral iga katse juures hinnata, kas positiivne kontrollkatse või positiivsed kontrollkatse vastavad vähemalt ühele järgmisest kahest nõuetekohasuse kriteeriumist, mille on välja töötanud IWGT tööühm:

- positiivses kontrollproovis peab ilmnenema muteerumise üldsageduse absoluutne suurenemine, st suurenemine spontaanselt muteerumisest tulenevast taustsagedusest (indutseeritud muteerumissagedus) ülespoole vähemalt  $300 \times 10^{-6}$ . Vähemalt 40 % indutseeritud muteerumissagedusest peab kajastuma väikese koloonia muteerumissageduses;
  - positiivses kontrollproovis peab väikese koloonia muteerumissagedus olema vähemalt  $150 \times 10^{-6}$  võrra suurem töötlemata/lahusti kontrollproovis esinevast (väikese koloonia indutseeritud muteerumissagedus  $150 \times 10^{-6}$ ).
59. TK6 korral on katse nõuetekohane, kui paralleelsete negatiivsete kontrollproovide tulemused on vastuvõetavad, et lisada need labori varasemate negatiivsete kontrollproovidega saadud tulemuste andmebaasi, nagu on kirjeldatud punktides 48–49. Peale selle peavad paralleelsete positiivsete kontrollproovidega (vt punkt 32) saadud tulemused olema võrreldavad positiivsete kontrollproovidega varem saadud tulemustega ning saadud väärtused peaksid paralleelset negatiivset kontrollproovi iseloomustavate väärtustega võrrelduna olema statistiliselt oluliselt suuremad.
60. Mõlema katse korral peab positiivses kontrollkultuuris leitud tsütotoksilisus olema sama mis katsekultuurides. See tähendab, et suhteline kogukasv või suhteline ellujäämus ei tohi jääda alla 10 % Positiivse kontrollproovi vastuvõetavuse kriteeriumidele vastavuse tõendamiseks piisab ühe kontsentratsiooni kasutamisest (või kui kasutatakse rohkem kontsentratsioone, siis ühe positiivse kontrollkultuuriga kasutatava kontsentratsiooni kasutamisest). Peale selle peab positiivse kontrollproovi muteerumissagedus jääma labori jaoks määratud vastuvõetavasse vahemikku.

**Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

61. MLA kohta on IWGT hiire lümfoomi ekspertide tööühm ära teinud olulise töö positiivse vastuse bioloogilise olulisuse ja kriteeriumidega seoses (4). Seega annab käesolev katsemeetod konkreetseid soovitusi uuritava kemikaali

▼ **M8**

MLA-katsega saadud tulemuste tõlgendamiseks (vt punktid 62–64). TK6 andmebaas on palju väiksem ja töörihm ei ole seda hinnanud. Seepärast on TK6 puhul esitatud soovitud andmete tõlgendamiseks üldisemad (vt punktid 65–66). Täiendavad soovitud kehtivad mõlema katsemetodi kohta (vt punktid 67–71).

*MLA*

62. Positiivsete ja negatiivsete vastuste määramiseks on soovitatav kasutada lähenemisviisi, mis tagab, et suurenenud muteerumissagedus on bioloogiliselt oluline. Muude katsete puhul tavaliselt kasutatava statistilise analüüsi asemel põhineb see lähenemisviis eelnevalt määratletud indutseeritud muteerumise sagedusel (st muteerumissageduse suurenemisel ülespoole paralleelse kontrollprooviga saadud väärtusest), mis on nimetatud globaalseks hindamisteguriks (GEF) ja mille aluseks on osalevate laborite negatiivse kontrollproovi muteerumissageduse andmete jaotuse analüüs (4). MLA agari-versiooni korral on  $GEF 90 \times 10^{-6}$  ja MLA mikrotiiterplaadi variandi korral  $126 \times 10^{-6}$ .
63. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui ükskõik millistel uuritud katsetingimustel (vt punkt 33) ületab muteerumissageduse kasv paralleelprooviga mõõdetud taustasageduse rohkem kui GEF võrra ning suurenemine on sõltuv kontsentratsioonist (nt kasutades trenditesti meetodit). Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni.
64. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõigis uuritud katsetingimustes (vt punkt 33) puudub kontsentratsioonist sõltuv vastus või kui muteerumissagedus on suurenenud, siis see ei ületa GEFi. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katsesüsteemis mutatsioone.

*TK6*

65. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt positiivseks, kui mis tahes uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):
- vähemalt ühe katsekontsentratsiooni juures täheldatakse saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;
  - sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et see suurenemine on kontsentratsioonist sõltuv (vt punkt 33);
  - ükski nendest tulemustest ei ole väljaspool labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotust (nt väljaspool Poissoni jaotuse usaldusvahemikku usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).

Kui kõik need kriteeriumid on täidetud, käsitatakse uuritavat kemikaali võimelisena põhjustama selles katsesüsteemis mutatsiooni. Soovitused kõige asjakohasemate statistiliste meetodite kohta on esitatud kirjanduses (66, 67).

66. Tingimusel, et kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal selgelt negatiivseks, kui kõikides uuritud katsetingimustes (vt punkt 33):
- ei täheldata ühegi katsekontsentratsiooni juures saadud väärtuse statistiliselt olulist suurenemist paralleelse negatiivse kontrollprooviga võrreldes;
  - sobiva trenditestiga hindamisest nähtub, et kontsentratsioonist sõltuvat väärtuse suurenemist ei esine;

▼ **M8**

- kõik need tulemused on labori varasemate negatiivse kontrollprooviga saadud tulemuste jaotuse vahemikus (nt Poissoni jaotuse usaldusvahemikus usaldusnivool 95 %; vt punkt 48).
67. Sel juhul käsitatakse uuritavat kemikaali võimetuna põhjustama selles katse-süsteemis mutatsioone.
- MLA ja TK6*
68. Kui suurima kontsentratsiooni valimisel lähtutakse tsütotoksilisusest, tuleks suurim kontsentratsioon valida nii, et saavutataks suhteline kogukasv / suhteline ellujäämus 10–20 %. Ühine seisukoht on, et tuleb olla hoolikas niisuguste positiivsete tulemuste tõlgendamisel, mis on leitud suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, ning et tulemust ei loeta positiivseks, kui muteerumissageduse suurenemine ilmnes üksnes 10 % või väiksema suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse juures (kui seda hinnati) (2, 59).
69. Leidub asjaolusid, mille puhul täiendav teave võib olla abiks otsustamisel, et uuritav kemikaal ei ole mutageenne, kui ühegi kultuuriga ei saada suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse väärtust vahemikus 10–20 %. Niisugused olukorrad on järgmised: 1) tõendid mutageensuse kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–100 %, ning vähemalt üks andmepunkt on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 20–25 %; 2) tõendid mutageensuse kohta puuduvad (st puudub doosi-vastuse seos, puuduvad paralleelse negatiivse kontrollprooviga saadud muteerumissagedusest või aja jooksul kogutud andmetest saadud taustväärtusest suuremad muteerumissagedused) andmepunktide seerias, mis on suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 25–100 %, ning olemas on ka negatiivne andmepunkt, mis jääb veidi alla 10 % suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse. Mõlemal juhul võib uuritava kemikaali lugeda negatiivseks.
70. Selgelt positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja üle kontrollida.
71. Juhul, kui vastus ei ole eespool kirjeldatu kohaselt selgelt negatiivne ega selgelt positiivne ja/või kui eesmärk on aidata kindlaks teha tulemuse bioloogiline olulisus, tuleks andmete hindamiseks kasutada eksperdi hinnangut ja/või täiendavaid uuringuid. Sellises olukorras võib olla kasulik teha korduskatse ja muuta vajaduse korral katsetingimusi (nt kontsentratsiooniintervalli, et suurendada andmepunktide saamise tõenäosust suhtelise kogukasvu / suhtelise ellujäämuse vahemikus 10–20 %, või metabolismi aktiveerimise tingimusi (st S9 kontsentratsiooni või S9 päritolu) ja töötlemise kestust).
72. Harvadel juhtudel ei võimalda andmed isegi pärast täiendavaid uuringuid teha järeldust selle kohta, kas tulemus on positiivne või negatiivne. Seepärast tuleks sel juhul lugeda uuritava kemikaaliga saadud vastus ebaselgeks (seda tõlgendatakse positiivse ja negatiivse tulemuse võrdvõimalikkusena).

**KATSEPROTOKOLL**

73. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on olemas;
- uuritava kemikaali püsivus, kui see on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui see on teada;

**▼M8**

- vastavalt vajadusele mõõtmistulemused söötme pH ja osmolaalsuse ning sademe tekke kohta pärast uuritava kemikaali lisamist.

Ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne.

Mitme koostisosaga aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal ja segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

*Lahusti:*

- lahusti valimise põhjendus;
- lahusti protsentuaalne sisaldus lõppsöötmes.

*Rakud:*

labori tüvikultuuride puhul:

- rakkude tüüp ja päritolu ning nendega katselaboris tehtud toimingud;
- karüotüübi andmed ja/või kromosoomide modaalarv;
- rakukultuuride säilitamise meetodid;
- teave mükoplasma puudumise kohta;
- rakkude arvu kahekordistumise aeg.

*Katsetingimused:*

- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valiku põhjendus, sealhulgas näiteks andmed tsütotoksilisuse ja lahustuvuspiirangute kohta;
- söötme koostis, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, niiskusesisaldus;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon, väljendatuna lõppkontsentratsioonina söötmes (nt µg/ml või mg/ml või mM);
- söötmel lisatud lahusti ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (ja/või ruumala);
- inkubeerimistemperatuur;
- inkubeerimisaeg;
- töötuse kestus;
- rakutihedus töötuse ajal;

**▼M8**

- metabolismi aktiveerimise süsteemi liik ja koostis (fraktsiooni S9 allikas, S9 segu valmistamise meetod, S9 segu ja S9 kontsentratsioon või ruumala lõppsöötmes, S9 kvaliteedikontrolli andmed);
- positiivsed ja negatiivsed kontrollained ja nende lõppkontsentratsioonid iga töötlemistingimuse puhul;
- ekspressiooniperioodi pikkus (samuti väljakülvatud rakkude arv ning vajaduse korral teave ümberkülvide ja söötmevahetusrežiimi kohta);
- selektiivaine identimisandmed ja kontsentratsioon;
- MLA korral tuleb näidata kasutatud variant (agar või mikroitiiterplaat);
- katse nõuetekohasuse kriteeriumid;
- eluvõimeliste ja muteerunud rakkude loendamiseks kasutatud meetodid;
- tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutatud meetodid;
- muu täiendav asjakohane teave tsütotoksilisuse ja kasutatud meetodi kohta;
- väljakülvamisele järgneva inkubeerimise kestus;
- kolooniate määratlus, milles on arvesse võetud kolooniate arvu ja tüüpi (sh „väikeste“ ja „suurte“ kolooniate kriteeriumid, vajaduse korral);
- uuringutulemuse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks liigitamise kriteeriumid;
- pH, osmolaalsuse (kui määratakse) ja sademe määramiseks kasutatud meetodid, kui on asjakohane.

*Tulemused:*

- töödeldud rakkude arv ja ümberkülvatud rakkude arv igas kultuuris;
- toksilisuse näitajad (MLA korral suhteline kogukasv ja TK6 korral suhteline ellujäämus);
- sadenemise ilmingud ja nende täheldamise aeg;
- selektiivainega ja selektiivaineta söötmesse külvatud rakkude arv;
- kolooniate arv selektiivaineta söötmes ja resistentsete kolooniate arv selektiivainega söötmes ning vastav muteerumissagedus;
- kolooniate suurus negatiivsetes ja positiivsetes kontrollproovides ning kui uuritav kemikaal on positiivne, siis vähemalt ühe kontsentratsiooni juures, samuti vastavad muteerumissagedused;
- võimaluse korral andmed vastuse sõltuvuse kohta kontsentratsioonist;
- andmed paralleelsete negatiivsete (lahusti) kontrollproovide ja positiivsete kontrollproovide kohta (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemate negatiivsete (lahusti) ja positiivsete kontrollproovide andmed (kontsentratsioonid ja lahustid), sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed; kontrollkatsete arv, mille alusel varasemad andmed on saadud;

## ▼M8

- statistilise analüüsi tulemused (iga kultuuri kohta eraldi ja vajaduse korral paralleelkultuuride koondandmed) ja vajaduse korral p-väärtused ning MLA korral GEF-hinnang.

*Tulemuste arutelu*

*Järeldused*

#### KIRJANDUS

- (1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (koostaja), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. ja Stankowski, L.F. Jr. (2000), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 35 (3), lk 185–190.
- (2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. ja Stankowski, L.F. Jr. (2002), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (Aprill 2000)“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 40 (4), lk 292–299.
- (3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. ja Yoshimura, I. (2003), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report“, *Mutation Res.*, nr 540, lk 127–140.
- (4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. ja Yoshimura, I. (2006), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 47 (1), lk 1–5.
- (5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. ja Van Goethem, F. (2007), „Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment“, *Mutation Res.*, nr 627 (1), lk 36–40.
- (6) OECD (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 238. OECD, Pariis.
- (7) Fellows M. D., Luker, T., Cooper, A. ja O'Donovan, M.R. (2012), „Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors“, *Mutation Res.*, nr 746 (1), lk 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2001), „Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction“, *Mutation Res.*, nr 493 (1–2), lk 101–114.



## ▼M8

- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. ja Moore, M. M. (2009), „The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy“, *Toxicol. Sci.*, nr 109 (1), lk 96–105.
- (10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. ja Hozier, J. C. (1990), „Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells“, *Proc. National Academy. Sci. USA*, nr 87 (1), lk 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. ja Clive, D. (1981), „Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK<sup>+/−</sup> Leads to TK<sup>−/−</sup> Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System“, *Mutation Res.*, nr 84 (1), lk 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. ja Moore, M. M. (1985), „Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK<sup>−/−</sup> Mutants Early in their Clonal History“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 237–242.
- (13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. ja Sawyer, J. (1985), „Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTTr) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/−</sup> Mouse Lymphoma Cells“, *Mutation Res.*, nr 151 (1), lk 161–174.
- (14) Liber, H. L., Call, K. M. ja Little, J. B. (1987), „Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation Res.*, nr 178 (1), lk 143–153.
- (15) Li, C. Y., Yandell, D. W. ja Little, J. B. (1992), „Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*“, *Somat. Cell Mol. Genet.*, nr 18 (1), lk 77–87.
- (16) Honma, M., Hayashi, M. ja Sofuni, T. (1997), „Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells“, *Mutation Res.*, nr 374 (1), lk 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. ja Hayashi, M. (2000), „Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity“, *Mol. Carcinogen.*, nr 28 (4), lk 203–14.
- (18) Amundson, S. A. ja Liber, H. L. (1992), „A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants“, *Mutation Res.*, nr 267 (1), lk 89–95.
- (19) Schisler, M. R., Moore, M. M. ja Gollapudi, B. B. (2013), „*In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK<sup>+/−</sup>-3.7.2C) Forward Mutation Assay“, *Protocols in Genotoxicity Assessment*, toim. A. Dhawan ja M. Bajpayee, Springer Protocols, Humana Press, lk 27–50.
- (20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J. ja Halliwell, B. (2007), „Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium“, *Mutation Res.*, nr 634 (1–2), lk 177–183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. ja Marzin, D. (2008), „Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 49 (6), lk 439–452.
- (22) Brusick, D. (1986), „Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations“, *Environ. Mutagen.*, nr 8 (6), lk 879–886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. ja Okumura, K. (1992), „Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells“, *Mutation Res.*, nr 268 (2), lk 297–305.

## ▼M8

- (24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr, Brusick, D., Ashby, J. ja Myhr, B. C. (1991), „Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9“, *Mutation Res.*, nr 257, lk 147–204.
- (25) Wang, J., Heflich, R. H. ja Moore, M. M. (2007), „A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay“, *Mutation Res.*, nr 626 (1–2), lk 185–190.
- (26) Fischer, G. A. (1958), „Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*“, *Ann. N.Y. Academy Sci.*, nr 76, lk 673–680.
- (27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. ja Brown, M. M. M. (1979), „Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Mutagen Assay System“, *Mutation Res.*, nr 59(1), lk 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D. ja Hozier, J. (1985), „Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 147 (5), lk 243–253.
- (29) Sawyer J. R., Moore M. M. ja Hozier J. C. (1989), „High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cell Line“, *Mutation Res.*, nr 214 (2), lk 181–193.
- (30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J. ja Moore, M. M. (2006), „Multi-color Spectral Karyotyping of the L5178Y TK<sup>+/-</sup>-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 47 (2), lk 127–131.
- (31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A. ja Aardema, M. J. (2014), „The Spectral Karyotype of L5178Y TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 55 (1), lk 35–42.
- (32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T.L. ja DeLuca, J.G. (1997), „The Mouse Lymphoma L5178Y TK<sup>+/-</sup> Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene“, *Mutation. Res.*, nr 373 (2), lk 157–165.
- (33) Clark L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H. ja Moore, M. M. (2004), „Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells“, *Mutagen.*, nr 19 (4), lk 263–268.
- (34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W. ja Thilly, W. G. (1978), „Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, nr 84 (2), lk 411–416.
- (35) Honma, M. (2005), „Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 45 (2–3): lk 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T. ja Liber, H. L. (1995), „Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines“, *Cancer. Res.*, nr 55 (1), lk 12–15.

## ▼M8

- (37) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., Kirkland, D. J. (2015), „Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing.“ (Pooleliolev käsikiri.)
- (38) Lloyd, M. ja Kidd, D. (2012), „The Mouse Lymphoma Assay“, *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods*, toim. Parry ja Parry, Humana Press, ISBN 978-1-61779-420-9, lk 35–54.
- (39) Mei, N., Guo, X. ja Moore M. M. (2014), „Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity“ väljaandes *Optimization in Drug Discover: In Vitro Methods*, toim. Yan, Z. ja Caldwell, 2. trükk, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber, H. L. ja Thilly, W. G. (1982), „Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts“, *Mutation Res.*, nr 94 (2), lk 467–485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. ja Stokes, W. (2005), „Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice“, *ATLA*, nr 33 (3), lk 261–287.
- (42) Moore, M. M. ja Howard, B. E. (1982), „Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK<sup>±</sup> Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium“, *Mutation Res.*, nr 104 (4–5), lk 287–294.
- (43) Ames, B. N., McCann, J. ja Yamasaki, E. (1975), „Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 31 (6), lk 347–364.
- (44) Maron, D. M. ja Ames, B. N. (1983), „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“, *Mutation Res.*, nr 113 (3–4), lk 173–215.
- (45) Natarajan, A. T., Tates, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M. ja de Vogel, N. (1976), „Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes“, *Mutation Res.*, nr 37 (1), lk 83–90.
- (46) Matsuoka, A., Hayashi, M. ja Ishidate, M. Jr. (1979), „Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*“, *Mutation Res.*, nr 66 (3), lk 277–290.
- (47) Ong, T. M. *et al.* (1980), „Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver“, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, nr 4 (1), lk 55–65.
- (48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. ja Wolf, R. C. (1992), „Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays“, *Mutagen.*, nr 7 (3), lk 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. ja Sugimura, T. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“ väljaandes *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, toim. de Serres F. J. *et al.*, Elsevier, North-Holland, lk 85–88.

## ▼M8

- (50) Galloway, S. M. *et al.* (1994), „Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations“, *Mutation Res.*, nr 312 (3), lk 241–261.
- (51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. ja Galloway, S. M. (1996), „Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 28 (1), lk 51–59.
- (52) UNEP (2001), Püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon. Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni Keskkonnaprogramm (UNEP).
- (53) Krahn, D. F., Barsky, F. C. ja McCooey, K. T. (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“ väljaandes *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, toim. Tice, R. R., Costa, D. L. ja Schaich, K. M., New York, Plenum, lk 91–103.
- (54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983), „Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay“, *Environ. Mutagen.*, nr 5 (6), lk 795–801.
- (55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. ja Matsushima, T. (2008), „An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay“, *Mutation Res.*, nr 652 (2), lk 122–130.
- (56) Arlett, C. F. *et al.* (1989), „Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation“ väljaandes *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, toim. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, lk 66–101.
- (57) Morita, T., Honma, M. ja Morikawa, K. (2012), „Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity“, *Mutation Res.*, nr 741 (1–2), lk 32–56.
- (58) Brookmire, L., Chen, J. J. ja Levy, D. D. (2013), „Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 54 (1), lk 36–43.
- (59) USA Toidu- ja Ravimiamet (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Kättesaadav aadressil [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma, M. ja Hayashi, M. (2011), „Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells“, *Environ. Mol. Mutagen.*, nr 52 (5), lk 373–384.
- (61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G. ja Johnson, K. O. (1981), „The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK<sup>-/-</sup>) Mutants from L5178Y/TK<sup>+/-</sup> Mouse Lymphoma Cells“, *Mutation Res.*, nr 85 (5), lk 363–378.
- (62) Liber, H. L., Yandell, D. W. ja Little, J. B. (1989), „A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus“, *Mutation Res.*, nr 216 (1), lk 9–17.
- (63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L. ja Rand, W. M. (1981), „Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates“, *Anal. Biochem.*, nr 110 (1), lk 1–8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. ja Thybaud, V. (2011), „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data“, *Mutation Res.*, nr 723 (2), lk 87–90.

**▼M8**

- (65) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2. trükk. John Wiley & Sons, New York.
- (66) OECD (2014), *Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines*. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr 199), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (67) Fleiss, J. L., Levin, B. ja Paik, M. C. (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3. trükk. John Wiley & Sons, New York.

▼ **M8***1. liide***MÕISTED**

**Aneugeen:** iga kemikaal või protsess, mis põhjustab interaktsiooni kaudu mitootilise või meiotilise raku jagunemise tsükli komponentidega rakkude või organismide aneuploidsust.

**Aneuploidsus:** iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidsus).

**Aluspaarivahetust põhjustav mutageen:** kemikaal, mis kutsub esile aluspaari vahetuse DNAs.

**Kemikaal:** aine või segu.

**Kloonimistõhusus:** väikesel tihedusel välja külvatud rakkude hulgas esinevate selliste rakkude protsentuaalne osakaal, mis on võimelised moodustama loendatava koloonia.

**Klastogeen:** iga kemikaal, mis põhjustab rakkude või organismide populatsioonis struktuurseid kromosoomiberratsioone.

**Tsütotoksilisus:** käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul on tsütotoksilisus määratletud kui suhtelise kogukasvu (MLA korral) või suhtelise ellujäämuse (TK6 korral) vähenemine.

**Otsemutatsioon:** geenimutatsioon, mille puhul algne geen võtab mutantse vormi ja mille tulemusena muutub või kaob asjaomase kodeeritud valgu ensümaatilise aktiivsus või funktsioon.

**Raaminihet põhjustav mutageen:** kemikaal, mille mõjul lisatakse DNA molekuli või eemaldatakse sealt üks või mitu aluspaari.

**Genotoksilisus:** üldmõiste, mis hõlmab DNA ja kromosoomide igat liiki kahjustusi, sealhulgas DNA-ahela katkemisi, adukte, ümberkorraldusi, mutatsioone, kromosoomiberratsioone ja aneuploidsust põhjustavaid omadusi. Genotoksiline mõju ei väljendu alati mutatsiooni või püsiva kromosoomikahjustusena.

**Mitootiline rekombinatsioon:** mitoosi ajal homologsete kromatiidide vahel toimuv rekombinatsioon, millega võib kaasneda DNA kahe ahela katkemine või heterosügootsuse kadu.

**Mutageensus:** omadus, mis põhjustab pärilikke muutusi geenide DNA aluspaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomiberratsioonid).

**Muteerumissagedus (MF):** vaadeldud mutantrakkude arv, mis on jagatud elujõuliste rakkude arvuga.

**Fenotüübi ekspressiooniaeg:** töötlusele järgnev aeg, mille vältel geneetiline muutus kinnistub genoomis ja mis tahes varem esinenud geeniproduktide sisaldus väheneb nii palju, et asjaomane fenotüübiline tunnus muutub.

**Suhteline ellujäämus (RS):** näitaja, mille kaudu TK6 korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. See on vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhusus (CE), mida on kohandatud rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise ajal, võrrelduna negatiivse kontrollprooviga leitud kloonimistõhususega.

**▼ M8**

**Suhteline suspensioonikasv (RSG):** MLA korral katsekultuuri kogu suhteline suspensioonikasv kahe päeva jooksul, võrrelduna negatiivse/lahusti kontrollprooviga leitud kogu suspensioonikasvuga kahe päeva jooksul (Clive ja Spector, 1975). RSG peaks hõlmama katsekultuuri suhtelist kasvu võrrelduna negatiivse/-lahusti kontrollprooviga töötlemisperioodi jooksul.

**Suhteline kogukasv (RTG):** näitaja, mille kaudu MLA korral väljendatakse töötlusest tulenevat tsütotoksilisust. Sellega väljendatakse katsekultuuride suhtelist (kandeaine kontrollprooviga võrreldud) kasvu katse töötlemis-, kahepäevases avaldumis- ja mutantide selektiivse kloonimise faasis. Iga katsekultuuri RSG korrutatakse katsekultuuri suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal ning väljendatakse negatiivse/kandeaine kontrollprooviga leitud kloonimistõhususe suhtes (Clive ja Spector, 1975).

**Maksafraktsioon S9:** maksa homogenaadi supernatant, mis on eraldatud pärast tsentrifugimist 9 000g juures, st maksa toorekstrakt.

**S9 segu:** maksafraktsiooni S9 ja metaboolsete ensüümide aktiivsuse tagamiseks vajalike kofaktorite segu.

**Suspensioonikasv (SG):** rakkude arvu kordne suurenemine MLA töötlemis- ja avaldumisfaasi jooksul. SG arvutamiseks korrutatakse lühiajalise töötlemise (3 või 4 tundi) korral kordne kasv 1. päeval kordse kasvuga 2. päeval. Kui kasutati 24-tunnist töötlemist, on SG 24 tunnise töötlemisaja kordse kasvu korrutis 1. ja 2. avaldumispäeva kordsete kasvudega.

**Lahusti kontrollproov:** üldmõiste, millega tähistatakse kontrollkultuuri, kuhu on lisatud üksnes uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatud lahustit.

**Uuritav kemikaal:** iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Töötlemata kontrollproov:** töötlemata kontrollproovid on rakukultuurid, mida ei ole töödeldud (st ei uuritava kemikaali ega lahustiga), kuid mida on käideldud samaaegselt samal viisil kui uuritava kemikaaliga töödeldud rakukultuure.

▼ **M8**

## 2. liide

## VALEMID

**Tsütotoksilisus**

*Nii MLA agari- kui ka mikrotiiterplaadi variandi korral*

Tsütotoksilisus on määratletud suhtelise kogukasvuna (RTG), mis hõlmab suhtelise kogukasvu (RSG) 2-päevase avaldumisperioodi jooksul ja mutantide selekteerimise ajal leitud suhtelise kloonimistõhususe (RCE). Nii RTG, RSG kui ka RCE väljendatakse protsentides.

**RSG arvutamine:** suspensioonikasv  $SG_1$  on 0-päeva ja 1. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsiooni 1. päeval / rakkude kontsentratsioon 0-päeval) ja suspensioonikasv  $SG_2$  on 1. päeva ja 2. päeva vaheline kasvumäär (rakkude kontsentratsioon 2. päeval / rakkude kontsentratsioon 1. päeval). RSG on töödeldud kultuuri kogu SG ( $SG_1 \times SG_2$ ) võrrelduna töötlemata/lahusti kontrollproovi omaga. Seega:  $RSG = [SG_{1(uuritav)} \times SG_{2(uuritav)}] / [SG_{1(kontrollproov)} \times SG_{2(kontrollproov)}]$ .  $SG_1$  arvutamisel tuleb lähtuda rakkude algsest kontsentratsioonist, mida kasutati rakkude töötlemise alguses. Seega võetakse arvesse rakkude töötlemise ajal katsekultuuris ilmnevaid erinevaid tsütotoksilisi toimeid.

RCE on katsekultuuri suhteline kloonimistõhusus võrreldes töötlemata/lahusti kontrollproovi suhtelise kloonimistõhususega mutantide selekteerimise ajal.

**Suhteline kogukasv (RTG):**  $RTG = RSG \times RCE$

## TK6

**Suhteline Ellujäämus (RS):**

tsütotoksilisust hinnatakse suhtelise ellujäämusega, st vahetult pärast töötlemist välja külvatud rakkude kloonimise tõhususega, kohandatuna rakkude arvu võimaliku vähenemise suhtes töötlemise käigus ja võrrelduna kloonimistõhususega negatiivsete kontrollproovide puhul, mille ellujäämuseks loetakse 100 %. Kohandusarvutus, mis võtab arvesse rakkude arvu vähenemist töötlemise ajal, on järgmine:

$$\text{Kohandatud CE} = CE \times \frac{\text{Rakkude arv töötlemise lõpus}}{\text{Rakkude arv töötlemise alguses}}$$

Uuritava kemikaaliga töödeldud kultuuri RS arvutatakse järgmiselt:

$$RS = \frac{\text{Kohandatud CE töödeldud kultuuris}}{\text{Kohandatud CE lahusti kontrollproovis}} \times 100$$

**Muteerumissagedus MLA ja TK6 Korral**

Muteerumissagedus (MF) on mutantsete kolooniade kloonimistõhusus selektiiv-söötmes ( $CE_M$ ), mis on kohandatud selekteerimisaegse kloonimistõhususega selektiivaineta söötmes ( $CE_V$ ). Seega  $MF = CE_M / CE_V$ . Nende kahe kloonimistõhususe arvutuskäigud on esitatud allpool kloonimise agari- ja mikrotiiterplaadi-meetodi jaoks.



▼ **M8**

**MLA agarivariant:** MLA pehme agari variandi korral saadakse kolooniate arv mutantide selekteerimisplaadil ( $C_M$ ) ja kolooniate arv selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) leidmise plaadil ( $C_V$ ) vahetult kolooniaid loendades. Kui 600 rakku külvatakse kloonimistõhususe (CE) määramiseks mutantide selekteerimisplaatidele ( $CE_M$ ) ja selektiivaineta või kloonimistõhususe (eluvõimeliste rakkude arv) määramise plaatidele ( $CE_V$ ) ja mutantide selekteerimiseks kasutatakse  $3 \times 10^6$  rakku, siis

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

**MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variant:** MLA ja TK6 mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse  $C_M$  ja  $C_V$  korrutisena mikrotiiterplaadi süvendite koguarvust ( $TW$ ) ja tõenäolisest kolooniate arvust süvendi kohta ( $P$ ).

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Lähtudes Poissoni jaotuse kujust, kui argument on null (Furth *et al.*, 1981), saab  $P$  avaldada järgmiselt:

$$P = -\ln(EW / TW),$$

kus  $E_W$  on tühjade süvendite arv ja  $T_W$  on süvendite koguarv. Niisiis:

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

MLA mikrotiiterplaadi variandi korral arvutatakse väikeste ja suurte kolooniate muteerumissagedused samal viisil, kasutades vastavalt väikeste ja suurte kolooniatega seotud tühjade süvendite arvu.

TK6 korral on väikeste ja suurte kolooniate muteerumissageduste aluseks vara tekkivad ja hilja tekkivad mutandid.

▼ **M8**

**B.68. LÜHIAJALISE KOKKUPUUTE IN VITRO KATSEMEETOD  
SELLISTE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, I) MIS  
TEKITAVAD RASKEID SILMAKAHJUSTUSI, JA II) MIDA EI OLE  
VAJA KLASSIFITSEERIDA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI  
RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

▼ **M8**

**B.69. REKONSTRUEERITUD INIMESE SARVKESTA SARNASE EPITEELI (RhCE) KATSEMEETOD NENDE KEMIKAALIDE KINDLAKSTEGEMISEKS, MIDA EI OLE VAJA KLASSIFITSEERIDA EGA MÄRGISTADA SEoses SILMADE ÄRRITUSE VÕI RASKE SILMAKAHJUSTUSEGA**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

## ▼ M8

**B.70. REKOMBINANTSEL INIMESE ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (hrER) PÕHINEVAD IN VITRO ANALÜÜSIMEETODID ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUVATE KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS**

ÜLDINE SISSEJUHATUS

**Tulemusnäitajatel põhinev Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsiooni (OECD) katsejuhend**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 493 (2015). Katsejuhend nr 493 on tulemusnäitajatel põhinev katsejuhend, milles kirjeldatakse *in vitro* analüüsimeetodeid inimese rekombinantse östrogeenireseptoriga (ER) seonduvate ainete tuvastamiseks (hrERiga seondumise katsed). See hõlmab kahte vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnast analüüsimeetodit östrogeenireseptoriga (st  $\alpha$ -ERiga) seonduvate kemikaalide tuvastamiseks ja peaks hõlbustama uute sarnaste või modifitseeritud analüüsimeetodite väljatöötamist vastavalt valideerimispõhimõtetele, mis on esitatud ohuhindamiseks kasutatavate uute või ajakohastatud katsemeetodite valideerimist ja rahvusvahelist tunnustamist käsitlevas OECD juhenddokumendis (1). Kõnealuse tulemusnäitajatel põhineva katsejuhendi aluseks on järgmised täielikult valideeritud võrdlusmeetodid (2. ja 3. liide):

— täispikal rekombinantsel inimese  $\alpha$ -ERil põhinev Freybergeri-Wilsoni (FW) *in vitro* meetod östrogeenireseptoriga seondumise analüüsimiseks (2) ja

— ligandiga seonduval rekombinantsel inimese valgudomeenil põhinev Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudi (CERI) *in vitro* meetod östrogeenireseptoriga seondumise analüüsimiseks (2).

On kehtestatud tulemuslikkuse standardid (3), mis hõlbustavad sama ohunäitaja hindamiseks kasutatavate sarnaste katsemeetodite väljatöötamist ja valideerimist ning võimaldavad tulemusnäitajatel põhinevat katsejuhendit nr 493 õigeaegselt muuta, et täiendada seda ajakohastamise eesmärgil uute sarnaste analüüsimeetoditega. Siiski lisatakse sarnased katsemeetodid juhendisse üksnes pärast seda, kui OECD on need läbi vaadanud ja kinnitanud nende vastavust tulemuslikkuse standarditele. Östrogeenireseptoriga seondumise katsete tulemusi käsitlevatele OECD liikmesriikide nõuetele vastavuse saavutamiseks võib kasutada ükskõik millist katsejuhendis nr 493 esitatud analüüsimeetodit ning seejuures saadakse kasu OECD otsuse kohasest andmete vastastikusest tunnustamisest.

**Käesoleva katsemeetodiga hõlmatud analüüsimeetodite taust ja põhimõtted**

2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et võimaldada sõeluuringute tegemist võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide tuvastamiseks ja selliste kemikaalide hindamist. OECD kontseptuaalset raamistikku võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks muudeti 2012. aastal. Nii algne kui ka muudetud kontseptuaalne raamistik on esitatud kemikaalide võimaliku endokriinfunktsiooni kahjustava toime hindamise standardiseeritud katsejuhendeid käsitleva juhenddokumendi lisadena (4). Kõnealune kontseptuaalne raamistik hõlmab viit taset; iga tase vastab bioloogilise keerukuse eri tasemele. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud ERiga seondumise katsed kuuluvad 2. tasemele, mis hõlmab „*in vitro* katseid valitud endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta andmete saamiseks“. Käesolev katsemeetod on ette nähtud retseptoriga seondumise *in vitro* katsete tegemiseks eesmärgiga tuvastada inimese östrogeenireseptori  $\alpha$ -vormi ( $\alpha$ -ER) ligandid.

## ▼M8

3. ERiga tehtavate *in vitro* seondumiskatsete asjakohasus bioloogiliste funktsioonide hindamisel on selgelt tõendatud. ERiga tehtavad seondumiskatsed on ette nähtud selliste kemikaalide tuvastamiseks, millel võib olla kahjulik mõju östrogeenirajale, ning neid on viimase kahe kümnendi jooksul laialdaselt kasutatud, et iseloomustada ERI jaotust kudedes ja identifitseerida ERI agoniste/antagoniste. Need katsed põhinevad ligandi ja retseptori vahelisel interaktsioonil, mis on esimene samm östrogeeni signaalirajas ja on hädavajalik kõigi selgroogsete paljunemisvõime tagamiseks.
  
4. Östrogeenide interaktsioon ERidega võib mõjutada östrogeeni kontrollitavate geenide transkriptsiooni ja avaldada mittegenoomset mõju, mille tulemusena võidakse käivitada või pärssida muu hulgas selliseid rakuprotsesse, mis on vajalikud rakkude paljunemiseks, loote normaalseks arenguks ja paljunemisvõime säilitamiseks (5, 6, 7). Normaalsete östrogeensete süsteemide häiretel võib olla kahjulik mõju normaalsele arengule (ontogenees), reproduktiivtervisele ja reproduktiivsüsteemi terviklikkusele. Ebasobiv ERist lähtuv signaaliülekanne võib näiteks suurendada hormoonsõltuva vähi tekke riski, vähendada viljakust ja põhjustada muutusi loote kasvus ja arengus (8).
  
5. *In vitro* seondumiskatsed põhinevad aine otsesel interaktsioonil retseptori spetsiifilise ligandiseondumiskohaga, mille kaudu reguleeritakse geenitranskriptsiooni. Inimese rekombinantse  $\alpha$ -östrogeenireseptoriga (hr- $\alpha$ -ER) seondumise katses mõõdetakse põhinäitajana radiomärgistatud ligandi ( $[^3\text{H}]17\beta$ -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERI suhtes suur afiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille afiinsus retseptori suhtes on väiksem. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid ja dokumenteeritakse spetsiifilisus ERI suhtes, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.
  
6. CERi ja FW seondumiskatsete asjakohasus ja usaldusväärsus sihtotstarbelisel kasutamisel on valideerimisuuringutega tõendatud (2).
  
7. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

**Retseptoriga seondumise katsete rakendusala ja piirangud**

8. Kõnealused katsed on ette nähtud sõeluuringu tegemiseks ja prioriseerimiseks, kuid nende käigus võib ühtlasi saada teavet molekulaarse lähtesündmuse kohta, mida saab kasutada tõendite kaalukusel põhineva lähenemisviisi puhul. Katsetes vaadeldakse kemikaali seondumist  $\alpha$ -ERI ligandi siduvale domeenile *in vitro* süsteemis. Seega tuleks hoiduda saadud tulemuste otsesest ekstrapoleerimisest tervikliku endokriinsüsteemi keerukale signaaliülekanne- ja reguleerimismehhanismile *in vivo*.

## ▼M8

9. Loodusliku ligandi 17 $\beta$ -östradiooli seondumine on esimene samm selliste molekulaarsete sündmuste jadas, mille abil aktiveeritakse sihtgeenide transkriptsioon ja mille lõpptulemuseks on füsioloogiline muutus (9). Seega on seondumine  $\alpha$ -ERi ligandi siduvale domeenile üks peamisi ERi vahendatavate endokriinsüsteemi häirete tekkemehhanisme, kuigi kõnealuseid häireid võivad põhjustada ka muud mehhanismid, sealhulgas i) interaktsioon  $\alpha$ -ERi teiste piirkondadega peale ligandisidumistasku, ii) interaktsioon östrogeeni signaalirajaga seotud muude retseptoritega,  $\alpha$ -ERiga ja G-valguga seotud östrogeenireseptoriga ning teiste endokriinsüsteemi retseptorite ja ensüümsüsteemidega, iii) hormoonide süntees, iv) hormoonide metaboolne aktiveerimine ja/või inaktiveerimine, v) hormoonide jaotumine sihtkudedes ja vi) hormoonide väljutamine kehast. Selliseid toimemehhanisme ei vaadelda üheski käesoleva katsemeetodi kohases katses.
10. Käesoleva katsemeetodi puhul uuritakse ainete võimet seonduda inimese  $\alpha$ -ERiga ja see ei võimalda eristada  $\alpha$ -ERi agoniste  $\alpha$ -ERi antagonistidest. Kõnealustes katsetes ei vaadelda ka seondumisele järgnevaid sündmusi, näiteks geenitranskriptsiooni ega füsioloogilisi muutusi. Kuna valideerimisel kasutati ühekaupa aineid, mis koosnevad ainult ühest koostisosast, ei ole uuritud selle meetodi kohaldatavust segude analüüsimiseks. Teoreetiliselt on kõnealustes katsetes siiski võimalik analüüsida ka mitut koostisosa sisaldavaid aineid ja segusid. Kui soovitakse saada kavandatud regulatiivsel eesmärgil andmeid segu kohta, tuleks enne katsemeetodi kasutamist kaaluda, kas ja kuidas see võimaldab saada kõnealusele eesmärgile vastavaid asjakohaseid tulemusi. Selline kaalumise ei ole vajalik, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.
11. Rakuvabadel retseptorisüsteemidel puudub metaboliseerimisvõime ja neid ei ole valideeritud kombinatsioonis metaboolsete ensüümsüsteemidega. Siiski võib olla võimalik lisada uuringumudelisse metaboliseerimisvõimet tagavad elemendid, kuid see nõuab täiendavat valideerimist.
12. Kemikaale, mis võivad valku (st retseptorvalku) denatureerida – näiteks pindaktiivseid aineid ja analüüsipuhvri pH-d muuta võivad kemikaale –, ei tohi analüüsida või võib analüüsida üksnes kontsentratsioonidel, mille juures selline mõju puudub. Muudel juhtudel võib uuritava kemikaali analüüsimiseks kasutada kontsentratsioonivahemikku, mille puhul kemikaal on analüüsipuhvris lahustuv.
13. Tabelis 1 on teavitamise eesmärgil esitatud katsetulemused 24 aine kohta, mida on analüüsitud mõlema käesolevas katsemeetodis kirjeldatud täielikult valideeritud analüüsimeetodiga. Avaldatud aruannete kohaselt, mis muu hulgas hõlmavad *in vitro* katseid ERi-seoselise transkriptsiooni aktiveerimise tuvastamiseks ja uterotroofse mõju analüüsi, liigitati nendest ainetest 17 ERiga seonduvateks aineteks ja kuus mitteseonduvateks aineteks (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Vastavalt tabelis 1 esitatud kokkuvõtlikele andmetele on kahe analüüsimeetodiga saadud liigitamistulemused kõigi ainete puhul kuni kontsentratsioonini 10<sup>-4</sup> M peaaegu täielikult kattuvad ja iga aine on õigesti liigitatud ERiga seonduvaks või ERiga mitteseonduvaks. Lisateave selle ainete rühma ja valideerimisuringute raames tehtud ERiga seondumise katsetes analüüsitud täiendavate ainete kohta on esitatud hrERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardite (3) 2. lisas (tabelid 1, 2 ja 3).

Tabel 1

Ainete liigitamine ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks nende analüüsimisel FW ja CERI meetodite kohastes hrERiga seonduvuse katsetes ning võrdlus eeldatava tulemusega

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaalikklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
1	17β-östradiol	50-28-2	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretüodreel	68-23-5	<i>Seonduv</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Noretindroon	68-22-4	<i>Seonduv</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
4	Di- <i>n</i> -butüülfalaat	84-74-2	<i>Mitteseonduv (*)</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv (**)( <sup>+</sup> )	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv (**)( <sup>+</sup> )	Süsivesinik (tsükiline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
5	DES	56-53-1	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükiline), fenool	Ravim, veterinaarravim
6	17α-etiüüloöstradiol	57-63-6	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid	Ravim, veterinaarravim
7	Mesoheksöstrool	84-16-2	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükiline), fenool	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükiline), flavonoid	Looduslik ühend

## ▼ M8

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaalikklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
9	Ekvool	531-95-3	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeeni metaboliit	Looduslik ühend
10	Butüülparabeen ( <i>n</i> -butüül-4-hüdroksübensoaat)	94-26-8	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Parabeen	Säilitusaine
11	Nonüülfenool (segu)	84852-15-3	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Kloororgaaniline ühend	Insektitsiid
13	Kortikosteroon	50-22-6	<i>Mitteseonduv</i> (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
14	Zearalenoon	17924-92-4	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (heterotsükiline), laktoon	Looduslik ühend
15	Tamoksifeen	10540-29-1	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (tsükiline)	Ravim, veterinaarravim
16	5 $\alpha$ -dihüdrotestosteroon	521-18-6	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Steroid, mittefenoolne	Looduslik ühend
17	Bisfenool A	80-05-7	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fenool	Keemiline vaheühend
18	4- <i>n</i> -heptüülfenool	1987-50-4	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ebaselge (a)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Alküülfenool	Vaheühend



▼ M8

	Aine nimetus	CASi nr	Eeldatav tulemus	FW meetod		CERI meetod		MeSHi kemikaalklass	Tootekategooria
				Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus	Kontsentratsioonivahemik (M)	Liigitus		
19	Kepoon (kloordekoon)	143-50-0	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Süsivesinik (halogeenitud)	Pestitsiid
20	Bens[a]antratseen	56-55-3	<i>Mitteseonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv <sup>(b)</sup>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv <sup>(b)</sup>	Aromaatne süsivesinik	Vaetühend
21	Enterolaktoon	78473-71-9	<i>Seonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Seonduv	Fütoöstrogeen	Looduslik ühend
22	Progesteroon	57-83-0	<i>Mitteseonduv</i> (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Steroid	Looduslik ühend
23	Oktüültrietoksüsilaan	2943-75-1	<i>Mitteseonduv</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Mitteseonduv	Silaan	Pinnamodifikaator
24	Atrasiin	1912-24-9	<i>Mitteseonduv</i> (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Mitteseonduv	Heterotsükiline ühend	Herbitsiid

(\*) Lahustuvuspiir  $< 1 \times 10^{-4}$  M.

(\*\*) Di-*n*-butüülftalaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva aina põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini  $10^{-4}$  M, sest valideerimiseelsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil  $10^{-3}$  M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

(†) Valideerimisuurings analüüsi di-*n*-butüülftalaati (DBP) kodeeritud katseainena kontsentratsioonidel kuni  $10^{-3}$  M. Nendes tingimustes täheldati mõnes laboris radiomärgistatud ligandi seondumise vähenemist kõige suuremal kontsentratsioonil ( $10^{-3}$  M) ja/või lähenduskõvera ebasobivust. Neis katsetes liigitati DBP „ebaselgeks“ või „seonduvaks“ CERI meetodi puhul viiest laborist kolmes ja FW meetodi puhul kuuest laborist viies (vt allikas 2, jaotise IV.B.3 alajaotised a ja b ning jaotis VIA).

(<sup>a</sup>) Liigitus ei vasta eeldatavale tulemusele. 4-*n*-heptüülfenooli liigitamine „ebaselgeks“ või „mitteseonduvaks“ viiest laborist kolmes andis keskmiseks liigitamistulemuseks „ebaselge“. Täpsemal uurimisel ilmnes, et sellise liigitamise põhjuseks oli kemikaali piiratud lahustuvus, mis takistas täieliku seondumiskõvera saamist.

(<sup>b</sup>) Valideerimisuuringu ajal liigitati bens[a]antratseen ümber mitteseonduvaks aineks (st negatiivne tulemus) lähtuvalt avaldatud kirjandusandmetest, mille alusel on tõendatud, et kõnealuse aine puhul täheldatav *in vitro* östrogeenne toime (16) põhineb peamiselt selle metaboolset aktiveerimisel (17, 18). Kõnealuses laboritevahelises valideerimisuurings kasutatud rakuvabades hrERiga seondumise katsetes aine ensümaatilist metaboolset aktiveerimist eeldatavalt ei toimu. Seega on see aine õige liigituse kohaselt „mitteseonduv“, kui seda kasutatakse FW ja CERI meetoditele vastavates katsetingimustes.

**▼M8****hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID****Katse põhielemendid**

14. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse katsete puhul, kus kasutatakse östrogeenireseptorit ja sellega tugevalt seonduvat sobivat ligandi, mida on võimalik kasutada markeri/mürgistusainena ja mida saab uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurendamise teel välja tõrjuda. Seondumiskatsed hõlmavad kahte järgmist põhielementi: 1) küllastav seondumine ja 2) konkureeriv seondumine. Küllastava seondumise katset kasutatakse retseptoripreparaadi spetsiifilisuse ja aktiivsuse kontrollimiseks, konkureeriva seondumise katset aga selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet seonduda hrERiga.

**Kontrollid**

15. Kavandatud paralleelsete kontrollide ja võrdlusöstrogeeni valikut tuleks põhjendada. Paralleelseid kontrolle (lahusti (kandeaine), positiivsed kontrollid (ERiga tugevalt seonduv aine ja nõrgalt seonduv aine), negatiivne kontroll (mitteseonduv aine)) kasutatakse vastavalt vajadusele meetodi töökindluse kontrollimiseks asjaomastes katsetingimustes ja nende alusel saab katseid omavahel võrrelda; need kuuluvad tavaliselt katse nõuetekohasuse kriteeriumide hulka (1). Igas analüütsüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrolle (st nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõik ülejäänud plaadid peaksid sisaldama: 1) nii E2 kui ka nõrgalt seonduvat ainet suures (umbes radiomärgistatud ligandi täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC<sub>50</sub>-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespiifilise seondumise kontrolli, kumbagi kolmes paralleelis.

**Standardne kvaliteedikontrolli kord**

16. Standardset kvaliteedikontrolli korda tuleks kohaldada vastavalt iga analüüsimetodi kohta esitatud kirjeldusele, et tagada retseptorite aktiivsus, õigete kemikaalikeskuste kasutamine, hõlbepiirides püsimine mitme korduskatse vältel ja ERiga seondumist käsitlevate ootuspäraste tulemuste saamise võimekus pikema aja vältel.

**Labori pädevuse tõendamine**

17. Enne tundmatute kemikaalide analüüsimist käesoleva katsemeetodi kohases katses tuleks igas laboris tõendada asjaomase meetodi kasutamise pädevust; selleks viiakse läbi küllastava seondumise katsed, et kontrollida ERi preparaadi spetsiifilisust ja aktiivsust, ning konkureeriva seondumise katsed võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega (nõrgalt seonduv aine ja mitteseonduv aine). Laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, mis sisaldab võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemusi eri päevadel läbi viidud 3–5 sõltumatust katsest. Nende katsetega luuakse laboris varasemate võrdlusöstrogeeni ja kontrolle hõlmavate tulemuste näol võrdlusalus, mida kasutatakse järgnevate katsete nõuetekohasuse hindamise osana.
18. Katsesüsteemi reageerimisvõime kontrollimiseks analüüsitakse ka tabelis 2 loetletud pädevusaineid. Sellesse loetellu kantud pädevusained on valitud võrdlusainete hulgast, mida on kirjeldatud ERiga seondumise katsete tulemuslikkuse standardites (3). Kõnealused ained on turul kättesaadavad, kuuluvad kemikaaliklassidesse, mida tavaliselt seostatakse ERiga seondumise võimega, nende afiinsus ERi suhtes jääb sobivasse vahemikku (st tugevast kuni nõrgani) ja nende hulgas on ka mitteseonduvaid aineid (st negatiivsed kontrollid). Iga pädevusaine puhul kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama tabelis 2 esitatud vahemikku. Iga ainega tuleks läbi viia vähemalt kolm katset ning nende katsete tulemused peaksid vastama aine eeldatavale aktiivsusele. Iga katse tuleks läbi viia sõltumatult (st kasutada retseptori, kemikaalide ja reaktiivi värskest valmistatud lahjendusi); seejuures tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada kolme paralleelproovi. Pädevuse tõendamiseks tuleb iga pädevusaine liigitada õigesti positiivseks või negatiivseks. Pädevuse tõendamise katsed peaks läbi viima iga asjaomaseid analüüsimetodeid omandav laborant.

Tabel 2

## hrERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses kasutatavate kontrollide ja pädevusainete loetelu (1)

Nr	Aine nimetus	CASi nr (2)	Eeldatav tulemus (3) (4)	Uuritav kontsentratsioonivahemik (M)	MeSHi kemikaalklass (5)	Tootekategooria (6)
<b>Kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine)</b>						
1	17β-östradiool	50-28-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
2	Noretüodreel (või) Noretindroon	68-23-5 (või) 68-22-4	Seonduv	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
3	Oktüültrietsüsilään	2943-75-1	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silaan	Pinnamodifikaator
<b>Pädevusained (6)</b>						
4	Dietüülstilböstrool	56-53-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükiline), fenool	Ravim, veterinaarravim
5	17α-etüüülöstradiool	57-63-6	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Ravim, veterinaarravim
6	Mesoheksöstrool	84-16-2	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükiline), fenool	Ravim, veterinaarravim
7	Tamoksifeen	10540-29-1	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Süsivesinik (tsükiline)	Ravim, veterinaarravim
8	Genisteiin	446-72-0	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükiline ühend, flavonoid	Looduslik ühend
9	Bisfenool A	80-05-7	Seonduv	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenool	Keemiline vaheühend
10	Zearalenoon	17924-92-4	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterotsükiline ühend, laktoon	Looduslik ühend

## ▼ M8

Nr	Aine nimetus	CASi nr <sup>(2)</sup>	Eeldatav tulemus <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>	Uuritav kontsentratsioonivahemik (M)	MeSHi kemikaalikklass <sup>(5)</sup>	Tootekategooria <sup>(6)</sup>
11	Butüülparabeen	94-26-8	Seonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karboksüülhape, fenool	Säilitusaine
12	Atrasiin	1912-24-9	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterotsükiline ühend	Herbitsiid
13	Di- <i>n</i> -butüülftalaat (DBP) <sup>(7)</sup>	84-74-2	Mitteseonduv <sup>(8)</sup>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Süsivesinik (tsükiline), ester	Plastifikaator, keemiline vaheühend
14	Kortikosteroon	50-22-6	Mitteseonduv	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Looduslik ühend

<sup>(1)</sup> Kui pädevusaine ei ole enam turul kättesaadav, võib kasutada ainet, millel on ERiga seondumise võimet iseloomustav sama liigitus ja võrreldav toime tugevus ning mis kuulub samasse kemikaaliklassi.

<sup>(2)</sup> Lühendid: CASi nr – Chemical Abstracts Service'i registrinumbr.

<sup>(3)</sup> hrERiga seondumist käsitlevate CERi ja FW meetodite valideerimise uuringus  $\alpha$ -ERiga seonduvaks või mitteseonduvaks aineks liigitamise tulemus (2).

<sup>(4)</sup> ERiga seondumise võimet hinnati lähtuvalt alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (ICCVAM) taustülevaadetokumentidest ERiga seondumise ja transkriptsiooni aktiveerimise katsete kohta (9) ning empiirilistest andmetest ja muust teabest, mis on avaldatud kirjanduse loetelus viidatud läbivaadatud uuringutulemustena (10, 11, 12, 13, 14, 15).

<sup>(5)</sup> Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse kemikaaliklassi kasutati rahvusvaheliselt tunnustatud standardiseeritud klassifitseerimissüsteemina USA riikliku meditsiiniiraamatukogu meditsiiniinterimite andmebaasi (MeSH) (kättesaadav aadressil <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

<sup>(6)</sup> Ainete liigitamiseks ühte või mitmesse tootekategooriasse kasutati USA riikliku meditsiiniiraamatukogu ohtlike ainete andmebaasi (kättesaadav aadressil <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

<sup>(7)</sup> DBP-d võib kasutada alternatiivse mitteseonduva kontrollainena suurimas kontsentratsioonis  $10^{-4}$  M.

<sup>(8)</sup> Selle aine lahustuvuspiir on  $10^{-4}$  M. Di-*n*-butüülftalaadi (DBP) kasutamine ja klassifitseerimine mitteseonduva ainaena põhineb analüüsimisel kuni kontsentratsioonini  $10^{-4}$  M, sest valideerimiseelsete uuringute käigus täheldati mõnes laboris, et aine on kontsentratsioonil  $10^{-3}$  M mittelahustuv (nt ilmneb hägusus).

▼ **M8****Uuritava kemikaali lahustuvuse analüüsimine ja kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemine**

19. Iga uuritava kemikaali puhul tuleks teha eelkatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse läbiviimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel tuleb kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku kindlakstegemise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse hägu või sademe tekkimine. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid**

20. Katse tunnistamine nõuetekohaseks või nõuetele mittevastavaks põhineb igas analüütsüklis kasutatud võrdlusöstrogeeni ja kontrollidega saadud tulemuste hindamisel. Esiteks peaks 1. plaadil olevate võrdluskontrollide täielikud kontsentratsioonikõverad igas analüütsüklis vastama lähenduskõvera parameetritega (nt  $IC_{50}$  ja Hilli tõus) seotud tulemusnäitajatele, mis põhinevad vastavates CER1 ja FW meetodite kohastes katse-eeskirjades käsitletud tulemustel (2. ja 3. liide) ja katset läbi viivas laboris kontrollidega varem saadud andmetel. Kõik kontrollid (võrdlusöstrogeen, nõrgalt seonduv aine ja mitte-seonduv aine) peaksid igas analüütsüklis olema õigesti liigitatud. Teiseks tuleb hinnata kõigil ülejäänud plaatidel olevate kontrollide andmete kooskõla 1. plaadi puhul saadud tulemustega. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme sõltumatu analüütsüklil vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Katse järjepideva läbiviimise võimekuse tõendamiseks tuleks luua võrdlusöstrogeeni ja kontrolle iseloomustavate varasemate tulemuste andmebaas ja seda hallata. Laborisese reprodutseeritavuse hindamiseks võib kasutada mitmest eri katsest pärinevate võrdlusöstrogeenile ja nõrgalt seonduvale kontrollainele vastavate lähenduskõverate parameetrite keskvääruste standardhälbeid (SD) ja variatsioonikordajaid (CV). Plaatidel olevate kontrollidega saadud tulemuste hindamine igas analüütsüklis ja iga uuritava kemikaali puhul peaks põhinema eksperdi hinnangul.

Lisaks tuleks juhinduda järgmistest katse nõuetekohasuse kriteeriumidega seotud põhimõtetest:

- andmed peaksid olema piisavad ERiga seondumise kvantitatiivseks hindamiseks;
- kasutatud kontsentratsioonid peaksid jääma uuritava kemikaali lahustuvusvahemikku.

**Andmeanalüüs**

21. Küllastava ja konkureeriva seondumise andmete analüüsimise kindlaksmääratud korra puhul tuleks järgida retseptor ja ligandi vaheliste interaktsioonide iseloomustamise aluspõhimõtteid. Tavaliselt kasutatakse küllastava seondumise andmete analüüsimiseks mittelineaarse regressiooni mudelit, milles võetakse arvesse summaarset ja mittespetsiifilist seondumist.  $B_{max}$ -i ja  $K_d$  määramisel võib olla vaja korrigeerida andmeid ligandi väljatõrjumise suhtes (nt Swillens, 1995 (19)). Konkureeriva seondumise katsete puhul kasutatakse tavaliselt transformeeritud andmeid (nt spetsiifiline seondumine protsentides

**▼M8**

ja uuritava kemikaali kontsentratsioon (log M)). Iga uuritava kemikaali puhul tuleks IC<sub>50</sub> hinnangulise logaritmitud väärtuse kindlakstegemiseks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit. Pärast esmast analüüsi tuleks määrata lähenduskõvera parameetrid ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Mõnel juhul võib olla vaja viia läbi täiendav analüüs, et leida parim lähenduskõver (nt kõvera ülemise ja/või alumise osa piiritlemine, 10 % reegli kasutamine; vt 4. liide ja allikas 2 (jaotis III.A.2)).

22. Katsete vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele (punkt 20) viitab sellele, et katsesüsteem töötab nõuetekohaselt, kuid sellega ei ole tagatud, et igas konkreetses katses saadavad andmed on täpsed. Esimese katse nõuetekohaste tulemuste korduvus on parim viide sellele, et saadud andmed on täpsed.

**Üldised andmete tõlgendamise kriteeriumid**

23. Praegu puudub ühtne kokkulepitud meetod ERiga seondumise andmete tõlgendamiseks. Siiski tuleks hrERi vahendatava mõju kvalitatiivsel (nt seonduv/mitteseonduv) ja/või kvantitatiivsel (nt log IC<sub>50</sub>, suhteline seondumisafüinsus (RBA) jne) analüüsimisel lähtuda empiirilistest andmetest ja usaldusväärsest teaduslikust hinnangust.

**Katseprotokoll**

24. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave.

*Analüüsimetod:*

- kasutatud analüüsimetod.

*Kontrollkemikaal / võrdluskemikaal / uuritav kemikaal:*

- allikas, partii number, aegumiskuupäev, kui on teada;
- uuritava kemikaali püsivus, kui on teada;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis, kui on teada;
- lisatud uuritava kemikaaliga söötme pH ja osmolaalsus ning sademe teke selles (vastavalt vajadusele);

*ühest koostisosast koosnev aine:*

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identifitseerimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

*mitut koostisosa sisaldav aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal (UVCB) või segu:*

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohastest füüsikalised-keemilistest omadustest.

**▼ M8***Lahusti/kandeaine:*

- kirjeldus (aine liik, tarnija ja partii);
- lahusti/kandeaine valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui see on teada.

*Retseptorid:*

- retseptorite päritolu (tarnija, katalooginumber, partii, retseptori liik, retseptori aktiivne kontsentratsioon tarnija andmetel, sertifikaat tarnijalt)
- retseptorite kirjeldus (sh küllastava seondumise tulemused):  $K_d$ ,  $B_{max}$ ;
- retseptorite säilitamine.
- *Radiomärgistatud ligand:*
- tarnija, katalooginumber, partii, eriaktiivsus.

*Katsetingimused:*

- lahustuvuspiir katsetingimustes;
- seondumispuhvri koostis;
- retseptori kontsentratsioon;
- märgistusaine (st radiomärgistatud ligandi) kontsentratsioon;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid;
- kandeaine protsentuaalne sisaldus lõppkatses;
- inkubeerimise temperatuur ja kestus;
- meetod vaba aine eraldamiseks seondunud ainest;
- positiivsed ja negatiivsed kontrollid/võrdlusained;
- kriteeriumid, mille alusel katsetulemus liigitatakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks.

*Nõuetekohasuse kontroll:*

- paralleelsete positiivsete kontrollidega/võrdlusainetega saadud tegelikud  $IC_{50}$  ja Hilli tõusu väärtused.

*Tulemused:*

- algandmed ja andmed seondunud/vaba aine kohta;
- vajaduse korral denatureerumise kontrollimise tulemused;
- väikseim efektiivne kontsentratsioon (LEC), kui see on olemas;
- vastavalt vajadusele RBA ja/või  $IC_{50}$  väärtused;
- võimaluse korral mõju sõltuvus kontsentratsioonist;
- statistilise analüüsi tulemused, kui need on olemas, koos veamäära ja usaldusnivooga (nt keskvaertuse standardviga (SEM), SD, CV või usaldusvahemik usaldusnivool 95 %) ning kirjeldus selle kohta, kuidas need väärtused saadi.

**▼M8**

*Tulemuste arutelu:*

— 10 % reegli rakendamise.

*Järeldused*

**KIRJANDUS**

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 34. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 222. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (5) Cavaillès, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric* 5 Suppl. 2: 20–26.
- (6) Welboren, W. J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer* 16(4): 1073–1089.
- (7) Younes, M., ja Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135(1): 63–66.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 30(4): 293–342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. NIH Publication No 03-4504. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori, Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 22(1): 225–231.
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 67. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.



▼ **M8**

- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line. Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituut (CERI), Jaapan. Lk 1–188.
- (15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., ja Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity. *Toxicol. Lett.* 146: 111–120.
- (16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., ja Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Lett.* 180: 213–221.
- (17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., ja Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196: 58–67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere* 34: 835–848.
- (19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. *Mol. Pharmacol.* 47(6): 1197–1203.

**▼M8***1. liide***MÕISTED JA LÜHENDID**

**10 % reegel** – võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärtus on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärtus mõnel väiksemal kontsentratsioonil (vt 4. liide).

**Asjakohasus** – näitaja, mille abil kirjeldatakse, kuidas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat toimet, kas selle kasutamine on mõttekas ja kas see on konkreetse eesmärgi jaoks sobiv. Asjakohasusest nähtub, mil määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist toimet. Asjakohasuse puhul võetakse arvesse ka katsemeetodiga saavutatavat täpsust (vastavust) (1).

**CV** – variatsioonikordaja.

**E2** – 17β-östradiool.

**ER** – östrogeenireseptor.

**hr-α-ER** – rekombinantne inimese α-östrogeenireseptor.

**IC50** – kontsentratsioon, mille juures pärssiva uuritava kemikaali mõju on poole väiksem maksimaalsel efektiivsel kontsentratsioonil avalduvast mõjust.

**ICCVAM** – alternatiivsete meetodite valideerimise ametitevaheline koordineerimiskomitee.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kontseptuaalne raamistik** – OECD kontseptuaalne raamistik võimalike endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimiseks ja hindamiseks.

**Laborisisene reprodutseeritavus** – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad saada konkreetset katse-eeskirja kasutades eri aegadel ühesuguseid tulemusi (1).

**Laboritevaheline reprodutseeritavus** – näitaja, mis iseloomustab seda, millisel määral suudavad eri pädevad laborid sama katse-eeskirja alusel samu aineid uurides saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelse ja valideerimisega seotud tegevuse käigus ja see näitab, millisel määral on katsemeetod eri laborites edukalt kasutatav (1).

**LEC** – väiksem efektiivne kontsentratsioon: uuritava kemikaali väiksem kontsentratsioon, mille juures kemikaal avaldab veel mõju (st uuritava kemikaali väiksem kontsentratsioon, mille juures mõju on statistiliselt erinev üksnes kandainet sisaldava paralleelse kontrolli puhul täheldatavast mõjust).

**Mina-ka-meetod** – kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on oma ülesehitusel ja funktsionaalsuse poolest sarnane valideeritud ja tunnustatud standardse katsemeetodiga. Seda väljendit kasutatakse sarnase katsemeetodi tähenduses.

**Nõuetekohasuse kriteeriumid** – katses kasutatavate kontrollide ja võrdlusstandardite minimaalsed tulemuslikkuse standardid. Katse nõuetekohaseks tunnistamiseks peaksid kõik nõuetekohasuse kriteeriumid olema täidetud.

**▼ M8**

**Pädevus** – enne tundmatute ainete analüüsimist tõendatud võimekus katsemetodi kohaseid katseid nõuetekohaselt läbi viia.

**Pädevusained** – tulemuslikkuse standarditega hõlmatud alarühm võrdlusaineid, mida võib laboris kasutada standardiseeritud analüüsimeetodi abil tehnilise pädevuse tõendamiseks. Nende ainete valikukriteeriumide hulka kuulub tavaliselt nõue, et nende ainete mõju tugevus oleks erinev, need oleksid turul kättesaadavad ja nende kohta oleksid olemas kvaliteetsed võrdlusandmed.

**RBA** – suhteline seondumisafiinsus. Aine RBA-d väljendatakse aine IC<sub>50</sub> logaritmitud väärtuse protsentuaalse osakaaluna 17β-östradioli IC<sub>50</sub> logaritmitud väärtusest.

**SD** – standardhälve.

**Standardsed katsemetodid** – analüüsimeetodid, millele tuginetakse tulemusnäitajatel põhinevas katsejuhendis nr 493.

**Tulemuslikkuse standardid** – valideeritud katsemetodil põhinevad standardid, mille alusel hinnatakse vaadeldava mehhanismi ja funktsionaalsuse poolest sarnase kavandatud katsemetodi võrreldavust. Need hõlmavad 1) katsemetodi olulisi elemente, 2) valideeritud katsemetodi vastuvõetava tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulgast valitud võrdluskemikaalide miinimumloetelu ja 3) võrreldavat usaldusväärsuse ja täpsuse taset, mille puhul on lähtutud valideeritud katsemetodiga saadud tulemustest ja mis tuleks saavutada kavandatud katsemetodi hindamisel võrdluskemikaalide miinimumloetelu kasutamise teel (1).

**Täpsus (vastavus)** – katsetulemuste ja vastuvõetavate võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab analüüsimeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda mõistet kasutatakse sageli vastavuse tähenduses, et väljendada õigete katsetulemuste osakaalu (1).

**Usaldusväärsus** – näitaja, mis iseloomustab katsemetodiga saadud tulemuste reprodutseeritavust pikema aja jooksul samas laboris ja eri laborites, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel. Usaldusväärsuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemetodi abil.

**Valideerimine** – tegevus, mille käigus määratakse teatud kindla lähenemisviisi, meetodi, katsemudeli, protsessi või hindamisviisi usaldusväärsus ja asjakohasus kindlaksmääratud eesmärgil kasutamisel (1).

**Valideeritud katsemetod** – katsemetod, mille puhul valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetsel eesmärgil kasutamisel. Oluline on märkida, et valideeritud katsemetod ei pruugi olla täpsuse ja usaldusväärsuse poolest piisavalt tulemuslik, et seda saaks lugeda kavandatud eesmärgi puhul vastuvõetavaks (1).

**Võrdlusöstrogeen** – 17β-östradiool (E2, CASi nr: 50-28-2).

**Östrogeenne toime** – kemikaali võime jäljendada 17β-östradioli võimet seonduda östrogeenireseptoriga. Käesolev katsemetod võimaldab tuvastada seondumist inimese α-ERiga.

## ▼M8

## 2. liide

ÖSTROGEENIRETSEPTORIL (A-ER) PÕHINEVAD  
FREYBERGERI-WILSONI IN VITRO MEETODID KÜLLASTAVA JA  
KONKUREERIVA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKS TÄISPIKA  
REKOMBINANTSE A-ER-I ABIL

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

1. Käesoleva östrogenireseptoril ( $\alpha$ -ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse täispikka inimese  $\alpha$ -östrogenireseptorit (hr- $\alpha$ -ER), mille tootmiseks ja eraldamiseks on kasutatud bakuloviirusega nakatunud putukarakke. Freybergeri ja Wilsoni välja töötatud katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.
2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimelised seonduma täispika hr- $\alpha$ -ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr- $\alpha$ -ERile seondumisel 17 $\beta$ -östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC<sub>50</sub> (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiooli väljatõrjumiseks hr- $\alpha$ -ERilt) ja suhtelist seondumisaafiinsust hr- $\alpha$ -ERi suhtes võrreldes 17 $\beta$ -östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritava kemikaali liigitamist hr- $\alpha$ -ERiga seonduvaks aineks, mitte-seonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seondumiskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.
3. Käesoleva analüüsimetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.
4. Enne käesoleva meetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „ÜLDINE SISSEJUHATUS“ ja „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse  $\alpha$ -östrogenireseptoriga (hr- $\alpha$ -ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur aafiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille aafiinsus retseptori suhtes on väiksem.
6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptori ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.
7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisaafiinsus ja arv. Küllastava seondumise katse mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogenireseptori aafiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant  $K_d$ ) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni ( $B_{max}$ ).

## ▼M8

8. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seandumisel [<sup>3</sup>H]17β-östradioliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk IC<sub>50</sub>). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisasiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüüsitsüklis eraldi mõõdetud östradioli IC<sub>50</sub> suhtes. Konkureeriva seondumise katses mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [<sup>3</sup>H]17β-östradioli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seandumiskoht. Radiomärgistatud östradioli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

## KATSE KÄIK

**hr-α-ERi vastuvõetava funktsionaalsuse tõendamine**

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr-α-ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.
- Viiakse läbi [<sup>3</sup>H]17β-östradioli küllastava seondumise katse, et tõendada hr-α-ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr-α-ERi partii puhul dokumenteerida [<sup>3</sup>H]17β-östradioli seondumisasiinsus hr-α-ERi suhtes (K<sub>d</sub>) ja retseptorite arv (B<sub>max</sub>).
  - Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17β-östradiol)), nõrgalt seonduv aine (nt noretinodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine (oktüültrietoksüsilaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine IC<sub>50</sub> ja muude asjakohaste näitajate väärtuste koostööla määra eri katsete lõikes ja hr-α-ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1.

**FW meetodi kohases hrERiga seondumise katses võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid**

Aine	Näitaja	Keskmine (°)	Standardhälve (n)	Usaldusvahemik usaldusnivoole 95 % (°)	
				Alampiir	Ülempiir
<b>17β-östradiol</b>	Maksimumväärtus (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Miimumväärtus (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilli tõus	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC <sub>50</sub> (M)	-8,92 (°)	0,18 (67)	-8,97	-8,88

## ▼M8

Aine	Näitaja	Keskmine <sup>(a)</sup>	Standardhälve (n)	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % <sup>(b)</sup>	
				Alampiir	Ülempiir
<b>Noretünodreel</b>	Maksimumväärtus (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Miinumväärtus (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilli tõus	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC <sub>50</sub> (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
<b>Noretindroon <sup>(c)</sup></b>	Maksimumväärtus (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Miinumväärtus (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilli tõus	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC <sub>50</sub> (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

<sup>(a)</sup> Keskmine ± standardhälve (SD) (n) on arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparaameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

<sup>(b)</sup> Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

<sup>(c)</sup> Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuuringus 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (n) arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparaameetriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.

IC<sub>50</sub> väärtuste vahemik sõltub konkreetses laboris kasutatava retseptoripreparaadi K<sub>d</sub> väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC<sub>50</sub> väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

#### Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päeval läbi viidavast sõltumatust analüütsüklist (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskest valmistatud lahjendusi) ja igas tsüklis tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

#### Retseptori (hr-α-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.
12. Retseptorit tuleks konkureerivale seondumisele vastavates tingimustes (st 1 nM [<sup>3</sup>H]östradiool) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 μM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvutatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 20 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab nende tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,5 nM.

▼ **M8**

13. Kui 20 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatus saavutada vastavust 20 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partii on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

**Küllastava seondumise katse**

14. [<sup>3</sup>H]17β-östradioli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).

— Seondumine märgistamata 17β-östradioli puudumisel ja ERI juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [<sup>3</sup>H]17β-östradiol.

— Seondumine märgistamata 17β-östradioli juuresolekul 1000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17β-östradioliga, ning ERI juuresolekul. Nende tingimuste puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17β-östradioliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradioli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradioli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.

— Seondumine märgistamata 17β-östradioli puudumisel ja ERI puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

*[<sup>3</sup>H]17β-östradioli ja märgistamata 17β-östradioli lahuste valmistamine*

15. [<sup>3</sup>H]17β-östradioli lahjenduste saamiseks tuleks 12 nM [<sup>3</sup>H]17β-östradioli põhilahusele analüüsipuhvri lisamise teel valmistada lahused, kus kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,12 nM kuni 12 nM. Pärast 40 µl sellise lahuse lisamist 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekonsentratsiooniga 0,03 kuni 3,0 nM. Analüüsipuhvri, [<sup>3</sup>H]17β-östradioli põhilahuse ja lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).

16. Etanoolis lahustatud 17β-östradioli lahjenduste saamiseks tuleks analüüsipuhvri lisamise teel valmistada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,06 µM kuni 6 µM. Pärast 80 µl sellise lahuse lisamist 96-kanulise mikrotiiterplaadi vastavasse kannu (saadav lõppruumala on 160 µl) saadakse lahused lõpliku katsekonsentratsiooniga 0,03 µM kuni 3 µM. Märgistamata 17β-östradioli lõppkonsentratsioon igas mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks kasutatavas kannus peaks olema 1000 korda suurem kui märgistatud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli kontsentratsioon. Märgistamata 17β-östradioli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud FW meetodi kohases katse-eeskirjas (2).

17. Tuleks kasutada retseptori sellist nominaalset kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on  $20 \pm 5$  % (vt punktid 12–13). hr-α-ERI lahuse jaoks tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

18. 96-kannulised mikrotiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Näide plaadil kasutatavate [<sup>3</sup>H]17β-östradioli, märgistamata 17β-östradioli, puhvri ja retseptori kontsentratsioonide ja koguste kohta on esitatud liites 2.2.

## ▼M8

Tabel 2.

## Küllastava seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	0,06 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	0,08 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	0,10 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	Sum- maarn- e seon- dumi- ne(ai- nult lahust- i)
B	0,30 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	0,60 ER	nM	[ <sup>3</sup> H]E2 +	1,0 nM	[ <sup>3</sup> H]E2 + ER	3,0 nM	[ <sup>3</sup> H]E2 + ER			
C													
D	0,03 ER + 0,03	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	0,06 ER + 0,06	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	0,08 ER + 0,08	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	0,10 ER + 0,10	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	Mitte- spetsii- filine seond- umine
E	0,30 ER + 0,30	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	0,60 ER + 0,60	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	1,0 ER + 1,0	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	3,0 ER + 3,0	nM μM	[ <sup>3</sup> H]E2 + E2	
F													
G													
H													

[<sup>3</sup>H]E2 – [<sup>3</sup>H]17β-östradiool  
ER – östrogeenireseptor  
E2 – märgistamata 17β-östradiool

19. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

*hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli koguse mõõtmine*

20. hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli eraldamiseks vabast [<sup>3</sup>H]17β-östradioolist tuleks lisada igasse kannu 80 μl külma DCC suspensiooni, loksutada mikrotiiterplaate 10 minutit ja tsentrifugida neid 10 minutit kiirusel umbes 2500 pööret minutis. Et vähendada seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli dissotsieerumist hr-α-ERilt eraldamisprotsessi käigus, on väga oluline hoida puhvreid ja analüüsitavaid kanne temperatuuril 2–8 °C ning viia kõik etapid läbi kiirelt. Mikrotiiterplaadiloksuti on vajalik, et plaate tõhusalt ja kiiresti töödelda.
21. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 μl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli, ning kanda see teisele mikrotiiterplaadile.
22. Seejärel lisatakse igasse kannu (A1–B12 ja D1–E12) 200 μl stsintillatsioonivedelikku, mis on võimeline muutma tuumakiirguse kineetilise energia valgusenergiaks. Mõõteplaadi kannudesse G1–H12 (kasutatakse summaarse radioaktiivsuse mõõtmiseks) tuleks otse stsintillatsioonivedelikku lisada [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli lahused (40 μl) järjestikuste lahjendustena, nagu on näidatud tabelis 3; need kannud sisaldavad seega üksnes 200 μl stsintillatsioonivedelikku ja vastava lahjendusastmega [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli lahust. Nendest kannudest saadud andmetest nähtub, kui palju [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli (mõõdetuna dpm-des) lisati iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.



## ▼M8

Tabel 3.

## Küllastava seondumise katses radioaktiivsuse mõõtmisel kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			0,06 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			0,08 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			0,10 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			Summaarne seondumine (ainult lahusti)
B	0,30 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			0,60 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			1,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			3,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,10 µM E2			Mittespetsiifiline seondumine
E	0,30 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [3H]E2 (summaarne radioaktiivsus dpm-des)			0,06 nM [3H]E2			0,08 nM [3H]E2			0,10 nM [3H]E2			Summaarne radioaktiivsus dpm-des (*)
H	0,30 nM [ <sup>3</sup> H]E2			0,60 nM [ <sup>3</sup> H]E2			1,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2			3,0 nM [ <sup>3</sup> H]E2			

[<sup>3</sup>H]E2 – [<sup>3</sup>H]17β-östradiool

ER – östrogeenireseptor

E2 – märgistamata 17β-östradiool

dpm – lagunemiste arv minutis

(\*) Kannudes G1–H12 tuleks [<sup>3</sup>H]-ga märgistatud radioaktiivse östradioli lahused lisada järjestikuste lahjendustena otse 200 mikrolitriile stsintillatsioonivedelikule.

23. Mõõtmist tuleks alustada pärast vähemalt kahe tunni pikkust viivitust ja loendamisaeg peaks olema 40 minutit kannu kohta. Radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kannu kohta tuleks kasutada mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendurit ja võtta seejuures arvesse sumbumisparandit. Kui mikrotiiterplaadi stsintillatsiooniloendur ei ole kättesaadav, võib proovide analüüsimiseks kasutada tavalist loendurit. Sellisel juhul võib kaaluda loendamisaega lühendamist.

#### Konkureeriva seondumise katse

24. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [<sup>3</sup>H]17β-östradioli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüütsükklis tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüütsükklit. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

#### Kontrollid

25. Katse läbiviimiseks tuleks igas analüütsükklis kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüütsükklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatidele tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC<sub>50</sub>-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki vähemalt kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, kontrollide, [<sup>3</sup>H]17β-östradioli, hr-α-ERi ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on kirjeldatud allikas 2 (K lisa; vt FW meetodi kohane katse-eeskiri).

▼ **M8***Lahustiga kontroll*

26. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on etanool. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil etanoolis mittelahustuv, võib lahustina kasutada DMSO-d. Etanooli või DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes on 1,5 %; see ei tohi olla suurem kui 2 %.

*Puhvrikontroll*

27. Puhvrikontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

*Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)*

28. 17 $\beta$ -östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERi endogeenne ligand ja seondub retseptori  $\alpha$ -vormiga suure afiinsusega. Igas hr- $\alpha$ -ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17 $\beta$ -östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. Märgistamata 17 $\beta$ -östradiolist tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonivahemikus 100 nM kuni 10 pM (-7 [log M] kuni -11 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -7 [log M], -8 [log M], -8,5 [log M], -9 [log M], -9,5 [log M], -10 [log M], -11 [log M]. Märgistamata 17 $\beta$ -östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1  $\mu$ M) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

*Nõrgalt seonduv aine*

29. Igas analüüsisüklis tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast aineist tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust kontsentratsioonivahemikus 3 nM kuni 30  $\mu$ M (-8,5 [log M] kuni -4,5 [log M]); lahuste kontsentratsioonid on järgmised: -4,5 [log M], -5 [log M], -5,5 [log M], -6 [log M], -6,5 [log M], -7 [log M], -7,5 [log M], -8,5 [log M].

*Mitteseonduv aine*

30. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva aine) tuleks kasutada oktüültrietsküsilaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr- $\alpha$ -ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast aineist tuleks katsekannudes kasutamiseks valmistada etanoolis kaheksa lahust log-ühiku kaupa suurenevate kontsentratsioonide vahemikus 0,1 nM kuni 1000  $\mu$ M (-10 [log M] kuni -3 [log M]). Alternatiivse mitteseonduva ainega võib kasutada di-*n*-butüülfalaati (DBP). Selle maksimaalne lahustuvus on teadaolevalt -4 [log M].

*hr- $\alpha$ -ERi kontsentratsioon*

31. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine radioligandi kontsentratsioonil 1 nM on  $20 \pm 5$  % (vt 2. liite punktid 12–13). hr- $\alpha$ -ERi lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

*[<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiool*

32. [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiooli kontsentratsioon katsekannudes peaks olema 1,0 nM.

## ▼M8

*Uuritavad kemikaalid*

33. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos kaheksa järjestikuse üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka punkt 35). Uuritava kemikaali analüüsimiseks tuleks kasutada eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal järjestikusel üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil põhinevat kõverat. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.
34. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 2. liite punkt 26). Kui uuritav kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil etanoolis ega DMSO-s ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.
35. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.
36. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC<sub>50</sub> kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist jaotust eeldatava log IC<sub>50</sub> ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemuses peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC<sub>50</sub> väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seondumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

*Katseplaatide kasutuskeemid*

37. Mikrotiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks need tähistada koodidega, mis vastavad lahustiga kontrollile, võrdlusöstrogeeni suurimale kontsentratsioonile – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seondumist (MSS) – ja puhvriks kontrollile, mida kõiki kasutatakse kuues paralleelis, ning igale kontsentratsioonile kaheksast mitteseonduva kontrollaine (oktüültrietoksüsilani) kontsentratsioonist, võrdlusöstrogeeni seitsmest väiksemast kontsentratsioonist, nõrgalt seonduva aine kaheksast kontsentratsioonist ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksast kontsentratsioonist, mida kõiki kasutatakse kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikrotiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: 1) E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC<sub>50</sub>-le vastavas) kontsentratsioonist, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; 2) lahustiga kontrolli ja mittespetsiifilise seondumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seondumise katses kasutatavale mikrotiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 2.3. Tabelites 4 ja 5 on esitatud katses kasutatavad

## ▼M8

lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema  $1 \times 10^{-7}$  M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni.  $IC_{50}$  tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).

Tabel 4.

**Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
B	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8,5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-9}$ )		
C	E2 ( $1 \times 10^{-9,5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-10}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-11}$ )			Tühi kann (*)		
D	NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-6}$ )		
E	NE ( $1 \times 10^{-6,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7,5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-8,5}$ )		
F	OTES ( $1 \times 10^{-3}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-4}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-5}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-6}$ )		
G	OTES ( $1 \times 10^{-7}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-8}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-9}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-10}$ )		
H	Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)			Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)			Puhvrikontroll			Puhvrikontroll		

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

(\*) Täiesti tühi kasutamata kann.

(\*\*) Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5.

**Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem, mis hõlmab uuritavate kemikaalide täielikke kontsentratsioonikõveraid ja plaadikontrolle**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SS (ainult lahusti)			SS (ainult lahusti)			MSS			MSS		
B	UK1 ( $1 \times 10^{-3}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-4}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-5}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
C	UK1 ( $1 \times 10^{-7}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-8}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-9}$ )			UK1 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
D	UK2 ( $1 \times 10^{-3}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-4}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-5}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
E	UK2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-9}$ )			UK2 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
F	UK3 ( $1 \times 10^{-3}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-4}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-5}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
G	UK3 ( $1 \times 10^{-7}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-8}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-9}$ )			UK3 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
H	NE ( $IC_{50}$ )			NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ )			E2 ( $IC_{50}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )		

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

▼ **M8***Konkureeriva seondumise katse lõpetamine*

38. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks kannudesse lisada 80 µl lahustiga kontrolli, puhvrikontrolli, võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet ja uuritavaid kemikaale, mille lahused on valmistatud analüüsi-puhvris. Seejärel lisatakse igasse kannu 40 µl 4 nM [<sup>3</sup>H]17β-östradioli lahust. Pärast 10 kuni 15 minuti pikkust tasast loksutamist temperatuuril 2–8 °C tuleks lisada 40 µl hr-α-ERi lahust. Katses kasutatavaid mikrotiiterplaate tuleks inkubeerida pöördloksutil 2–8 °C juures 16 kuni 20 tundi.

Tabel 6.

**hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil**

Kogus (µl)	Koostisosa
80	Märgistamata 17β-östradiool, noretünodreel, OTES, uuritav kemikaal, lahusti või puhver
40	4 nM [ <sup>3</sup> H]17β-östradioli lahust
40	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahust
<b>160</b>	<b><i>Lõppruumala igas katsekannus</i></b>

39. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiol on eraldatud vabast [<sup>3</sup>H]17β-östradiolist igasse kannu 80 µl külma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates punktides 20–23.
40. Kannused H1–H6 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 40 µl [<sup>3</sup>H]-ga märgistatud östradioli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 40 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse kannudes H1–H6 olevasse stsintillatsioonivedelikku.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid***Küllastava seondumise katse*

41. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [<sup>3</sup>H]17β-östradioli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.
42. Spetsiifiline seondumine [<sup>3</sup>H]17β-östradioli kontsentratsioonil 1 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 15–25 % eri analüütsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskvaartusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüütsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüütsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.
43. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.
44. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt < 35 % summaarse seondumise määra. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β-östradioli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

## ▼M8

*Konkureeriva seondumise katse*

45. Märgistamata 17 $\beta$ -östradiol peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradioli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.
46. Võrdlusöstrogeeni (st 17 $\beta$ -östradioli) IC<sub>50</sub> väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradioli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katse määratud K<sub>d</sub> summaga.
47. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus 20  $\pm$  5 %, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüütsüklite lõikes 1 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüütsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetsetes analüütsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.
48. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimeetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvriks kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katseüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvriks kontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.
49. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr- $\alpha$ -ERilt välja rohkem kui 25 % [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10<sup>-3</sup> M (OTES) või 10<sup>-4</sup> M (DBP).
50. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretinodreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava FW meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuringus osalenud laborites tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskvaartuse ( $n$ )  $\pm$  SD kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli tõusu, log IC<sub>50</sub>) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete log<sub>10</sub> RBA jaoks ning seda näitajat kasutatakse positiivsete kontrollide puhul tulemuslikkuse kriteeriumina. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC<sub>50</sub> väärtuste vahemik retseptoripreparaadi K<sub>d</sub>-st ja ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.
51. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüütsüklis saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdi hinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise kõvera ülemine osa (nt osa, kus seondumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüütsüklis vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüütsüklis ligilähedaselt vastama FW meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

## ▼M8

**ANDMEANALÜÜS****Küllastava seondumise katse**

52. Mõeldakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seondumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seondumise näitajast mittespetsiifilise seondumise näitaja. [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma platoole, kus [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on hr-α-ERi küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsi nähtuma [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli seondumine ühteainsasse suure afiinsusega seondumiskohta. Küllastava seondumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seondumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.
53. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata  $B_{max}$  ja  $K_d$  üksnes summaarse seondumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seondumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustset regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seondumise andmete alusel  $B_{max}$ -i ja  $K_d$  määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

**Konkureeriva seondumise katse**

54. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ( $\log_{10}$ -ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on  $IC_{50}$  väärtus.
55. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine)  $\log IC_{50}$  hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarset kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparametrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja  $\log IC_{50}$  üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine  $\log IC_{50}$  väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradiooli  $\log IC_{50}$  väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 2. liite punktide 45–50 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.
56. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüütsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt eespool punkt 55). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüütsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüütsükli viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

## ▼ M8

## Andmete tõlgendamine

57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr- $\alpha$ -ERiga seonduvaks, kui seonduvuskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 % (joonis 1).
58. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr- $\alpha$ -ERiga mitteseonduvaks, kui:
- seonduvuskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või
  - sobiv seonduvuskõver puudub ja väikseim silumata keskmine seonduvuseprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.
59. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

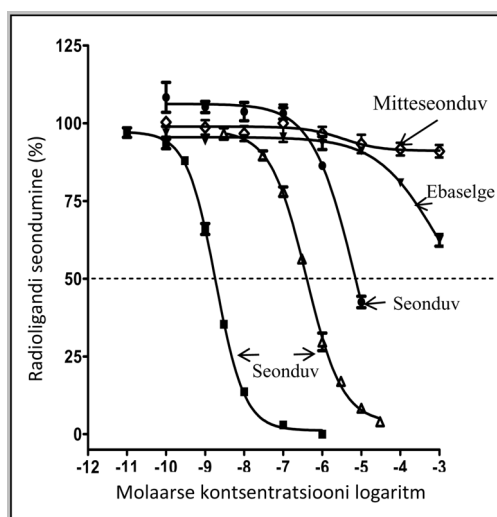
Tabel 7.

## Uuritava kemikaali konkureeriva seonduvuse kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv <sup>a</sup>	Seonduvuskõver sobitub andmetega. <b>Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.</b>
Mitteseonduv <sup>b</sup>	Seonduvuskõvera sobitumisel andmetega on katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %. Sobiva seonduvuskõvera puudumisel on väikseim silumata keskmine seonduvuseprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %.
Ebaselge <sup>c</sup>	Ükskõik millises nõuetekohases analüütsüklis saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

Joonis 1

## Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seonduvuse kõvera alusel





**▼M8**

60. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüütsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüütsükli tulemusele arväärtus ja leitakse nende arväärtuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüütsükli tulemuste koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8.

**Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüütsükli alusel**

<b>Iga analüütsükli tulemusele väärtuse omistamine</b>	
<b>Liigitus</b>	<b>Arvväärtus</b>
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
<b>Liigitamine eri analüütsükliks saadud arväärtuste keskmise alusel</b>	
<b>Liigitus</b>	<b>Arvväärtus</b>
Seonduv	Keskmine $\geq 1,5$
Ebaselge	$0,5 \leq$ keskmine $< 1,5$
Mitteseonduv	Keskmine $< 0,5$

**KATSEPROTOKOLL**

61. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „**hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID**“.

**▼M8***Liide 2.1***MÕISTETE LOETELU**

**[<sup>3</sup>H]E2** – trüitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

**Analüüsipuhver** – 10 mM Tris, veise seerumi albumiini kontsentratsioonis 10 mg/ml, 2 mM DTT, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, pH 7,5.

**Analüüsiüksik** – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli üldkogus, [<sup>3</sup>H]17β-östradioli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsiüksik võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsiüksikus iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsiüksikut.

**DCC** – dekstraaniga kaetud süsi.

**E2** – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

**hr-α-ER** – rekombinantne inimese α-östrogeenireseptor.

**Paralleelproov** – üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsiüksikus. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

▼ **M8**

## Liide 2.2

TAVAPÄRANE [<sup>3</sup>H]17β-ÖSTRADIOOLIGA KÜLLASTAMISE KATSE KOLME PARALLEELKANNUGA

Tavapärane [ <sup>3</sup> H]17β-östradioliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga											
Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
A1	1	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	R	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	R	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	R	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	R	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	R	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	R	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

## ▼M8

Tavapärane [<sup>3</sup>H]17β-östradioliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga

Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
B9	3	R	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	R	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	RM	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	RM	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	RM	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	RM	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	RM	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	RM	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

## ▼M8

Tavapärane [<sup>3</sup>H]17β-östradioliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga

Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
E7	1	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	RM	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	RM	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radiomärgis	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radiomärgis	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radiomärgis	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radiomärgis	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

## ▼ M8

Tavapärane [<sup>3</sup>H]17β-östradioliga küllastamise katse kolme paralleelkannuga

Asukoht	Paralleelproov	Kannuliigi kood	Radioaktiivse E2 algkontsentratsioon (nM)	Radioaktiivse E2 kogus (µl)	Radioaktiivse E2 lõppkontsentratsioon (nM)	Märgistamata E2 algkontsentratsioon (µM)	Märgistamata E2 kogus (µl)	Märgistamata E2 lõppkontsentratsioon (µM)	Puhvri kogus (µl)	Retseptori kogus (µl)	Üldkogus kannus (µl)
H1	1	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radiomärgis	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radiomärgis	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radiomärgis	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radiomärgis	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Tuleb silmas pidades, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

▼M8

## Liide 2.3

## KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSES KASUTATAV MIKROTIITERPLAADI SKEEM

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrE <sub>ri</sub> põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	B5	2	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	Märgistamata E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	Märgistamata E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	Märgistamata E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	Märgistamata E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11



## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	C9	3	Märgistamata E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Tühiproov	Tühiproov	T1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Tühiproov	Tühiproov	T2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Tühiproov	Tühiproov	T3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretünodreel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretünodreel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretünodreel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretünodreel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretünodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrE:ri põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	E8	2	Noretinodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodreel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretinodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodreel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrEi põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Radiomärgis	R	R	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Puhvrikontroll	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—

Tuleb silmas pidada, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 40 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

## ▼M8

## Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A1	1	Summaarne seondumine	SS	SS1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Summaarne seondumine	SS	SS2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Summaarne seondumine	SS	SS3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	Märgistamata (suur)	E2 MSS	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

## ▼M8

## Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	C1	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Uuritav kemikaal nr 1	UK1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

## ▼M8

## Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	E1	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Uuritav kemikaal nr 2	UK2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

## ▼M8

## Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	G1	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Uuritav kemikaal nr 3	UK3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretünodreel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretünodreel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretünodreel	NE		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretünodreel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	Märgistamata E2	S		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	Märgistamata E2	S		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	Märgistamata E2	S		IC <sub>50</sub>	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	Märgistamata E2	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼ **M8**

## 3. liide

LIGANDIGA SEONDUVAL REKOMBINANTSEL INIMESE  $\alpha$ -ER-I  
VALGUDOMEENIL PÕHINEV JAAPANI KEMIKAALIDE HINDAMISE JA  
UURIMISE INSTITUUDI (CERI) *IN VITRO* MEETOD  
ÖSTROGEENIRETSEPTORIGA SEONDUMISE ANALÜÜSIMISEKSLÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD (VT KA ÜLDINE SISSEJU-  
HATUS)

1. Käesoleva östrogenireseptoril ( $\alpha$ -ER) põhineva, küllastava ja konkureeriva seondumise analüüsimist võimaldava *in vitro* meetodi puhul kasutatakse inimese  $\alpha$ -ERi (hr- $\alpha$ -ER) ligandiga seonduvat domeeni (LBD). See valgukonstrukt on toodetud Jaapani Kemikaalide Hindamise ja Uurimise Instituudis (CERI) ja seda ekspresseeritakse glutatiooni S-transferaasiga (GST) ühendatud liitvalguna bakteris *E. coli*. CERI katse-eeskirja on hinnatud rahvusvahelises mitme labori osalusel läbi viidud valideerimisuuringus (2), mille käigus tõendati, et see analüüsimeetod on kavandatud kasutuseesmärgi puhul asjakohane ja usaldusväärne.
2. Käesolev meetod on rakendatav sõeluuringu jaoks, mille eesmärk on tuvastada aineid, mis on võimalised seonduma hr- $\alpha$ -ERiga. Seda kasutatakse selleks, et hinnata uuritava kemikaali võimet konkureerida hr- $\alpha$ -ERi LBD-le seondumisel 17 $\beta$ -östradiooliga. Kvantitatiivsed katsetulemused võivad hõlmata uuritava kemikaali IC<sub>50</sub> (uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis on vajalik poole [<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiooli väljatõrjumiseks hr- $\alpha$ -ERilt) ja suhtelist seondumisaafiinsust hr- $\alpha$ -ERi suhtes võrreldes 17 $\beta$ -östradiooliga. Kemikaalide sõeluuringu puhul võivad vastuvõetavad kvalitatiivsed katsetulemused hõlmata uuritavate kemikaalide liigitamist hr- $\alpha$ -ERiga seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks lähtuvalt seonduvuskõverate suhtes kohaldatavatest kriteeriumidest.
3. Käesoleva analüüsimeetodi puhul kasutatakse radioaktiivset ligandi, mille jaoks peab laboril olema radioaktiivsete materjalide käitlemise luba. Kõikide radioisotoopide ja ohtlike kemikaalidega tehtavate toimingute puhul tuleks järgida siseriiklikes õigusaktides kirjeldatud eeskirju ja korda.
4. Enne käesoleva katsemeetodi kasutamist regulatiivsel eesmärgil tuleks lugeda peatükke „ÜLDINE SISSEJUHATUS“ ja „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENTID“. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud 1. liites.

## MEETODI PÕHIMÕTE (VT KA ÜLDINE SISSEJUHATUS)

5. Inimese rekombinantse  $\alpha$ -östrogenireseptoriga (hr- $\alpha$ -ER) seondumise analüüsimisel mõõdetakse radiomärgistatud ligandi ([<sup>3</sup>H]17 $\beta$ -östradiool) võimet seonduda ERiga üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali (st konkureeriva ligandi) juuresolekul. Uuritavad kemikaalid, millel on ERi suhtes suur aafiinsus, konkureerivad radiomärgistatud ligandiga väiksemal kontsentratsioonil kui kemikaalid, mille aafiinsus retseptori suhtes on väiksem.
6. Kõnealune meetod hõlmab kahte põhielementi: küllastava seondumise katset, millega iseloomustatakse retseptor ja ligandi vahelise interaktsiooni parameetreid, ning sellele järgnevat konkureeriva seondumise katset, millega iseloomustatakse uuritava kemikaali ja radiomärgistatud ligandi vahelist konkurentsi ERile seondumisel.



## ▼M8

7. Küllastava seondumise katse eesmärk on teha konkureeriva seondumise katse eel kindlaks konkreetse partii retseptorite seondumisafiinsus ja arv. Küllastava seondumise katse mõõdetakse tasakaalutingimustes teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava östrogeenireseptori afiinsust loodusliku ligandi suhtes (seda väljendab dissotsiatsioonikonstant  $K_d$ ) ja retseptori aktiivsete seondumiskohtade kontsentratsiooni ( $B_{max}$ ).
8. Konkureeriva seondumise katse mõõdetakse aine afiinsuse hindamiseks selle võimet konkureerida ERile seondumisel [ $^3H$ ]17 $\beta$ -östradiooliga. Afiinsust väljendatakse uuritava kemikaali sellise kontsentratsiooni kaudu, mille juures kemikaal vähendab tasakaalutingimustes [ $^3H$ ]17 $\beta$ -östradiooli spetsiifilist seondumist 50 % võrra (sellele vastab mõiste „50 % ulatuses inhibeeriv kontsentratsioon“ ehk  $IC_{50}$ ). Afiinsust on võimalik hinnata ka suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) kaudu, mis määratakse samas analüütsükli eraldi mõõdetud östradiooli  $IC_{50}$  suhtes. Konkureeriva seondumise katse mõõdetakse teatud kindlas kontsentratsioonis kasutatava [ $^3H$ ]17 $\beta$ -östradiooli seondumist laia vahemikku (kaheksat suurusjärku) hõlmavates kontsentratsioonides erineva uuritava kemikaali juuresolekul. Seejärel kohaldatakse saadud andmete suhtes võimaluse korral teatavat liiki Hilli võrrandit (Hill, 1910), millega kirjeldatakse radioligandi väljatõrjumist konkureeriva seonduva ainega, millel on üks seondumiskoht. Radiomärgistatud östradiooli väljatõrjumise ulatust tasakaalutingimustes kasutatakse uuritava kemikaali liigitamiseks seonduvaks aineks, mitteseonduvaks aineks või ebaselge mõjuga aineks.

## KATSE KÄIK

**hr- $\alpha$ -ERi vastuvõtava funktsionaalsuse tõendamine**

9. Enne küllastava seondumise ja konkureeriva seondumise katsete regulaarset kasutamist tuleks iga uue hr- $\alpha$ -ERi partii puhul tõendada selle nõuetekohast funktsionaalsust laboris, kus seda kasutama hakatakse. Funktsionaalsuse tõendamine peaks hõlmama kahte etappi. Need etapid on järgmised.
- Viiakse läbi [ $^3H$ ]17 $\beta$ -östradiooli küllastava seondumise katse, et tõendada hr- $\alpha$ -ERi spetsiifilisust ja küllastumist. Nende andmete analüüsimisel mittelineaarse regressiooni teel (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja järgnevalt saadud Scatchardi graafiku alusel tuleks iga hr- $\alpha$ -ERi partii puhul dokumenteerida [ $^3H$ ]17 $\beta$ -östradiooli seondumisafiinsus hr- $\alpha$ -ERi suhtes ( $K_d$ ) ja retseptorite arv ( $B_{max}$ ).
  - Viiakse läbi konkureeriva seondumise katse kontrollainetega (võrdlusöstrogeen (17 $\beta$ -östradiool), nõrgalt seonduv aine (nt noretinodreel või noretindroon) ja mitteseonduv aine (oktültrietoksisilaan (OTES)). Igas laboris tuleks luua varasemate tulemuste andmebaas, et võimaldada dokumenteerida võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine  $IC_{50}$  ja muude asjakohaste näitajate väärtuste kooskõla määra eri katsete lõikes ja hr- $\alpha$ -ERi eri partiide puhul. Kontrollaineid iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate parameetrid peaksid jääma usaldusnivoole 95 % vastavasse usaldusvahemikku (vt tabel 1), mis tehti kindlaks kõnealuse analüüsimeetodi valideerimise uuringus osalenud laborites saadud andmete põhjal (2).

Tabel 1

**CERI meetodi kohases hrERiga seondumise katse võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine puhul kohaldatavad tulemuslikkuse kriteeriumid**

Aine	Näitaja	Keskmine (°)	Standardhälve (n)	Usaldusvahemik usaldusnivoole 95 % (°)	
				Alampiir	Ülempiir
<b>17<math>\beta</math>-östradiool</b>	Maksimumväärtus	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Miinumväärtus	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

## ▼M8

Aine	Näitaja	Keskmine <sup>(a)</sup>	Standardhälve ( <i>n</i> )	Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % <sup>(b)</sup>	
				Alampiir	Ülempiir
	Hilli tõus	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	Log IC <sub>50</sub>	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
<b>Noretünodreel</b>	Maksimumväärtus	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Miimumväärtus	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilli tõus	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	Log IC <sub>50</sub>	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
<b>Noretindroon (°)</b>	Maksimumväärtus	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Miimumväärtus	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilli tõus	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	Log IC <sub>50</sub>	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

<sup>(a)</sup> Keskmine ± standardhälve (SD) koos valimi suurusega (*n*) on arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparametriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi valideerimisuuringu jooksul läbi neljas laboris (vt allikas 2, N lisa).

<sup>(b)</sup> Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on esitatud katse nõuetekohasuse kriteeriumide kehtestamise võimaldamiseks.

<sup>(c)</sup> Noretindrooni analüüsimine ei olnud valideerimisuurings 4. alategevuse raames kohustuslik (vt allikas 2, 4. alategevus). Seega on keskmine ± SD (*n*) arvatud lähtuvalt lähenduskõvera hinnangulistest näitajatest (neljaparametriline Hilli võrrand) kontrollkatsetes, mis viidi läbi kahes laboris.

IC<sub>50</sub> väärtuste vahemik sõltub konkreetses laboris kasutatava retseptoripreparaadi K<sub>d</sub> väärtusest ja radiomärgistatud ligandi kontsentratsioonist. IC<sub>50</sub> väärtuste vahemiku asjakohane kohandamine sõltuvalt katse läbiviimiseks kasutatud tingimustest on lubatud.

#### Labori pädevuse tõendamine

10. Tutvuge käesoleva katsemeetodi punktidega 17 ja 18 ning tabeliga 2 peatükis „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENDID“. Iga katse (nii küllastava kui ka konkureeriva seondumise puhul) peaks koosnema kolmest eri päevadel läbi viidavast sõltumatust analüütsüklis (st kasutatakse retseptori, kemikaalide ja reaktiivide värskelt valmistatud lahjendusi) ja igas tsüklis tuleks kasutada kolme paralleelproovi.

#### Retseptori (hr-α-ER) kontsentratsiooni määramine

11. Aktiivse retseptori kontsentratsioon varieerub pisut eri partiide ja säilitustingimuste puhul. Seepärast tuleks määrata tarnijalt saadud aktiivse retseptori kontsentratsioon. See võimaldab kasutada katses sobivat aktiivse retseptori kontsentratsiooni.
12. Retseptorit tuleks konkureerivale seonduvale vastavates tingimustes (st 0,5 nM [<sup>3</sup>H]östradiol) inkubeerida nominaalsel kontsentratsioonil 0,1, 0,2, 0,4 ja 0,6 nM ilma märgistamata östradioolita (summaarne seondumine) ja koos 1 μM märgistamata östradiooliga (mittespetsiifiline seondumine). Spetsiifiline seondumine, mis arvatatakse summaarse ja mittespetsiifilise seondumise

▼ **M8**

vahena, esitatakse graafikul vastavuses retseptori nominaalse kontsentratsiooniga. Retseptori kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise seondumise määr vastab 40 protsendile lisatud radiomärgise kogusest, on seotud retseptori vastava nominaalse kontsentratsiooniga ja seda retseptori kontsentratsiooni tuleks kasutada küllastava ja konkureeriva seondumise katsetes. Sageli vastab neile tingimustele hrERi lõppkontsentratsioon 0,2 nM.

13. Kui 40 % kriteeriumi täitmine korduvalt ebaõnnestub, tuleks kontrollida katseplaani võimalike vigade suhtes. Suutmatus saavutada vastavust 40 % kriteeriumile võib viidata sellele, et rekombinantse valgu partii on väga vähe aktiivset retseptorit, ning sel juhul tuleks kaaluda mõne muu retseptoripartii kasutamist.

**Küllastava seondumise katse**

14. [<sup>3</sup>H]17β-östradioli tuleks hindamiseks kasutada kaheksas eri kontsentratsioonis, iga kontsentratsiooni puhul kolmes paralleelis, ning kohaldada seejuures järgmist kolme tingimust (vt tabel 2).

- a. Seondumine märgistamata 17β-östradioli puudumisel ja ERi juuresolekul. Nii määratakse summaarne seondumine, mida väljendab radioaktiivsus kannudes, kus on ainult [<sup>3</sup>H]17β-östradiol.
- b. Seondumine märgistamata 17β-östradioli juuresolekul 2000-kordses liias, võrreldes radiomärgistatud 17β-östradioliga, ning ERi juuresolekuga. Nende tingimuse puhul on eesmärk küllastada aktiivsed seondumiskohad märgistamata 17β-östradioliga ja määrata kannudes radioaktiivsuse mõõtmise teel mittespetsiifiline seondumine. Radioaktiivse östradioli mis tahes kogus, mis on veel võimeline retseptoriga seonduma, loetakse olevat seondunud mittespetsiifiliselt, sest märgistamata östradioli kontsentratsioon peaks olema nii suur, et kõik saadaolevad spetsiifilise seondumise kohad retseptoril on hõivatud.
- c. Seondumine märgistamata 17β-östradioli puudumisel ja ERi puudumisel (summaarse radioaktiivsuse määramine).

*[<sup>3</sup>H]17β-östradioli, märgistamata 17β-östradioli ja hr-α-ERi lahuste valmistamine*

15. [<sup>3</sup>H]17β-östradioli 1 μM põhilahusest tuleks valmistada [<sup>3</sup>H]17β-östradioli 40 nM lahus DMSOs; selleks lisatakse toatemperatuuril DMSO (et saada 200 nM lahus) ja analüüsipuhvrit (et saada 40 nM lahus). Saadud 40 nM lahusest valmistatakse toatemperatuuril analüüsipuhvri lisamise teel rida [<sup>3</sup>H]17β-östradioli lahjendusi kontsentratsiooniga 0,313 nM kuni 40 nM (nagu on kirjeldatud tabeli 2 kaheteistkümnendas veerus). Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0313–4,0 nM saavutatakse 10 μl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu (vt tabelid 2 ja 3). Analüüsipuhvri valmistamist, eriaktiivsusel põhinevat [<sup>3</sup>H]17β-östradioli algse põhilahuse kontsentratsiooni arvutamist, lahjenduste valmistamist ning kontsentratsiooni määramist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

16. Märgistamata 17β-östradioli lahuse lahjenduste valmistamiseks tuleks kasutada 17β-östradioli 1 nM põhilahust, millele lisatakse analüüsipuhvrit, et saada kaheksa eri kontsentratsioonidega lahust, mille kontsentratsioon jääb algselt vahemikku 0,625 μM kuni 80 μM. Lõplik katsekontsentratsioon vahemikus 0,0625–8 μM saavutatakse 10 μl sellise lahuse lisamisega 96-kannulise mikrotiiterplaadi vastavasse katsekannu, mis on ette nähtud mittespetsiifilise seondumise mõõtmiseks (vt tabelid 2 ja 3). Märgistamata 17β-östradioli lahjenduste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERI katse-eeskirjas (2).

## ▼M8

17. Tuleks kasutada retseptori sellist kontsentratsiooni, mille puhul spetsiifiline seondumine on  $40 \pm 10\%$  (vt punktid 12–13). hr- $\alpha$ -ERi lahus tuleks valmistada jääkülma analüüsi puhvri lisamise teel vahetult enne kasutamist, st pärast seda, kui kõik summaarse seondumise, mittespetsiifilise seondumise ja ainult radioaktiivse ligandi määramiseks ette nähtud kannud on katseks ette valmistatud.
18. 96-kannulised mikrotiiterplaadid valmistatakse ette vastavalt tabelis 2 esitatud skeemile, kus [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli iga kontsentratsiooni puhul kasutatakse kolme paralleelproovi. Kasutatavad [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli, märgistamata 17 $\beta$ -östradioli, puhvri ja retseptori kogused on esitatud tabelis 3.

Tabel 2

## Küllastava seondumise katses kasutatav mikrotiiterplaadi skeem

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	SSi mõõtmiseks			MSSI mõõtmiseks			Ainult radioaktiivse ligandi määramiseks				Märgistamata E2 lahjendused plaadi 4.–6. tulba jaoks	[ $^3\text{H}$ ]E2 lahjendused plaadi 1.–9. tulba jaoks
A	0,0313 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			0,0313 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 0,0625 $\mu\text{M}$ E2+ ER			0,0313 nM				0,625 $\mu\text{M}$	0,313 nM
B	0,0625 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			0,0625 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 0,125 $\mu\text{M}$ E2+ ER			0,0625 nM				1,25 $\mu\text{M}$	0,625 nM
C	0,125 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			0,125 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 0,25 $\mu\text{M}$ E2+ ER			0,125 nM				2,5 $\mu\text{M}$	1,25 nM
D	0,250 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			0,250 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 0,5 $\mu\text{M}$ E2+ ER			0,250 nM				5 $\mu\text{M}$	2,5 nM
E	0,50 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			0,50 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 1 $\mu\text{M}$ E2+ ER			0,50 nM				10 $\mu\text{M}$	5 nM
F	1,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			1,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 2 $\mu\text{M}$ E2+ ER			1,00 nM				20 $\mu\text{M}$	10 nM
G	2,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			2,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 4 $\mu\text{M}$ E2+ ER			2,00 nM				40 $\mu\text{M}$	20 nM
H	4,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ ER			4,00 nM [ $^3\text{H}$ ]E2+ 8 $\mu\text{M}$ E2+ ER			4,00 nM				80 $\mu\text{M}$	40 nM

SS- summaarne seondumine

MSS- mittespetsiifiline seondumine

[ $^3\text{H}$ ]E2- [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradiolE2- märgistamata 17 $\beta$ -östradiol

(\*) Siin on esitatud lõppkontsentratsioon igas kannus.

(\*\*) Märgistamata E2 ja [ $^3\text{H}$ ]E2 lahjendused võib valmistada ka eraldi plaadil.

## ▼M8

Tabel 3

## Reaktiivide kogused küllastamiskatses kasutataval mikroitiiterplaadil

Tulba number		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Katseetapid		SSi kannud			MSSi kannud			Ainult radioaktiivne ligand		
Eespool kirjeldatud reaktsioonikannudesse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Puhver	60 µl			50 µl			90 µl		
	Märgistamata E2 tabeli 2 üheteistkümnendast veerust	–			10 µl			–		
	[ <sup>3</sup> H]E2 tabeli 2 kahteistkümnendast veerust	10 µl			10 µl			10 µl		
	hr-α-ER	30 µl			30 µl			—		
Reaktsiooni koguruumala		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubeerimine		<b>PÄRAST 2 TUNNI PIKKUST INKUBEERIMIST</b>						Radioaktiivsuse kvantifitseerimine kohe pärast lahuse valmistamist; inkubeerimist ei toimu		
Töötlus 0,4 % DCCga		Jah			Jah			Ei		
0,4 % DCC kogus		100 µl			100 µl			–		
Filtrimine		Jah			Jah			Ei		
RADIOAKTIIVSUSE MÕÕTMINE DPM-DES										
Stsintillatsioonikokteilile kvantifitseerimiseks lisatav kogus		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(\*) Kui radioaktiivsuse mõõtmiseks dpm-des kasutatakse mikroitiiterplaatide jaoks ette nähtud vedelikstsintillatsiooniloendurit, ei ole ainult radioaktiivset ligandi sisaldava proovi lisamine SSi ja MSSi kanne sisaldavale katseplaadile asjakohane. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldav proov tuleks sel juhul valmistada eraldi plaadil.

(\*\*) Kui DCC eraldamiseks kasutatakse tsentrifuugimist, tuleks vedelikstsintillatsiooniloenduriga mõõtmiseks kasutada 50 µl supernatanti, et hoida ära DCCga saastumist.

19. Summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise määramiseks kasutatavaid mikroitiiterplaate tuleks inkubeerida toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

*hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli mõõtmine*

20. Pärast kahetunnist inkubatsiooniperioodi tuleks hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli eraldamiseks vabast [<sup>3</sup>H]17β-östradiolist lisada kannudesse 100 µl jääkülma 0,4 % DCC suspensiooni. Seejärel tuleks plaadid asetada 10 minutiks jääle ning DCC eraldamiseks tuleks reaktsioonisegu ja DCC suspensioon kanda filtrimiseks mikroitiiterplaadifiltrile. Järgnevalt tuleks 100 µl filtraati lisada vedelikstsintillatsiooniloenduri vialis olevale stsintillatsioonivedelikule, et määrata vedelikstsintillatsiooniloenduri abil igas vialis lagunemiste arv minutis (dpm).

▼ **M8**

21. Kui mikrotiiterplaadifilter ei ole kättesaadav, võib DCC eemaldamiseks kasutada tsentrifuugimist. Seejärel tuleks DCC puudutamisest tuleneda võiva kannude saastumise ärahoidmiseks väga ettevaatlikult võtta 50 µl supernatanti, mis sisaldab hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli, ning kasutada seda stsintillatsioonide loendamiseks.
22. Ainult radioaktiivset ligandi sisaldavaid proove kasutatakse selleks, et määrata katsekannudesse lisatud [<sup>3</sup>H]17β-östradiolis toimuvate lagunemiste arv minutis (dpm). Radioaktiivsus tuleks kvantifitseerida vahetult pärast proovide valmistamist. Kõnealuseid kanne ei tohiks inkubeerida ega töödelda DCC suspensiooniga, vaid nende sisu tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku. Saadavatest mõõtmistulemustest nähtub, kui palju [<sup>3</sup>H]17β-östradioli lisati dpm-des iga rühma kannudesse summaarse seondumise ja mittespetsiifilise seondumise hindamiseks.

**Konkureeriva seondumise katse**

23. Konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [<sup>3</sup>H]17β-östradioli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Igas analüüsisüklis tuleks iga kontsentratsiooni puhul kasutada üheaegselt kolme paralleelproovi. Lisaks tuleks iga uuritava kemikaaliga läbi viia kolm järjestikust analüüsisüklit. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada ühte või mitut 96-kannulist mikrotiiterplaati.

*Kontrollid*

24. Katse läbiviimisel tuleks igas analüüsisüklis kasutada paralleelset lahustiga kontrolli ja teisi kontrolle (st võrdlusöstrogeeni, nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet). Igas analüüsisüklis tuleks ühel plaadil kasutada võrdlusöstrogeeni ja kontrollaineid (st nõrgalt seonduvat ainet ja mitteseonduvat ainet) täieliku kontsentratsioonikõvera ulatuses. Kõikidele ülejäänud plaatile tuleks kanda i) E2 ja nõrgalt seonduv aine suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas, st radiomärgistatud ligandi praktiliselt täielikuks väljatõrjumiseks vajalikus) ja keskmises (umbes IC<sub>50</sub>-le vastavas) kontsentratsioonis kolmes paralleelis ning ii) lahustiga kontroll ja mittespetsiifilise seondumise kontroll, kumbki kolmes paralleelis. Analüüsipuhvri, [<sup>3</sup>H]17β-östradioli, hr-α-ERI ja uuritava kemikaali lahuste valmistamist on põhjalikult kirjeldatud CERi katse-eeskirjas (2).

*Lahustiga kontroll*

25. Lahustiga kontroll võimaldab tõendada, et lahusti ei mõjuta katsesüsteemi, ja ühtlasi mõõta summaarset seondumist (SS). Eelistatud lahusti on DMSO. Kui uuritav kemikaal on suurimal kontsentratsioonil DMSOs mittelahustuv, võib lahustina kasutada etanooli. DMSO lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 2,05 %; kui uuritav kemikaal on vähelahustuv, võib DMSO sisaldust suurendada kuni 2,5 protsendini. DMSO-d ei tohiks kasutada kontsentratsioonis üle 2,5 %, sest suuremal kontsentratsioonil hakkab lahusti mõjutama katsetulemusi. Kui uuritav kemikaal ei ole DMSOs lahustuv, kuid lahustub etanoolis, võib katses kasutada etanooli maksimaalses kontsentratsioonis 2 %, ilma et see mõjutaks katsetulemusi.

*Puhvrikkontroll*

26. Puhvrikkontroll (PK) ei tohiks sisaldada lahustit ega uuritavat kemikaali, kuid peaks sisaldama kõiki teisi analüüsikomponente. Puhvrikkontrolliga saadud tulemusi võrreldakse lahustiga kontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta analüüsisüsteemi.

▼ **M8***Tugevalt seonduv aine (võrdlusöstrogeen)*

27. 17β-östradiool (CASi nr: 50-28-2) on ERI endogeenne ligand ja seondub retseptori α-vormiga suure afiinsusega. Igas hr-α-ERiga tehtavas konkureeriva seondumise katses tuleks kasutada märgistamata 17β-östradiooli standardkõverat, et oleks võimalik hinnata katsetulemuste varieeruvust samas laboris pikema aja jooksul. DMSOs ja analüüsipuhvris tuleks valmistada kaheksa märgistamata 17β-östradiooli lahust; lõppkontsentratsioonid standardkõverate saamiseks kasutatavates katsekannudes on järgmised: 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-8,5</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-9,5</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup> M. Märgistamata 17β-östradiooli suurimat kontsentratsiooni (1 μM) kasutatakse ka mittespetsiifilise seondumise hindamiseks. See kontsentratsioon on tabelis 4 tähistatud märgisega „MSS“, kuigi see on samuti osa standardkõverast.

*Nõrgalt seonduv aine*

28. Igas analüüsisüklis tuleks tundlikkuse tõendamiseks ja pikema aja jooksul saadud tulemuste varieeruvuse hindamiseks kasutada ka nõrgalt seonduvat ainet (noretünodreeli (CASi nr: 68-23-5) või noretindrooni (CASi nr: 68-22-4)). Nõrgalt seonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: 10<sup>-4,5</sup>, 10<sup>-5,5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-6,5</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-7,5</sup>, 10<sup>-8</sup> ja 10<sup>-9</sup> M.

*Mitteseonduv aine*

29. Negatiivse kontrollina (mitteseonduva ainena) tuleks kasutada oktüültrietsüülaani (OTES; CASi nr: 2943-75-1). Sellega tagatakse, et katse käigus on võimalik tuvastada hr-α-ERiga mitteseonduvaid uuritavaid kemikaale. Mitteseonduvast ainest tuleks valmistada DMSOs ja analüüsipuhvris kaheksa lahust; katsekannudes kasutatavad lõppkontsentratsioonid on järgmised: 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup> M. Alternatiivse mitteseonduva ainena võib kasutada di-*n*-butüülftalaati (DBP; CASi nr: 84-72-2), ent seda võib analüüsida üksnes kontsentratsioonini 10<sup>-4</sup> M. DBP maksimaalne lahustuvus katsetingimustes on teadaolevalt 10<sup>-4</sup> M.

*hr-α-ERi kontsentratsioon*

30. Tuleks kasutada sellist retseptori kogust, mille puhul spetsiifiline seondumine on 40 ± 10 % (vt 3. liite punktid 12–13). hr-α-ERi lahust, mis saadakse funktsionaalse hr-α-ERi lahjendamisel jääkülmas analüüsipuhvris, tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

*[<sup>3</sup>H]17β-östradiool*

31. [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli lõppkontsentratsioon katsekannudes peaks olema 0,5 nM.

*Uuritavad kemikaalid*

32. Iga uuritava kemikaali puhul on esmalt vaja läbi viia lahustuvuskatse, et määrata lahustuvuspiir ja teha kindlaks katse-eeskirja järgimiseks sobiv kontsentratsioonivahemik. Iga uuritava kemikaali lahustuvuspiir tuleb algselt määrata lahustis ja seejärel kontrollida seda katsetingimustes. Katses kasutatav lõppkontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 1 mM. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kasutatakse lahustiga kontrolli koos vähemalt kaheksa järjekärgi üksteisest log-ühiku võrra erineva lahjendusega, mille puhul alustatakse maksimaalsest vastuvõetavast kontsentratsioonist (nt 1 mM või väiksem, olenevalt lahustuvuspiirist), ja registreeritakse nähtava hägu või sademe tekkimine (vt ka 3. liite punkt 35). Kui katse jaoks sobiv kontsentratsioonivahemik on kindlaks tehtud, tuleks uuritavat kemikaali analüüsida eelnevas kontsentratsioonivahemiku leidmise katses kindlaks tehtud kaheksal

## ▼M8

- üksteisest log-ühiku võrra erineval kontsentratsioonil. Teises ja kolmandas katses tuleks kontsentratsioone vajaduse korral kohandada, et kontsentratsioonist sõltuvuse kõverat oleks võimalik paremini iseloomustada.
33. Uuritava kemikaali lahjendused tuleks valmistada sobivas lahustis (vt 3. liite punkt 25). Kui uuritava kemikaal ei lahustu suurimal kontsentratsioonil DMSOs ega etanoolis ja suurema koguse lahusti lisamisel tõuseks lahusti sisaldus lõpplahuses üle lubatud piirmäära, võib suurima kontsentratsioonina kasutada lahjenduste reas järgmist väiksemat kontsentratsiooni. Sellisel juhul võib lisada kontsentratsioonirea lahjemasse otsa ühe lisalahjenduse. Teised kontsentratsioonid lahjenduste reas tuleks jätta muutmata.
34. Uuritava kemikaali lahuseid tuleks pärast katsekannu lisamist hoolikalt jälgida, sest uuritav kemikaal võib kannu lisamisel välja sadeneda. Kõigi sadet sisaldavate kannude andmed tuleks kõvera lähendamisel välja jätta ja registreerida andmete väljajätmise põhjus.
35. Kui eelnevalt on olemas muudest allikatest pärinev teave uuritava kemikaali log IC<sub>50</sub> kohta, võib olla asjakohane kasutada lahjenduste geomeetrilist väiksema sammuga jaotust eeldatava log IC<sub>50</sub> ümber (nt sammuga 0,5 log-ühikut). Lõpptulemus peaks kajastuma piisav kontsentratsioonide ulatus kummalgi pool log IC<sub>50</sub> väärtust, sealhulgas kõvera ülemine ja alumine osa, nii et seandumiskõverat oleks võimalik piisavalt iseloomustada.

*Katseplaatide kasutuskeemid*

36. Tähistatud mikroitiiterplaatide ettevalmistamisel tuleks lähtuda sellest, et katses kasutatakse lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2) suurimat kontsentratsiooni – selle abil hinnatakse ühtlasi mittespetsiifilist seandumist (MSS) – ja puhvrikontrolli kuues paralleelis ning mitteseonduva kontrollaine (oktüültrioksüsilaani) kaheksat kontsentratsiooni, võrdlusöstrogeeni (E2) seitset väiksemat kontsentratsiooni, nõrgalt seonduva aine (noretindrooni või noretindrooni) kaheksat kontsentratsiooni ja iga uuritava kemikaali (UK) kaheksat kontsentratsiooni kolmes paralleelis. Võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid hõlmav plaadi näidisskeem on esitatud tabelis 4. Uuritavate kemikaalide analüüsimiseks kasutatakse eraldi mikroitiiterplaate, mis peaksid sisaldama ka järgmisi plaadikontrolle: i) E2 ja nõrgalt seonduvat ainet suures (maksimaalsele väljatõrjumisele vastavas) ja keskmises (umbes IC<sub>50</sub>-le vastavas) kontsentratsioonis, kõikidel juhtudel kolmes paralleelis; ii) lahustiga kontrolli (summaarse seandumise hindamiseks) ja mittespetsiifilise seandumise kontrolli, kummalgi juhul kuues paralleelis (tabel 5). Konkureeriva seandumise katses kasutatavale mikroitiiterplaadi skeemile vastav näidistööleht kolme tundmatu uuritava kemikaali analüüsimiseks on esitatud liites 3.3. Töölehel ning tabelites 4 ja 5 on esitatud igas katsekannus kasutatavad lõppkontsentratsioonid. E2 maksimaalne kontsentratsioon peaks olema  $1 \times 10^{-7}$  M ja nõrgalt seonduva aine puhul tuleks kasutada 1. plaadil kasutatud suurimat kontsentratsiooni. IC<sub>50</sub> tuleb laboris määrata kontrollidega varem saadud tulemuste andmebaasi alusel. Eeldatavalt on see väärtus sarnane valideerimisuuringutes täheldatud väärtusega (vt tabel 1).



## ▼M8

Tabel 4

**Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem<sup>(1)</sup>,<sup>(2)</sup>, mis hõlmab võrdlusöstrogeeni ja kontrollide täielikke kontsentratsioonikõveraid (1. plaat)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Puhvrikontroll ja positiivne kontroll (E2)			Nõrgalt positiivne aine (noretinodreel)			Negatiivne kontroll (OTES)			SS ja MSS		
<i>A</i>	Tühi kann (*)			$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			SS (lahustiga kontroll) (2,05 % DMSO)		
<i>B</i>	$1 \times 10^{-11}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M					
<i>C</i>	$1 \times 10^{-10}$ M			$1 \times 10^{-7,5}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			MSS ( $10^{-6}$ M E2)		
<i>D</i>	$1 \times 10^{-9,5}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M					
<i>E</i>	$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-6,5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			Puhvrikontroll		
<i>F</i>	$1 \times 10^{-8,5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M					
<i>G</i>	$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-5,5}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			Tühiproov (radiomärgise jaoks) (**)		
<i>H</i>	$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-4,5}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M					

<sup>(1)</sup> Proovide skeem standardeid sisaldaval mikroitiiterplaadil, mida tuleb kasutada igas analüüsisükklis.

<sup>(2)</sup> Tuleb silmas pida, et sellel mikroitiiterplaadil olevate proovide jaoks kasutatakse lahjendusplaadil valmistatud eespool kirjeldatud standardite lahjendusi.

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

(\*) Täiesti tühi kasutamata kann.

(\*\*) Tühiproov, mida ei kasutata inkubeerimise ajal, kuid mida kasutatakse lisatud radiomärgise summaarse radioaktiivsuse kontrollimiseks.

Tabel 5

**Konkureeriva seondumise katses kasutatav mikroitiiterplaadi skeem uuritavaid kemikaale (UK) ja plaadikontrolle sisaldavate ülejäänud plaatide jaoks**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Uuritav kemikaal nr 1 (UK-1)			Uuritav kemikaal nr 2 (UK-2)			Uuritav kemikaal nr 3 (UK-3)			Kontrollid		
<i>A</i>	$1 \times 10^{-10}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		
<i>B</i>	$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M			E2 (IC <sub>50</sub> )		
<i>C</i>	$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			NE ( $1 \times 10^{-4,5}$ M)		
<i>D</i>	$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M			NE (IC <sub>50</sub> )		
<i>E</i>	$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			MSS ( $10^{-6}$ M E2)		
<i>F</i>	$1 \times 10^{-5}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M					
<i>G</i>	$1 \times 10^{-4}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			SS (lahustiga kontroll)		
<i>H</i>	$1 \times 10^{-3}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M					

Selles näites on nõrgalt seonduv aine noretinodreel (NE).

## ▼M8

*Konkureeriva seondumise katse lõpetamine*

37. Nagu on näidatud tabelis 6, tuleks igasse kannu – välja arvatud summaarse seondumise ja tühiproovide (radiomärgise) analüüsimiseks ette nähtud kannud – lisada 50 µl analüüsipuhvrit ja seejärel 10 µl lahustiga kontrolli, võrdlusöstrogeeni (E2), nõrgalt seonduvat ainet, mitteseonduvat ainet või uuritavat kemikaali ning 10 µl 5 nM [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli lahust. Seejärel lisatakse igasse kannu 30 µl jääkülma retseptorilahust ja segatakse saadud lahust ettevaatlikult. hr-α-ERi lahus tuleks lisada viimasena. Katset kasutatavaid mikrotiiterplaate inkubeeritakse toatemperatuuril (22–28 °C) kaks tundi.

Tabel 6

**hrERil põhineva konkureeriva seondumise katse komponentide kogused mikrotiiterplaadil**

Ettevalmistusetapid		Muud kannud peale SSi kannude	SSi kannud	Tühiproov (radiomärgise jaoks)
Eespool kirjeldatud reaktsioonikannudesse lisatavate komponentide kogused ja lisamise järjekord	Toatemperatuuril analüüsipuhver	50 µl	60 µl	90 µl
	Märgistamata E2, nõrgalt seonduv aine, mitteseonduv aine, lahusti või uuritav kemikaal (*)	10 µl	—	—
	[ <sup>3</sup> H]17β-östradiool kontsentratsioonis, mille puhul saadav lõppkontsentratsioon on 0,5 nM (st 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Määratud kontsentratsiooniga hr-α-ERi lahus (vt punktid 12–13)	30 µl	30 µl	—
Lõppruumala igas katsekannus		100 µl	100 µl	100 µl

(\*) Nõuetekohaselt nii valmistatud, et saadava lõppkontsentratsiooni puhul jääb lahusti sisaldus vastuvõetavasse vahemikku.

38. Seejärel tuleks viia läbi hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli kvantifitseerimine pärast seda, kui hr-α-ERiga seondunud [<sup>3</sup>H]17β-östradiool on eraldatud vabast [<sup>3</sup>H]17β-östradioolist igasse kannu 100 µl jääkülma DCC suspensiooni lisamise teel, nagu on kirjeldatud küllastava seondumise katset käsitlevates 3. liite punktides 21–23.
39. Kannused G10–G12 ja H10–H12 (tabelis 4 tähistatud kui tühiproovid (radiomärgise jaoks)) kasutatakse 10 µl [<sup>3</sup>H]-ga märgistatud östradiooli radioaktiivsuse määramiseks dpm-des. 10 µl suurused alikvoodid tuleks lisada otse stsintillatsioonivedelikku.

**Katse nõuetekohasuse kriteeriumid***Küllastava seondumise katse*

40. Spetsiifilise seondumise kõver peaks jõudma [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli kontsentratsiooni suurenedes platoole; see viitab hr-α-ERi küllastumisele ligandiga.
41. Spetsiifiline seondumine [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli kontsentratsioonil 0,5 nM peaks jääma vastuvõetavasse vahemikku 30–50 % eri analüütsüklites mõõdetud, lisatud radiomärgise kogusele vastava summaarse radioaktiivsuse näitajate keskvaartusest. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüütsüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetses analüütsüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada ja küllastamiskatset korrata.

## ▼M8

42. Andmed peaksid võimaldama saada lineaarse Scatchardi graafiku.
43. Mittespetsiifiline seondumine ei tohi olla liiga ulatuslik. Mittespetsiifilise seondumise määr on tavaliselt < 35 % summaarse seondumise määra. See suhtarv võib siiski olla aeg-ajalt suurem, kui mõõdetakse väga väikest dpm-des väljendatavat radioaktiivsust radiomärgistatud 17β-östradiooli väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.

*Konkureeriva seondumise katse*

44. Märgistamata 17β-östradiool peaks kontsentratsiooni suurenedes tõrjuma [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli retseptorilt välja viisil, mis vastab konkureerivale seondumisele ühes seondumiskohas.
45. Võrdlusöstrogeeni (st 17β-östradiooli) IC<sub>50</sub> väärtus peaks olema ligikaudselt võrdne [<sup>3</sup>H]17β-östradiooli molaarse kontsentratsiooni ja küllastava seondumise katses määratud K<sub>d</sub> summaga.
46. Spetsiifiline seondumine peaks järjepidevalt olema vastuvõetavas vahemikus 40 ± 10 %, kui igas kannus täheldatavale summaarsele radioaktiivsusele vastav lisatud radiomärgise keskmine mõõdetud kontsentratsioon on eri analüüsisüklite lõikes 0,5 nM. Aeg-ajalt esinevad väikesed kõrvalekalded sellest vahemikust on lubatud, ent kui analüüsisüklites saadud tulemused on pidevalt sellest vahemikust väljaspool või mõnes konkreetse analüüsisüklis saadud väärtus jääb sellest vahemikust väga kaugemale, tuleks valgu kontsentratsiooni kohandada.
47. Lahusti ei tohiks mõjutada analüüsimetodi tundlikkust ega tulemuste reprodutseeritavust. Lahustiga kontrolliga (SSi kannudega) saadud tulemusi võrreldakse puhvrikontrolliga saadud tulemustega, tõendamaks, et kasutatud lahusti ei mõjuta katsesüsteemi. Kui lahustil puudub mõju katsetulemustele, peaksid SSi proove ja puhvrikontrolli iseloomustavad tulemused olema võrreldavad.
48. Mitteseonduv aine ei tohiks tõrjuda hr-α-ERilt välja rohkem kui 25 % [<sup>3</sup>H]17β-östradioolist, kui sellist ainet analüüsitakse kontsentratsioonil kuni 10<sup>-3</sup> M (OTES) või 10<sup>-4</sup> M (DBP).
49. Tulemuslikkuse kriteeriumide väljatöötamiseks võrdlusöstrogeeni ja kahe nõrgalt seonduva aine (nt noretündreeli ja noretindrooni) jaoks on kasutatud hrERiga seondumist analüüsida võimaldava CERi meetodi valideerimise uuringu andmeid (allikas 2, N lisa). Valideerimisuuringu osalenud neljas laboris tehtud kõikide kontrollkatsete tulemuste puhul on keskvärtuse ± SD (*n*) kõrval esitatud ka usaldusvahemik usaldusnivool 95 %. Usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on arvatud võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvaid aineid iseloomustavate lähenduskõvera parameetrite (st maksimumi, miinimumi, Hilli tõusu, log IC<sub>50</sub>) jaoks ning võrdlusöstrogeeni suhtes väljendatava nõrgalt seonduvate ainete log<sub>10</sub> RBA jaoks. Tabelis 1 on esitatud tulemuslikkuse kriteeriumidena kasutatavate lähenduskõvera parameetrite eeldatavad väärtusevahemikud. Praktikas võib IC<sub>50</sub> väärtuste vahemik retseptoripreparaadi katseliselt määratud K<sub>d</sub>-st ja katses kasutatavast ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt pisut varieeruda.
50. Uuritavate kemikaalide jaoks ei ole lähenduskõvera parameetreid käsitlevaid tulemuslikkuse kriteeriume kindlaks määratud, kuna olemasolevate võimalike uuritavate kemikaalide hulk on lai ning nende võimalik afiinsus ja saadavad tulemused varieeruvad (nt täielik kõver, osaline kõver, sobiva kõvera puudumine). Uuritava kemikaaliga igas analüüsisüklis saadud tulemuste hindamisel tuleks siiski lähtuda eksperdi hinnangust. Tuleks kasutada piisavalt suurt uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku, et konkureeriva seondumise

## ▼M8

kõvera ülemine osa (nt osa, kus seundumine on 90–100 %) selgelt välja joonistuks. Paralleelproovide vaheline varieeruvus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil ja kolme järjestikuse analüütsükli vaheline varieeruvus peaks olema mõõdukas ja teaduslikult põhjendatav. Uuritava kemikaali hindamisel peaksid kontrollidega saadud tulemused igas analüütsükli ligilähedalt vastama CERI meetodit iseloomustavatele tulemusnäitajatele ja olema kooskõlas asjaomases laboris kontrollidega varem saadud tulemustega.

## ANDMEANALÜÜS

**Küllastava seundumise katse**

51. Mõõdetakse nii summaarset kui ka mittespetsiifilist seundumist. Nende väärtuste põhjal arvutatakse üha suuremas kontsentratsioonis esineva [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifilise seundumise näitaja tasakaalutingimustes; selleks lahutatakse summaarse seundumise näitajast mittespetsiifilise seundumise näitaja. [<sup>3</sup>H]17β-östradioli kontsentratsioonist sõltuva spetsiifilise seundumise kõver peaks jõudma platoole, kus [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifiline seundumine on hr-α-ERi küllastumisest tulenevalt maksimaalne. Lisaks peaks andmeanalüüsi nähtuma [<sup>3</sup>H]17β-östradioli seundumine ühteainsasse suure afiinsusega seundumiskohta. Küllastava seundumise graafikul peaks olema näidatud mittespetsiifiline, summaarne ja spetsiifiline seundumine. Järgnevas andmeanalüüsis tuleks kasutada mittelineaarset regressiooni (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja andmed tuleks lõplikul kujul esitada Scatchardi graafikul.
  
52. Andmeanalüüsi käigus tuleks määrata  $B_{\max}$  ja  $K_d$  üksnes summaarse seundumise andmete põhjal ning lähtuda seejuures eeldusest, et mittespetsiifiline seundumine on lineaarne, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus teistsuguse meetodi kasutamise kohta. Lisaks tuleks parima lähenduskõvera leidmiseks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustset regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Küllastava seundumise andmete alusel  $B_{\max}$ -i ja  $K_d$  määramisel tuleks andmeid alati korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes (nt meetodi abil, mida on kirjeldanud Swillens (1995)).

**Konkureeriva seundumise katse**

53. Konkureeriva seundumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifiline seundumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ( $\log_{10}$ -ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifiline seundumine on 50 % maksimummäärast, on  $IC_{50}$  väärtus.
  
54. Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine)  $\log IC_{50}$  hinnanguliste väärtuste kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarset kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparametrist Hilli võrrandit (nt BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja  $\log IC_{50}$  üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Andmeid ei tohiks korrigeerida ligandi väljatõrjumise suhtes. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seundumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seundumisafiinsuse (RBA) leidmiseks tuleks arvutada nõrgalt seonduva aine  $\log IC_{50}$  väärtuse protsentuaalne osakaal 17β-östradioli  $\log IC_{50}$  väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt käesoleva 3. liite punktide 44–49 kohastest katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest.

▼ **M8**

55. Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Soovitavalt tuleks uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüütsükli puhul esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul (vt käesoleva 3. liite punkt 54). Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüütsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [<sup>3</sup>H]17β-östradioli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite sarnased väärtused kolmes analüütsükli viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt.

**Andmete tõlgendamine**

56. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga seonduvaks, kui seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jõdvale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on võiksem kui 50 % (joonis 1).
57. Kui kõik nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud, loetakse uuritav kemikaal hr-α-ERiga mitteseonduvaks, kui:
- seondumiskõver sobitub andmetega ja katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on suurem kui 75 % või
  - sobiv seondumiskõver puudub ja väiksem silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas on suurem kui 75 %.
58. Kui ükski eespool kirjeldatud tingimus ei ole täidetud (nt lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on vahemikus 75–50 %), liigitatakse uuritav kemikaal ebaselgeks.

Tabel 7

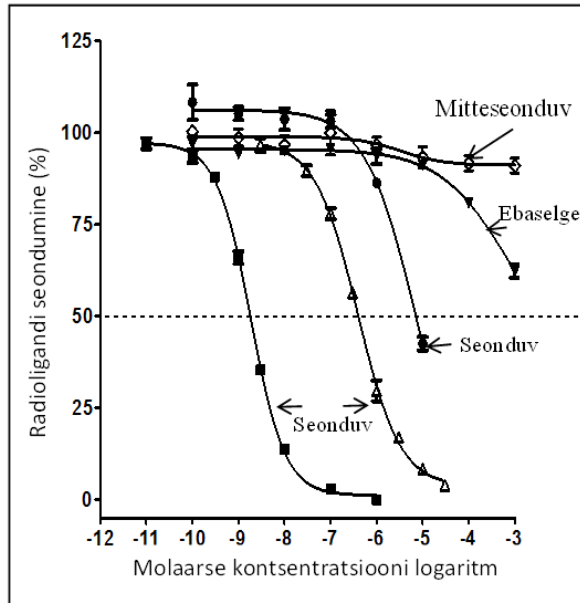
**Uuritava kemikaali konkureeriva seondumise kõveral põhinevad liigitamiskriteeriumid**

Liigitus	Kriteeriumid
Seonduv <sup>a</sup>	Seondumiskõver sobitub andmetega. <b>Katseandmete vahemikku jäävale sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus on väiksem kui 50 %.</b>
Mitteseonduv <sup>b</sup>	Seondumiskõvera sobitumisel andmetega on <b>katseandmete vahemikku jäävale lähendatud sõltuvuskõvera madalaimale punktile vastav väärtus suurem kui 75 %.</b> Sobiva seondumiskõvera puudumisel on <b>väiksem silumata keskmine seondumisprotsent eri kontsentratsioonidel saadud andmete hulgas suurem kui 75 %.</b>
Ebaselge <sup>c</sup>	Ükskõik millises nõuetekohases analüütsükli saadud tulemus, mille alusel ei saa uuritavat kemikaali liigitada seonduvaks aineks ega mitteseonduvaks aineks (näiteks vastab lähendatud sõltuvuskõvera madalaim punkt väärtusele 75–50 %).

▼ **M8**

Joonis 1.

Näited uuritava kemikaali liigitamise kohta konkureeriva seondumise kõvera alusel



59. Samas laboris uuritava kemikaaliga läbi viidud mitme analüütsükli tulemuste kokkuvõtmiseks omistatakse iga analüütsükli tulemusel arvvaartus ja leitakse nende arvvaartuste keskmine, nagu on kirjeldatud tabelis 8. Igas laboris analüütsükli tulemuste koondamisel saadud tulemust võrreldakse iga uuritava kemikaali puhul eeldatava liigitamistulemusega.

Tabel 8

Meetod uuritava kemikaali liigitamiseks samas laboris läbi viidud mitme analüütsükli alusel

Iga analüütsükli tulemusel väärtuse omistamine	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	2
Ebaselge	1
Mitteseonduv	0
Liigitamine eri analüütsükli tulemuste keskmine alusel	
Liigitus	Arvväärtus
Seonduv	Keskmine $\geq 1,5$
Ebaselge	$0,5 \leq$ keskmine $< 1,5$
Mitteseonduv	Keskmine $< 0,5$

## KATSEPROTOKOLL

60. Vt käesoleva katsemeetodi punkt 24 peatükis „hrER-GA SEONDUMISE KATSE ELEMENTID“.

**▼M8***Liide 3.1***MÕISTETE LOETELU**

**[<sup>3</sup>H]E2** – trüitiumiga radiomärgistatud 17β-östradiool.

**Analüüsi puhver** – 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 % glütserooli, 0,2 mM leupeptiin, 1 mM ditiotreitol ja veise seerumi albumiini kontsentratsioon 10 mg/ml.

**Analüüsi sükkel** – mikrotiiterplaadi katsekannude täieliku komplekti üheaegne analüüs, mille tulemusena saadakse kogu vajalik teave uuritava kemikaali ja hr-α-ERi omavahelise seondumise iseloomustamiseks (nimelt katsekannu lisatud [<sup>3</sup>H]17β-östradioli üldkogus, [<sup>3</sup>H]17β-östradioli maksimaalne seondumismäär hr-α-ERiga seondumisel, mittespetsiifilise seondumise määr ja summaarse seondumise määr uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel). Analüüsi sükkel võidakse igal kontsentratsioonil kasutada ka ainult ühte katsekannu (st paralleeli), ent kuna käesolevas katse-eeskirjas nõutakse kolme paralleelproovi kasutamist, analüüsitakse käesoleval juhul ühes analüüsi sükkelis iga kontsentratsiooni puhul kolme katsekannu. Peale selle viiakse käesoleva katse-eeskirja kohaselt iga kemikaaliga läbi kolm iseseisvat (st järjestikust) analüüsi sükkelit.

**DCC** – dekstraaniga kaetud süsi.

**E2** – märgistamata 17β-östradiool (inertne).

**hr-α-ER** – rekombinantne inimese α-östrogeenireseptor (ligandiga seonduv domeen).

**Paralleelproov** – Üks mitmest kannust, mis sisaldavad samu koostisaineid samas kontsentratsioonis ning mida analüüsitakse üheaegselt samas analüüsi sükkelis. Käesoleva katse-eeskirja puhul analüüsitakse uuritavat kemikaali igal kontsentratsioonil kolmes paralleelis, st igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil analüüsitakse üheaegselt kolme paralleelproovi.

## ▼M8

## Liide 3.2

## KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSE KASUTATAV MIKROTIITERPLAADI SKHEEM

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Labjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	A1	1	Tühi kann	TK	TK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Tühi kann	TK	TK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Tühi kann	TK	TK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	Märgistamata E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	Märgistamata E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	Märgistamata E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	Märgistamata E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	Märgistamata E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08



## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	G2	2	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	Märgistamata E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	Märgistamata E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretünodreel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretünodreel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretünodreel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretünodreel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretünodreel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	F4	1	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretünodreel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretünodreel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretünodreel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	Summaarne seandumine	SS	SS1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Summaarne seandumine	SS	SS2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Summaarne seandumine	SS	SS3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Summaarne seandumine	SS	SS4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	Summaarne seandumine	SS	SS5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Summaarne seandumine	SS	SS6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

## ▼ M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	D12	6	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Puhvrikontroll	PK	PK1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Puhvrikontroll	PK	PK2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Puhvrikontroll	PK	PK3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Puhvrikontroll	PK	PK4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Puhvrikontroll	PK	PK5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Puhvrikontroll	PK	PK6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Tühiproov (radiomärgise jaoks)	Radio-	H4	—	90	—	10	—	100	—

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Määrgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
S	H11 (*)	5	Tühiproov (radiomäärgise jaoks)	Radio-määrgis	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12*	6	Tühiproov (radiomäärgise jaoks)	Radio-määrgis	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Tundmatu nr 1	T1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Tundmatu nr 1	T1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Tundmatu nr 1	T1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Tundmatu nr 1	T1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Tundmatu nr 1	T1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Tundmatu nr 1	T1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Tundmatu nr 1	T1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	H3	3	Tundmatu nr 1	T1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Tundmatu nr 2	T2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Tundmatu nr 2	T2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Tundmatu nr 2	T2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Tundmatu nr 2	T2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Tundmatu nr 2	T2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Tundmatu nr 2	T2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Tundmatu nr 2	T2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Tundmatu nr 2	T2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	A9	3	Tundmatu nr 3	T3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Tundmatu nr 3	T3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Tundmatu nr 3	T3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Tundmatu nr 3	T3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Tundmatu nr 3	T3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Tundmatu nr 3	T3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Tundmatu nr 3	T3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Tundmatu nr 3	T3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontroll: E2 (maks.)	S	E2maks3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontroll: E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub> 1	E2 IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	E2 IC <sub>50</sub>

## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Läppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	B11	2	Kontroll: E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub> 2	E2 IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	E2 IC <sub>50</sub>
P1	B12	3	Kontroll: E2 (IC <sub>50</sub> )	S	E2IC <sub>50</sub> 3	E2 IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	E2 IC <sub>50</sub>
P1	C10	1	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontroll: NE (maks.)	S	NEmaks3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontroll: NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub> 1	NE IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	NE IC <sub>50</sub>
P1	D11	2	Kontroll: NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub> 2	NE IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	NE IC <sub>50</sub>
P1	D12	3	Kontroll: NE (IC <sub>50</sub> )	S	NEIC <sub>50</sub> 3	NE IC <sub>50</sub> × 10	30	50	10	10	100	NE IC <sub>50</sub>
P1	E10	1	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	Märgistamata E2 (suur)	MSS	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	Summaarne seandumine	SS	SS1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Summaarne seandumine	SS	SS2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Summaarne seandumine	SS	SS3	—	30	60	10	—	100	—



## ▼M8

Plaat	Asukoht	Paralleelproov	Kannu liik	Kannu kood	Kontsentratsiooni kood	Konkureeriva aine algkontsentratsioon (M)	hrERI põhilahus (µl)	Puhvri kogus (µl)	Märgise (radioaktiivse E2) kogus (µl)	Lahjendusplaadilt lisatav kogus (µl)	Lõppruumala (µl)	Konkureeriva aine lõppkontsentratsioon (M)
P1	H10	4	Summaarne seondumine	SS	SS4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Summaarne seondumine	SS	SS5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Summaarne seondumine	SS	SS6	—	30	60	10	—	100	—

(\*) Tuleb silmas pidada, et kannud tähisega „Radiomärgis“ on inkubeerimise ajal tühjad. Ettenähtud 10 µl lisatakse ainult stsintillatsioonide loendamiseks.

## ▼ M8

## 4. liide

## hrER-IL PÕHINEVA KONKUREERIVA SEONDUMISE KATSE ANDMETE ANALÜÜSIMISE KAALUTLUSED

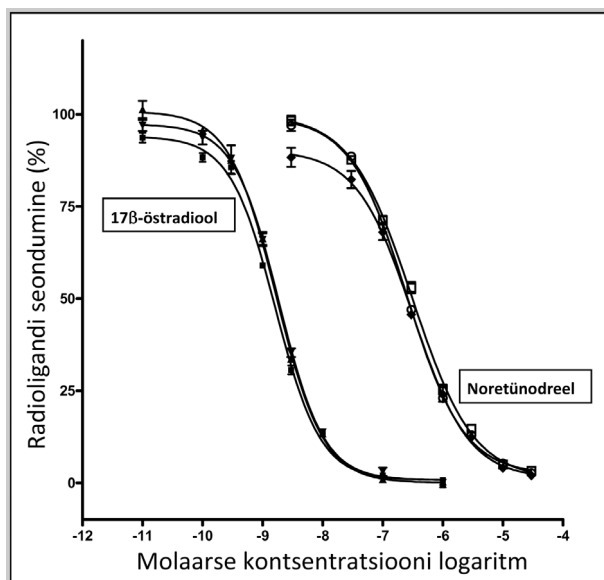
1. hr- $\alpha$ -ERil põhineva konkureeriva seondumise katse käigus mõõdetakse ühel kontsentratsioonil kasutatava [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli seondumist üha suuremas kontsentratsioonis esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Konkureeriva seondumise kõver esitatakse graafikul nii, et ühel teljel on [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli spetsiifiline seondumine ja teisel konkureeriva aine kontsentratsioon ( $\log_{10}$ -ühikutes). Uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli spetsiifiline seondumine on 50 % maksimummäärast, on IC<sub>50</sub> väärtus.

Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine andmete analüüs (1)

2. Kontrollidega saadud andmete edasiseks analüüsimiseks need transformeeritakse (st [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradioli spetsiifilist seondumist väljendatakse protsentides ja kontrollkemikaali kontsentratsiooni logaritmituna). Positiivsete kontrollide (nt võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva aine) log IC<sub>50</sub> hinnangulise väärtuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada sobivat mittelineaarse kõvera lähendamise tarkvara, milles rakendatakse neljaparameetrilist Hilli võrrandit (nt BioSoft; GraphPad Prism) (2). Kõnealuste kõverate lähendamisel tuleks kõvera ülemine ja alumine osa, tõus ja log IC<sub>50</sub> üldjuhul jätta piiritlemata. Parima lähenduskõvera leidmiseks tuleks kasutada robustset regressioonanalüüsi, v.a juhul, kui esitatakse põhjendus muu lähenemisviisi kasutamise kohta. Tuleks märkida, millist robustse regressioonanalüüsi meetodit kasutatakse. Andmete korrigeerimine ligandi väljatõrjumise suhtes ei ole hrERil põhinevate FW ja CERi meetodite puhul vajalik, kuid seda võib vajaduse korral kaaluda. Pärast esmast analüüsi tuleks iga seondumiskõver üle vaadata, et veenduda mudeli ja andmete omavahelises sobivuses. Nõrgalt seonduva aine suhtelise seondumisafiinsuse (RBA) leidmiseks võib arvutada nõrgalt seonduva aine log IC<sub>50</sub> väärtuse protsentuaalne osakaal 17 $\beta$ -östradioli log IC<sub>50</sub> väärtusest. Positiivsete kontrollidega ja mitteseonduval ainel põhineva kontrolliga saadud tulemusi tuleks hinnata lähtuvalt katsemeetodi tulemuslikkuse näitajatest ja nõuetekohasuse kriteeriumidest, mida on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis (punkt 20), 2. liites (FW analüüsimeetod, punktid 41–51) ja 3. liites (CERi analüüsimeetod, punktid 41–51). Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduva ainega läbi viidud kolme analüüsitsükli tulemusi hõlmavad näited on esitatud joonisel 1.

Joonis 1.

Võrdlusöstrogeeni ja nõrgalt seonduvat kontrollainet iseloomustavate konkureeriva seondumise kõverate näited



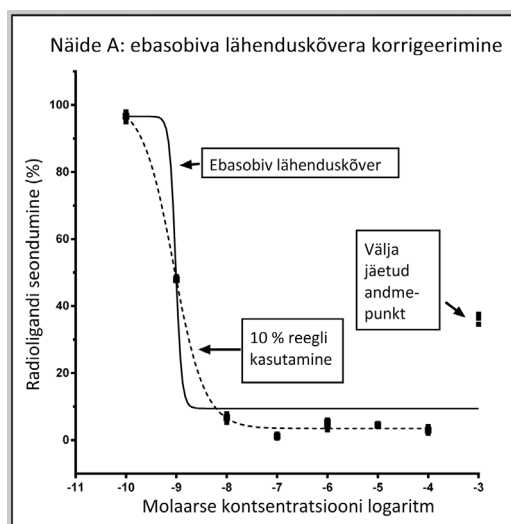
## ▼ M8

## Uuritavate kemikaalide andmete analüüs

- Kõigi uuritavate kemikaalide andmete analüüsimisel tuleks kasutada astmelist lähenemist, et tagada andmete asjakohane analüüs ja kõigi konkureeriva seondumise kõverate nõuetekohane liigitamine. Uuritava kemikaaliga läbi viidud iga analüütsükli puhul tuleks esmalt rakendada täpselt sama standardiseeritud andmeanalüüsi, mida kasutatakse võrdlusöstrogeenil ja nõrgalt seonduval ainel põhinevate kontrollide puhul. Pärast esmast analüüsi tuleks iga analüütsükli puhul teha lähenduskõvera parameetrite tehniline kontroll ja visuaalselt hinnata, kui hästi sobituvad seondumisandmed saadud konkureeriva seondumise kõveraga. Tehnilise kontrolli käigus täheldatav kontsentratsioonist sõltuv [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradiooli spetsiifilise seondumise protsentuaalse määra vähenemine, tehniliste paralleelproovide andmete vaheline väike varieeruvus kemikaali kõigil kontsentratsioonidel ja lähenduskõvera parameetrite samased väärtused kolmes analüütsükklis viitavad sellele, et katse ja andmeanalüüs on läbi viidud nõuetekohaselt. Uuritava kemikaaliga igas analüütsükklis saadud andmete hindamisel tuleks lähtuda eksperdihinnangust ja tulemused, mille alusel iga uuritav kemikaal liigitatakse seonduvaks või mitteseonduvaks, peaksid olema teaduslikult põhjendatavad.
- Aeg-ajalt võib esineda andmeid, mis vajavad täiendavat tähelepanu, et hrERiga seondumise tulemusi oleks võimalik nõuetekohaselt analüüsida ja tõlgendada. Varasemates uuringutes on täheldatud juhtumeid, kus retseptori-põhise konkureeriva seondumise andmete analüüsi võib muuta keeruliseks asjaolu, et spetsiifilise seondumise protsentuaalne määr kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel suureneb (joonis 2). See on tuntud probleem, millega on kokku puutunud mitme retseptoripõhist konkureerivat seondumist käsitleva katse-eeskirja puhul (3). Sellistel juhtudel täheldatakse väiksematel kontsentratsioonidel kontsentratsioonist sõltuvust, kuid kui uuritava kemikaali kontsentratsioon läheneb lahustuvuspiirile, ei suurene [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradiooli väljatõrjumine enam. Sellisel juhul nähtub suurematel kontsentratsioonidel saadud andmetest, et on jõutud analüüsimeetodi bioloogilise kasutuspiirini. Näiteks on seda nähtust paljudel juhtudel seostatud kemikaali mittelahustuvusega ja väljasadenemisega suurel kontsentratsioonil, kuid see võib olla põhjustatud ka asjaolust, et dekstraaniga kaetud süsi ei ole kemikaali suurimatel kontsentratsioonidel võimeline siduma eraldamisetapis enam rohkem radiomärgistatud vaba ligandi. Selliste andmepunktide sissejätmine sigmoidkõvera lähendamisel konkureeriva seondumise katse andmetele võib vahel põhjustada uuritava kemikaali valesti liigitamist ERiga seondumise võime alusel (joonis 2). Sellise olukorra ärahoidmiseks on hrERiga seondumisel põhinevate FW ja CERI meetodite katse-eeskirjas nähtud ette võimalus jätta analüüsist välja andmepunktid, kus [ $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -östradiooli spetsiifilist seondumist iseloomustav paralleelproovide andmete keskväärts on vähemalt 10 % suurem kui vastav keskväärts mõnel väiksemal kontsentratsioonil (sellele viidatakse tavaliselt kui 10 % reeglile). Seda reeglit võib iga kõvera puhul kasutada ainult ühe korra ja seejuures peavad allesjäänud andmed hõlmama vähemalt kuut kontsentratsiooni, et kemikaali oleks võimalik kõvera alusel õigesti liigitada.

Joonis 2.

## Näide konkureeriva seondumise kõvera kohta enne ja pärast 10 % reegli kasutamist

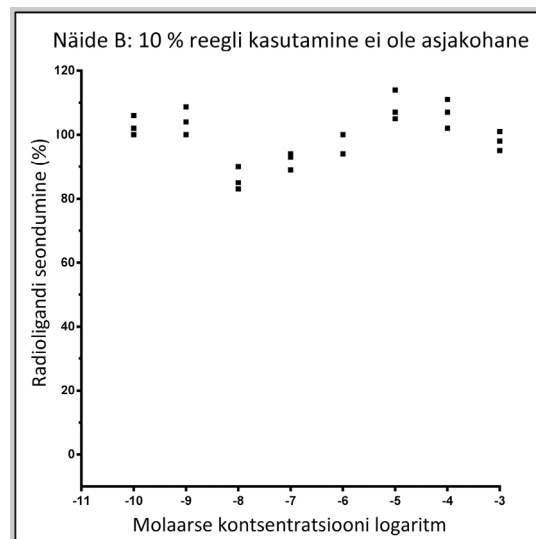
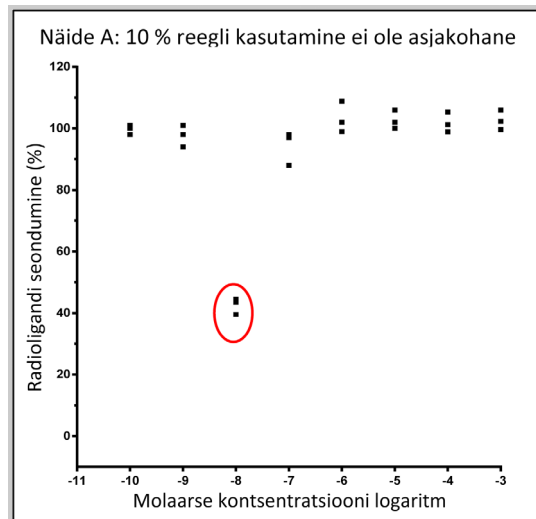


## ▼M8

5. Asjaomaste kõverate korrigeerimisel tuleks 10 % reegli asjakohast kasutamist hoolikalt kaaluda ja kasutada seda üksnes juhul, kui esineb selgeid viiteid selle kohta, et tegemist on hrERiga seonduva ainega. hrERiga seandumisel põhineva FW meetodi kohaste katsete tegemisel valideerimisuringu raames täheldati, et 10 % reegli kasutamisel on mõnikord soovimatu ja ettenägematu tagajärg. Kemikaalide puhul, mis retseptoriga ei interakteeru (st tõelised mitteseonduvad ained), täheldati tasemel, kus radioligandi seondumine oli umbes 100 %, kasutatud kontsentratsioonide lõikes sageli varieeruvust, mis oli suurem kui 10 %. Kui väikseimale täheldatud väärtusele vastas juhtumisi väike kontsentratsioon, oluks võimalik kõik sellest suuremal kontsentratsioonil saadud andmed 10 % reegli alusel analüüsist välja jätta, isegi kui kõnealustest andmetest võinuks olla kasu kemikaali liigitamisel mitteseonduvaks. Joonisel 3 on esitatud näited, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane.

Joonis 3.

Näited konkureeriva seandumise andmete kohta, mille puhul 10 % reegli kasutamine ei ole asjakohane



**▼ M8****Viited**

- (1) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ). Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 226. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) Motulsky, H., ja Christopoulos, A. (2003). The law of mass action. Väljaandes: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego, CA. Lk 187–191. [www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf).
- (3) Laws, S. C., Yavanxay, S., Cooper, R. L., ja Eldridge, J. C. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicol. Sci.* 94(1): 46–56.

▼ **M8**

**B.71. NAHA SENSIBILISEERIMISE *IN VITRO* KATSED, MILLEGA  
UURITAKSE DENDRIITRAKKUDE AKTIVEERIMISEGA SEOTUD  
OLULIST ETAPPI NAHA SENSIBILISEERIMISES SEISNEVA  
KAHJULIKU TOIME RAJAS**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 2.

**▼B****C OSA: KESKKONNAMÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETODID**

## SISUKORD

- C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE
- C.2. *DAPHNIA* SP. LIIKUMISVÕIME AKUUTSE PÄRSSIMISE KATSE
- C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU PIDURDUMISE KATSE
- C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE
- I OSA. ÜLDPÕHIMÕTTED
- II OSA. DOC KÕRVALDAMISE KATSE (meetod C.4-A)
- III OSA. MUUDETUD OECD SÕELKATSE (meetod C.4-B)
- IV OSA. CO<sub>2</sub> ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)
- V OSA. MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE (meetod C.4-D)
- VI OSA. KINNISE PUDELI KATSE (meetod C.4-E)
- VII OSA. MITI KATSE (meetod C.4-F)
- C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE
- C.6. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE
- C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDRO-LÜÜSI SÕLTUVUS pHst
- C.8. TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE – TEHISMULLA TEST
- C.9. BIODEGRADATSIOON – ZAHNI-WELLENSI TEST
- C.10. REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONIKATSE: C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BOKILED
- C.11. AKTIIVMUDA MIKROORGANISMIDE HINGAMISE (SÜSI-NIKU JA AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE) PÄRSSIMISE KATSE
- C.12. BIODEGRADATSIOON – MODIFITSEERITUD SCAS TEST
- C.13. BIOAKUMULEERUMINE KALADES: KOKKUPUUDE VEE JA TOIDU KAUDU
- C.14. NOORKALADE KASVUKATSE
- C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE
- C.16. MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE
- C.17. MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE
- C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII TASAKAALUSTAMISE MEETODIT

**▼B**

- C.19. ADSORPTSIOONITEGURI ( $K_{oc}$ ) KINDLAKSMÄÄRAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL
- C.20. HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE
- C.21. MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE
- C.22. MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE
- C.23. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS
- C.24. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES
- C.25. AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES – BIOLAGUNEMISE MUDELKATSE
- C.26. PEREKONNA *LEMNA* TAIMEDI KASVU PIDURDUMISE KATSE
- C.27. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA
- C.28. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA
- C.29. KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO<sub>2</sub> SULETUD NÕUDES (VABARUUMI KATSE)
- C.30. BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES
- C.31. KATSE MAISMAATAIMEDEGA: TÄRKAMINE JA SEEMIKU KASV
- C.32. VALGELIIMUKLASTE SIGIVUSE KATSE
- C.33. VIHMAUSSIDE (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) SIGIVUSE KATSE
- C.34. ANAEROOBSETE BAKTERITE ELUTEGEVUSE PÄRSSUMISE MÄÄRAMINE – (REOVEE)SETTE KÄÄRIMISEGA KAASNEVA GAASIERITUSE VÄHENEMINE
- C.35. *LUMBRICULUS* ELE AVALDUVA MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE RIKASTATUD SETTEGA SÜSTEEMIS SETE/VEESI
- C.36. RÖÖVLESTA (*HYPOASPIS (GEOLAEELAPS) ACULEIFER*) SIGIVUSE KATSE MULLAS
- C.37. 21-PÄEVANE KATSE KALADEGA: LÜHIAJALINE SÕELKATSE ÖSTROGEENSE JA ANDROGEENSE TOIME NING AROMATAASI INHIBEERIMISE KONTROLLIMISEKS
- C.38. KAHEPAIKSETE METAMORFOOSI KATSE
- C.39. HOOGHÄNNALISTE MULLAS PALJUNEMISE KATSE



**▼B**

- C.40. SURUSÄÄSKLASTE (*CHIRONOMIDAE*) ELUTSÜKLI MÜRGISUSKATSE SÜSTEEMIS, MIS KOOSNEB RIKAS-  
TATUD SETTEST JA VEEST VÕI SETTEST JA RIKAS-  
TATUD VEEST
- C.41. KALADE SUGULISE ARENGU KATSE
- C.42. BIOLAGUNDATAVUS MEREVEES
- C.43. ORGAANILISTE AINETE ANAEROOBNE BIOLAGUNEVUS  
LÄBIKÄÄRINUD MUDAS: MÖÖTMINE GAASI ERALDU-  
MISE JÄRGI
- C.44. LEOSTUMINE MULLAKOLONNIS
- C.45. PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖDELDUD PUIDUST KESK-  
KONDA ERALDUVATE HEITKOGUSTE MÄÄRAMINE.  
LABORATOORNE MEETOD HEITE MÄÄRAMISEKS  
KATMATA PUIDUST, MIS ON KOKKUPUUTES MAGEVEE  
VÕI MEREVEEGA
- C.46. BIOAKUMULATSIOON PÕHJASETETES ELAVATES VÄHE-  
HARJASUSSIDES
- C.47. VARASES ARENGUJÄRGUS KALADELE AVALDUVA  
MÜRGISUSE KATSE
- C.48. LÜHIAJALINE KALADE PALJUNEMISE KATSE
- C.49. ÄGEDA MÜRGISUSE KATSE KALAEMBRÜOTEGA
- C.50. SETTEVABA MÜRGISUSKATSE *MYRIOPHYLLUM SPICATU-  
MIGA*
- C.51. MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE *MYRIOPHYLLUM SPICA-  
TUMIGA* SÜSTEEMIS VESI/SETE
- C.52. ÜHTE PÕLVKONDA HÕLMAV PIKENDATUD SIGIVUS-  
KATSE JAAPANI RIISIKALAGA (MEOGRT)
- C.53. KULLESTE KASVU JA ARENGU KATSE (LAGDA)

**▼B**

**C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE**

**▼M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

**▼B****C.2. DAPHNIA SP. LIIKUMISVÕIME AKUUTSE PÄRSSIMISE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev liikumisvõime akuutse pärssimise katsemeetod vastab suunisele OECD TG 202 (2004).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolevas metoodikas kirjeldatakse akuutse toksilisuse katset keemikaalide toime hindamiseks vesikirpudele. Olemasolevaid katsemeetodeid kasutati võimalikus ulatuses (viited 1, 2, 3).

**1.2. MÕISTED**

Käesoleva metoodika puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

**EC<sub>50</sub>** – kontsentratsioon, mis hinnanguliselt muudab liikumisvõimekuks 50 % vesikirpudest konkreetse kokkupuuteaja vältel. Muu määratluse kasutamisest tuleb teatada ja anda viide.

**Liikumisvõime kaotus** – neid loomi, kes ei ole võimelised ujuma 15 sekundi jooksul pärast katseanuma ettevaatlikku raputamist, loetakse liikumisvõime kaotanuks (isegi kui nad suudavad liigutada oma tundlaid).

**1.3. MEETODI PÕHIMÕTE**

Noored vesikirbud vanuses kuni 24 tundi (katse alguseks) viiakse kokkupuutesse uuritava aine eri kontsentratsioonidega 48 tunniks. Liikumisvõime kaotus registreeritakse 24 ja 48 tunni pärast ja seda võrreldakse kontrollkatse väärtustega. Tulemustest arvutatakse EC<sub>50</sub> 48 tunni pärast (vt punkt 1.2, määratlus). EC<sub>50</sub> kindlaksmääramine pärast 24tunnist kokkupuudet ei ole kohustuslik.

**1.4. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA**

Teada peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ning peaks olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kindlaks aine kogus uuritavas lahuses ja mille kohta on teada määramise saagis ja määramispiir. Kasulik on teada järgmist: struktuurvalem, aine puhtus, püsivus vees või valguse käes, P<sub>OW</sub> ja kiire biolagundatavuse katse tulemused (vt meetod C.4).

Märkus: suunised uuritava aine kohta, mille mõju uurimist raskendavad selle füüsikalised-keemilised omadused, on esitatud viites 4.

**1.5. VÕRDLUSAINED**

EC<sub>50</sub> määramist võrdlusaine jaoks võib pidada vahendiks, millega tõendatakse katsetingimuste usaldusväärsust. Selleks soovitatakse kasutada rahvusvahelistes laboritevahelistes võrdluskatsetes kasutatavaid mürkaineid (viited 1, 5) <sup>(1)</sup>. Katse(d) võrdlusainega tuleb teha eelistatavalt iga kuu, kuid kindlasti vähemalt kaks korda aastas.

<sup>(1)</sup> Kõnealuste laboritevaheliste katsete tulemuste ja standardi ISO 6341 tehnilise paranduse kohaselt asub kaaliumdikromaadi (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 24 tunni EC<sub>50</sub> vahemikus 0,6 mg/l kuni 1,7 mg/l.

**▼ B**

## 1.6. KVALITEEDIKRITERIUMID

Määramise õigsuse tõendamisel kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

- kontrollkatsetes, sealhulgas lahuse valmistamisel kasutatud abiaienega kontrollkatsetes, ei tohiks liikumisvõimet kaotada üle 10 % vesikirpudest;
- lahustunud hapniku kontsentratsioon katse lõpus peab kontrollkatse- ja katseanumates olema  $\geq 3$  mg/l.

Märkus: esimese kriteeriumi puhul ei tohi rohkem kui 10 %-1 vesikirpudest esineda liikumisvõime kaotust või muid haiguse või stressi nähte, näiteks värvuse muutust, ebaharilikku käitumist nagu veepinnale lõksu jäämine.

## 1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.7.1. Seadmed

Katseanumad ja muud seadmed, mis puutuvad kokku katselahustega, peavad täielikult olema valmistatud klaasist või keemiliselt inertsest materjalist. Katseanumateks on tavaliselt klaasist katseklaasid või keeduklaasid, neid tuleb tavaliste laborimeetoditega puhastada enne iga kasutamist. Katseanumad peavad olema vabalt kaetud, et vähendada veekaotust auramise tõttu ja vältida tolmu sattumist lahustesse. Lenduvaid aineid tuleb uurida tihedalt suletud nõudes, mis on piisavalt suured, et hapnikusisaldus ei hakkaks limiteerima ega langeks liiga madalale (vt osa 1.6 ja osa 1.8.3 esimene lõik).

Lisaks kasutatakse veel järgmisi vahendeid: hapnikumõõtja (mikroelektroodi või muu sobiva anduriga, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovis), pH-meeter, temperatuuri reguleerimiseks vajalik seade, seade orgaanilise süsiniku kogusisalduse (TOC) määramiseks, seade keemilise hapnikutarbe (COD) määramiseks, seade vee kareduse määramiseks jne.

## 1.7.2. Katsealune organism

*Daphnia magna* Straus on eelistatud katseliik, kuigi kõnealusel katses võib kasutada ka muid sobivaid *Daphnia* liike (nt *Daphnia pulex*). Katse alguses peavad loomad olema alla 24 tunni vanad ja varieeruvuse vähendamiseks soovitatakse tungivalt, et nad ei oleks esimese haudme järglased. Nad peavad olema terved (st neil ei tohi esineda selliseid stressi tunnuseid nagu suur suremus, isaste ja puhkeolekus munade esinemine, esimese haudme saamise viibimine, loomade värvuse muutus jne). Kõik konkreetsetes katses kasutatavad organismid peavad pärinema vesikirpude sama populatsiooni kultuuridest. Populatsiooni loomi tuleb säilitada katsetingimustega sarnanemises kasvutingimustes (valgus, temperatuur, keskkond). Kui katses kasutatav vesikirpude kasvukeskkond erineb sellest, mida kasutatakse tavalise vesikirpude kultuuri jaoks, on heaks tavaks näha ette katse-eelne aklimatiseerimisperiood. Selleks tuleb haudmevesikirpe hoida lahjendamiseks kasutatavas vees katsetemperatuuril vähemalt 48 tundi enne katse alustamist.

**▼ B****1.7.3. Hoidmisvesi ja lahjendamiseks kasutatav vesi**

Hoidmisveena ja lahjendamiseks kasutatava veena lubatakse kasutada looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett või dekloritud kraanivett, kui vesikirbud jäävad selles ellu kasvatamise, aklimatiseerimise ja katsetamise ajal ega ilmuta stressi tunnuseid. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 1. liites esitatud nõuetekohase lahjendamiseks kasutatava vee keemilistele omadustele. See vesi peab katse vältel olema ühesuguse kvaliteediga. Taastatud vee valmistamiseks lisatakse deioniseeritud või destilleeritud veele täpsed kogused tunnustatud analüütilise puhtusega reaktiive. Viidetes 1 ja 6 ning 2. liites on esitatud taastatud vee näited. Metalle sisaldavate uuritavate ainete puhul tuleks vältida kelaadimoodustajaid sisaldavaid toitesegusid, nagu M4 ja M7 2. liites. pH peaks olema vahemikus 6–9. Karedus peaks *Daphnia Magna* puhul olema vahemikus 140–250 mg/l (CaCO<sub>3</sub>-na); teiste *Daphnia* liikide puhul võib sobida väiksem karedus. Lahjendamiseks kasutatavat vett võib enne katses kasutamist aereerida, et lahustunud hapniku kontsentratsioon jõuaks küllastuseni.

Kui kasutatakse looduslikku vett, tuleb selle kvaliteedi parameetreid mõõta vähemalt kaks korda aastas või kui kahtlustatakse, et need omadused võivad olla oluliselt muutunud (vt eelmist lõiku ja 1. liidet). Samuti tuleb mõõta raskmetallide (st Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) sisaldus. Kui kasutatakse dekloritud kraanivett, on soovitatav iga päev mõõta kloori sisaldust. Kui lahjendamiseks kasutatakse pinna- või põhjavett, tuleb mõõta juhtivus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus (TOC) või keemiline hapnikutarve (COD).

**1.7.4. Katselahused**

Valitud kontsentratsioonidega katselahused saadakse tavaliselt põhilahuse lahjendamisel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada aine lahjendamiseks kasutatavas vees. Võimaluse korral tuleb vältida lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kasutamist. Siiski võivad nimetatud ühendid olla teatud juhtudel vajalikud piisava kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Suunised sobivate lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kohta on esitatud viites 4. Igal juhul ei tohi uuritava aine sisaldus katselahustes olla kõrgem kui lahustuvuse piir lahjendamiseks kasutatavas vees.

Katse tuleb teha ilma pH-d muutmata. Kui pH ei püsi vahemikus 6–9, siis võib teha teise katse, milles põhilahuse pH väärtuseks seatakse lahjendamiseks kasutatava vee pH väärtus enne uuritava aine lisamist. pH tuleb korrigeerida nii, et see ei muudaks oluliselt põhilahuse kontsentratsiooni ega põhjustaks uuritava aine keemilist reaktsiooni ega sadenemist. Eelistatakse HCl ja NaOH lahuseid.

**▼B**

## 1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Kokkupuutetingimused**1.8.1.1. *Katserühmad ja kontrollkatsed*

Katseanumasse viiakse vajalik kogus lahjendamiseks kasutatavat vett ja uuritava aine lahust. Öhu ja vee mahu suhe anumates peab olema katse- ja kontrollrühma puhul ühesugune. Seejärel lisatakse anumatesse vesikirbud. Iga uuritava kontsentratsiooni juures ja ka kontrollkatses tuleb kasutada vähemalt 20 looma, eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks. Iga looma kohta peab olema vähemalt 2 ml uuritavat lahust (st viie vesikirbu kohta peab katseanumas olema 10 ml lahust). Katse tegemisel võib kasutada poolstaatilist uuendamist või läbivoolusüsteemi, kui uuritava aine kontsentratsioon ei ole püsiv.

Lisaks uuritavate lahuste seeriatele tuleb kasutada ühte lahjendamiseks kasutatava vee kontrollseeriat ja vajaduse korral ühte kontrollseeriat, mis sisaldab lahuse valmistamisel kasutatud abiainet.

1.8.1.2. *Uuritavad kontsentratsioonid*

Kui uuritava aine toksilisuse kohta ei ole andmeid, võib lõpliku katse kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramiseks teha eelkatse. Selleks viiakse vesikirbud kokkupuutesse lahustega, mis sisaldavad uuritavat ainet suuresti erinevas kontsentratsioonis. Viit vesikirpu hoitakse uuritava aine teatava kontsentratsiooniga lahuses kuni 48 tundi; korduskatseid ei ole vaja. Kokkupuuteaeg võib olla lühem (nt 24 tundi või vähem), kui vahemiku kindlaksmääramiseks vajalikud andmed saadakse kiiremini.

Tuleb kasutada vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni. Need peavad olema geomeetrilises jadas, mille kordaja on eelistatavalt mitte üle 2.2. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgema uuritava kontsentratsiooni tulemuseks peaks eelistatavalt olema 100 %line liikumisvõime kaotus ja kõige madalamal uuritaval kontsentratsioonil ei peaks eelistatavalt olema jälgitavat toimet.

1.8.1.3. *Inkubatsioonitingimused*

Temperatuur peab olema vahemikus 18–22 °C ja iga üksiku katse puhul peaks see olema konstantne piirides  $\pm 1$  °C. Soovitav on 16tunnise valguse ja kaheksatunnise pimeduse tsükkel. Lubatud on ka täielik pimedus, eriti testitavate ainete puhul, mis on valguse käes ebastabiilsed.

Katseanumaid ei tohi katse ajal aereerida. Katse tehakse ilma pH-d muutmata. Vesikirpe ei tohi katse ajal toita.

1.8.1.4. *Kestus*

Katse kestus on 48 tundi.

1.8.2. **Vaatlused**

Igas katseanumas tuleb 24 ja 48 tundi pärast katse algust määrata liikumisvõime kaotanud vesikirpude arv (vt punkt 1.2 „Mõisted“). Lisaks liikumisvõime kaotusele tuleb registreerida kõik normist kõrvalekaldumised käitumises või välimuses.

**▼B****1.8.3. Analüütilised mõõtmised**

Katse alguses ja lõpus mõõdetakse kontrollkatse(te)s ja kõige kõrgema uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses lahustunud hapniku sisaldus ja pH. Lahustunud hapniku sisaldus kontrollkatsetes peab vastama määramise õigsuse kriteeriumile (vt punkt 1.6). pH ei tohiks tavaliselt muutuda üle 1,5 ühiku üheski katses. Temperatuuri mõõdetakse tavaliselt kontrollkatse anumates või ümbritsevas õhus ja see tuleb kirja panna eelistatavalt pidevalt katse käigus või äärmisel juhul vähemalt katse alguses ja lõpus.

Uuritava aine kontsentratsioon tuleb mõõta vähemalt kõige kõrgemal ja madalamal kontsentratsioonil katse alguses ja lõpus (viide 4). Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui saab tõendada, et uuritava aine kontsentratsioon on katse jooksul rahuldavalt säilinud  $\pm 20\%$  juures nominaalsest või mõõdetud algkontsentratsioonist, võivad katse tulemused põhineda nominaalsetel või mõõdetud algväärtustel.

**1.9. PIIRSISALDUSKATSE**

Käesolevat meetodit kasutades võib teha piirsalduskatse uuritava aine kontsentratsioonil 100 mg/l või katsekeskkonnas lahustuvuse piiril (olenevalt sellest, kumb neist on madalam) ja tõendada nii, et  $EC_{50}$  on kõrgem kui see kontsentratsioon. Piirsalduskatse tegemisel tuleb kasutada 20 vesikirpu (eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks) ja panna sama arv loomi ka kontrollkatse(te)sse. Kui kas või osagi vesikirpudest kaotab liikumisvõime, tuleb sooritada täielik uuring. Iga kõrvalekalle normaalsest käitumisest tuleb registreerida.

**2. ANDMED**

Andmed tuleb esitada kokkuvõtvas tabelis, näidates iga katse- ja kontrollrühma jaoks kasutatud vesikirpude arvu ja liikumisvõime kaotuse igal vaatlemisel. Koostatakse graafik 24 ja 48 tundi pärast liikumisvõime kaotanud vesikirpude protsendi sõltuvuse kohta uuritava aine kontsentratsiooni. Andmeid analüüsitakse sobivate statistiliste meetoditega (nt probit-analüüs jne), et arvutada kõverate tõusud ja  $EC_{50}$  95 %lised usalduspiirid ( $p = 0,05$ ) (7, 8).

Kui saadud andmete puhul ei saa  $EC_{50}$  arvutamise standardmeetodeid rakendada, tuleb  $EC_{50}$  umbkaudseks määramiseks kasutada kõige kõrgemat kontsentratsiooni, mis ei põhjusta liikumisvõime kaotust, ja kõige madalamat kontsentratsiooni, mis põhjustab liikumisvõime kaotuse 100 % (selleks peetakse nende kahe kontsentratsiooni geomeetrilist keskmist).

**3. TULEMUSTE VORMISTAMINE****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuandes esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline laad ja olulised füüsikalis-keemilised omadused;

**▼B**

- andmed keemiliseks identifitseerimiseks, sealhulgas puhtus.

Katseorganismi liik:

- *Daphnia* päritolu ja liik, algne tarnija (kui on teada) ja kasutatud kultuuri tingimused (kaasa arvatud toidu päritolu, tüüp ja kogus, toitmise sagedus).

Katsetingimused:

- katseanumate kirjeldus: anumate tüüp, lahuse kogus, vesikirpude arv katseanuma kohta, katseanumate (korduskatsete) arv kontsentratsiooni kohta;
- põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, kaasa arvatud mis tahes lahustite või dispersantide kasutamine, kasutatud kontsentratsioonid;
- üksikasjad lahjendamiseks kasutatava vee kohta: vee päritolu ja kvaliteediomadused (pH, karedus, Ca/Mg suhe, Na/K suhe, aluselisis, juhtivus jne); taastatud vee koostis, kui seda kasutati;
- inkubatsioonitingimused: temperatuur, valguse intensiivsus ja lahustamise perioodid, lahustunud hapnik, pH jne.

Tulemused:

- kontrollkatsetes ja igas katserühmas mis tahes vaatlusajal liikumisvõime kaotanud või kõrvalekaldeid (kaasa arvatud ebanormaalne käitumine) ilmutanud vesikirpude arv ja protsent ning ilmnenud nähtuste kirjeldus;
- võimaluse korral võrdlusainega tehtud katse tulemused ja kuupäev;
- nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõik tulemused, mis saadi uuritava aine kontsentratsiooni määramisel katseanumas; samuti tuleb teatada määramismeetodi saagis ja määramispiir;
- kõigi katse ajal tehtud füüsikalise-keemiliste mõõtmiste tulemused: temperatuuri, pH ja lahustunud hapniku väärtused;
- EC<sub>50</sub> 48 tunni pärast koos usaldusintervallidega ja graafik sobitatud mudeli kohta, millest need arvutati, annuse ja toime kõverate tõusud ja nende standardviga; EC<sub>50</sub> kindlaksmääramiseks kasutatud statistiline meetod (kui määrati ka liikumisvõime kadu 24 tunni pärast, tuleb esitada ka need andmed);
- selgitused iga kõrvalekalde kohta katse tegemise eeskirjast ja arutelu, kui võrd see võis mõjutada katse tulemusi.

4.

**VIITED**

- 1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.
- 2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.



**▼B**

- 3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- 4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- 5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
- 6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
- 7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC<sub>50</sub>. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp 65-84
- 8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3<sup>rd</sup> ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

**▼B***1. liide***LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA VEE NÕUTAVAD KEEMILISED  
OMADUSED**

Aine	Kontsentratsioon
tahked osakesed	< 20 mg/l
orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
jääkkloor	< 10 µg/l
fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/l
orgaanilise kloori kogusisaldus	< 25 ng/l



## 2. liide

## SOBIVA TAASTATUD KATSEVEE NÄITED

## SO katsevesi (1)

Põhilahused (üks aine)		Taastatud vee valmistamiseks lisada järgmised põhilahuste kogused 1 liitrile veele (*)
Aine	1 liitrile veele lisatav kogus (*)	
kaltsiumkloriid CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	11,76 g	25 ml
magneesiumsulfaat MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4,93 g	25 ml
naatriumvesinikkarbonaat NaHCO <sub>3</sub>	2,59 g	25 ml
kaaliumkloriid KCl	0,23 g	25 ml

(\*) Sobiva puhtusastmega vesi, st puhastatud ionvahetuse, destilleerimise või pöördosmoosiga; vee juhtivus ei ületa eelistatavalt 10 µS/cm<sup>-1</sup>.

## Elendti keskkonnad M7 ja M4

## Aklimatiseerimine Elendti keskkondadega M4 ja M7

Mõnes laboris on olnud raskusi vesikirbu otsesel üleviimisel keskkondadesse M4 ja M7. Teatavat edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimisega oma keskkonnast 30 %lisse, siis 60 %lisse ja seejärel 100 %lisse Elendti keskkonda. Aklimatiseerumisperioodid võivad olla kuu aja pikkused.

## Valmistamine

## Mikroelemendid

Individaalsete mikroelementide põhilahused (I) valmistatakse esmalt sobiva puhtusega vees, st deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosiga puhastatud vees. Nendest põhilahustest (I) valmistatakse järgmine üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000kordne	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	7 210	20 000kordne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000kordne	1,0	0,25

## ▼B

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000kordne	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3 040	20 000kordne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000kordne	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 230	20 000kordne	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	335	20 000kordne	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000kordne	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200	20 000kordne	1,0	1,0
KI	65	20 000kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000kordne	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	5 000	2 000kordne	—	—
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 991	2 000kordne	—	—

Na<sub>2</sub>EDTA ja FeSO<sub>4</sub> lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku autoklaavitakse kohe

Nii saadakse:

2 l Fe-EDTA lahust		1 000kordne	20,0	5,0
--------------------	--	-------------	------	-----

*Keskkonnad M4 ja M7*

Keskkondade M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse II põhilahust, makrotoitaineid ja vitamiine järgmiselt:

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/l)	
			M4	M7
II põhilahus (kombineeritud mikroelemendid)		20kordne	50	50
Makrotoitainete põhilahused (üks aine)				
CaCl <sub>2</sub> – 2H <sub>2</sub> O	293 800	1 000kordne	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	246 600	2 000kordne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000kordne	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> – 9H <sub>2</sub> O	50 000	5 000kordne	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000kordne	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000kordne	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000kordne	0,1	0,1

**▼B**

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/l)	
			M4	M7
Kombineeritud vitamiinide põhilahus	—	10 000kordne	0,1	0,1
Kombineeritud vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmistes kogustes:				
tiamiinvesinikkloriid	750	10 000kordne		
tsüanokobalamiin (B <sub>12</sub> )	10	10 000kordne		
biotiin	7,5	10 000kordne		

Kombineeritud vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena. Vitamiinid lisatakse keskkonnale vahetult enne kasutamist.

NB: Soolade sadenemise vältimiseks lisatakse täieliku keskkonna valmistamisel põhilahuste alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ja seejärel täiendatakse veega kuni 1 liitrini.

NB: Keskkonna M4 koostis avaldati esimest korda järgmises artiklis: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼ **M6****C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU  
PIDURDUMISE KATSE****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 201 (2006, lisa parandatud 2011. aastal). On ilmnenud vajadus laiendada käesolevat katsemeetodit uutele liikidele ning seda ajakohastada, et viia see kooskõlla kemikaalide ohu hindamist ja nende klassifitseerimist käsitlevate nõuetega. Meetodi läbivaatamisel võeti aluseks ulatuslik praktiline kogemus, teaduse areng vetikatele mürgiste kemikaalide uurimise valdkonnas ja meetodi laialdane regulatiivsel eesmärgil kasutamine pärast algse meetodi vastuvõtmist.
2. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

**KATSE PÕHIMÕTE**

3. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju magevee-mikrovetikate ja/või tsüanobakterite kasvule. Eksponentsiaalse kasvu faasis olevatel katseorganismidel lastakse mittepidevas kultuuris puutuda kokku uuritava kemikaaliga tavaliselt 72 tunni jooksul. Vaatamata katse suhteliselt lühikesele kestusele võimaldab see hinnata kemikaali mõju mitmes katseorganismide põlvkonnas.
4. Katse eeldatav tulemus on seeria vetikakultuuride (katseüksused) kasvu pidurdumine kokkupuutel eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga. Katsetulemuste hindamiseks uuritakse kasvu sõltuvust kemikaali kontsentratsioonist ja võrreldakse seda keskmise kasvuga paralleelsetes kontrollkultuurides, kuhu uuritavat kemikaali ei ole lisatud. Et võimaldada mürgise mõju täielikku avaldumist sellises süsteemis (optimaalne tundlikkus), lastakse kultuuridel küllaldase toitainete sisalduse juures ja pideva valguse käes piisava aja jooksul piiramatult eksponentsiaalselt kasvada, et oleks võimalik mõõta kasvu erikiiruse vähenemist.
5. Kasvu ja selle pidurdumise kvantitatiivseks iseloomustamiseks mõõdetakse vetikate biomassi sõltuvust ajast. Vetikate biomassi kogus on määratletud kuivmassina ruumalaühiku kohta, nt milligrammides katselahuse liitri kohta. Kuna kuivmassi on raske mõõta, kasutatakse asendusparameetreid. Kõige sagedamini kasutatakse asendusparameetrina rakkude arvu. Asendusparameetriteks võivad olla ka rakkude summaarne ruumala, fluorestsents, optiline tihedus jne. On vaja teada kordajat, mille abil saab mõõdetava asendusparameetri ümber arvutada biomassiks.
6. Katse lõppnäitaja on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse biomassi koguse logaritmitud väärtuse suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmiste kasvu erikiiruste põhjal tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille puhul kasvukiirus väheneb teatud kindla protsendi  $x$  (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $E_r C_x$  (nt  $E_r C_{50}$ ).
7. Käesoleva meetodi puhul kasutatakse süsteemi vastust iseloomustava muutujana ka saagist, mille määramine võib olla vajalik mõnes riigis kehtivate regulatiivsete erinõuete täitmiseks. Saagis on määratletud kui kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud biomassikoguste vahe. Katselahuste seerias määratud saagiste põhjal arvutatakse kontsentratsioon, mille puhul saagis väheneb teatud kindla protsendi  $x$  (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $E_y C_x$  (nt  $E_y C_{50}$ ).
8. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC).

▼ **M6**

## TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimuste juures, valguse neeldumisega seotud omadused,  $pK_a$  ja andmed kemikaali muundumise kohta, sealhulgas biolagunduvus vees.
10. On vaja teada uuritava kemikaali lahustuvust vees, jaotuskoeffitsienti süsteemis oktaanol/vesi ( $P_{ow}$ ) ja aururõhku, ning kemikaali sisalduse määramiseks katselahuses tuleks kasutada valideeritud meetodit, mille puhul on teada kemikaali tuvastamise tõhusus ja meetodi määramispiir.

## KATSE NÕUETEKOHASUS

11. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised kriteeriumid.
  - Kontrollkultuuri biomass peab 72-tunnise katse kestel olema eksponentsiaalselt suurenenud vähemalt 16 korda. Sellele vastav kasvu erikiirus ööpäevas on 0,92. Kõige sagedamini kasutatavate liikide puhul on kasvukiirus tavaliselt palju suurem (vt 2. liide). See kriteerium ei pea olema täidetud, kui kasutatakse 2. liites loetletud liikidest aeglasemalt kasvavaid liike. Sellisel juhul tuleb katseaega pikendada nii, et kontrollkultuuri biomass kasvaks vähemalt 16 korda, kusjuures kasv peab kogu katse vältel olema eksponentsiaalne. Piiramatult eksponentsiaalse kasvu tagamiseks kogu katse vältel võib katse kestust lühendada, nii et see on minimaalselt 48 tundi, kui selle ajaga saavutatakse biomassi nõutav 16-kordne kasv.
  - Kontrollkultuurides ajavahemike kaupa (72-tunnise katse puhul katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) arvatatud kasvu erikiiruste keskmine variatsioonikordaja (vt 1. liide, mõiste „variatsioonikordaja”) ei tohi olla üle 35 %. Kasvu erikiiruse arvutamist ajavahemike kaupa kirjeldatakse punktis 49. Seda kriteeriumi rakendatakse paralleelsete kontrollkultuuride kohta arvatud keskmise variatsioonikordaja suhtes.
  - Katsetes *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*’ega ei tohi paralleelsete kontrollkultuuride keskmise kasvu erikiiruse variatsioonikordaja olla kogu katse kestel suurem kui 7 %. Harvemini kasutatavate muude liikide puhul ei tohi see väärtus olla üle 10 %.

## VÕRDLUSKEMIKAAL

12. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelises võrdlusuuringus (1) kasutatud võrdluskemikaale, näiteks 3,5-diklorofenooli. Rohevetikate puhul võib võrdluskemikaalina kasutada ka kaaliumdikromaati. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas.

## KATSEMEETODI KASUTATAVUS

13. Käesolev katsemeetod on kõige hõlpsamalt kasutatav vees lahustuvate kemikaalide puhul, mis katsetingimustes tõenäoliselt püsivad vesilahuses. Kui uuritav kemikaal on lenduv, tugevasti adsorbeeruv, värviline või vees raskesti lahustuv või võib mõjutada toit- või mineraalainete kättesaadavust

**▼M6**

söötmes, võib olla vaja teha kirjeldatud katsemeetodis teatavaid muudatusi (nt kasutada suletud süsteemi või valmistada katsenõud eelnevalt ette). Juhendid mõne asjakohase muudatuse tegemiseks on esitatud allikates 2, 3 ja 4.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

14. Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku katselahustega, peaksid olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Seadmed peavad olema hoolikalt pestud, et tagada vetikate kasvu või katselahuste koostist mõjutada võivate orgaaniliste ja anorgaaniliste saasteainete puudumine.
15. Katsenõuna kasutatakse tavaliselt klaaskolbi, mis on piisavalt suur, et katse ajal saaks mõõtmisteks võtta küllaldases mahus kultuuri ja oleks tagatud piisav CO<sub>2</sub> massiülekanne atmosfäärist (vt punkt 30). Tuleb silmas pidada, et vedeliku maht peab olema analüüside tegemiseks piisav (vt punkt 37).
16. Lisaks võib vaja minna järgmisi seadmeid.

— Kultiveerimisvõtte: soovitav on kasutada kappi või kambrit, mis võimaldab hoida inkubatsioonitemperatuuri täpsusega  $\pm 2$  °C.

— Fotomeetrid: on oluline silmas pidada, et valgustiheduse mõõtmise meetod ja eriti anduri (kollektori) tüüp võivad mõjutada mõõdetavat väärtust. Mõõtmiseks soovitatakse kasutada kerakujulist (4  $\pi$ ) andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale otsesele ja peegeldunud valgusele, või poolkerakujulist (2  $\pi$ ) andurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele.

— Seade vetikate biomassi määramiseks. Rakkude arvu, mis on kõige sagedamini kasutatav vetikate biomassi asendusparameeter, võib määrata elektroonilise osakeste loenduriga, mikroskoobi ja loenduskambriga või läbivoolutsütomeetriga. Muid biomassi asendusparameetreid võib mõõta läbivoolutsütomeetri, fluorimeetri, spektrofotomeetri või kolorimeetri abil. On kasulik arvutada kordaja, mille abil saab rakkude arvu teisen-dada kuivmassiks. Spektrofotomeetri kasutamisel võib biomassi väikese kontsentratsiooni juures olla kasutuskõlblike mõõtmistulemuste saamiseks vaja küvette, milles valguse teepikkus on vähemalt 4 cm.

**Katseorganismid**

17. Võib kasutada vabalt ujuvaid mitme liigi mikrovetikaid ja tsüanobaktereid. On tõendatud, et käesoleva meetodi kohane katse käik sobib 2. liites loetletud tüvede puhul.
18. Muu liigi organismide kasutamisel tuleb märkida asjaomane tüvi ja/või organismi päritolu. Tuleb tõendada, et valitud katsevetikate kasv on kohaldatavates tingimustes kogu katse vältel eksponentsiaalne.

**Sööde**

19. Soovitatakse kasutada kas OECD söödet või söödet AAP. Nende söötmete koostis on esitatud 3. liites. Tuleb silmas pidada, et nende söötmete pH algväärtus ja puhverdusvõime (pH tõusu kompenseerimise võime) on erinevad. Seepärast võivad katsetulemused sõltuda kasutatud söötmest, eriti kui uuritav kemikaal võib moodustada ioone.



**▼ M6**

20. Teatavatel juhtudel, näiteks kui uuritakse metalle ja kelaatavaid kemikaale või kui katsed tehakse eri pH väärtuste juures, võib olla vaja söötme koostist muuta. Sellist muudetud söödet tuleks üksikasjalikult kirjeldada ja selle kasutamist põhjendada (3, 4).

**Biomassi algkontsentratsioon**

21. Biomassi algkontsentratsioon peab kõigis katsekultuurides olema sama ja piisavalt väike, et võimaldada eksponentsiaalset kasvu kogu inkubatsiooniaja kestel, ilma et tekiks toitainete ammendumise ohtu. Biomassi algkontsentratsioon kuivmassina ei tohiks olla suurem kui 0,5 mg/l. Soovitatakse kasutada järgmisi rakkude algkontsentratsioone:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \times 10^3 - 10^4$ rakku/ml;
<i>Desmodesmus subspicatus</i> :	$2 - 5 \times 10^3$ rakku/ml;
<i>Navicula pelliculosa</i> :	$10^4$ rakku/ml;
<i>Anabaena flos-aquae</i> :	$10^4$ rakku/ml;
<i>Synechococcus leopoliensis</i> :	$5 \times 10^4 - 10^5$ rakku/ml.

**Uuritava kemikaali kontsentratsioon**

22. Kontsentratsioonivahemiku, mille puhul mõju tõenäoliselt avaldub, võib määratleda sellise vahemiku leidmiseks tehtud katsete tulemuste põhjal. Lõpliku katse tegemisel kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni, mis moodustavad geomeetrilise jada, mille tegur ei ole suurem kui 3,2. Kui uuritava kemikaali mõju sõltuvus kontsentratsioonist on nõrk, võib olla õigustatud suurema teguri kasutamine. Kontsentratsioonide jada peaks eelistatult hõlmama vahemikku, mille puhul vetikate kasvukiirus väheneb 5–75 % võrra.

**Paralleel- ja kontrollkultuurid**

23. Katseplaanis tuleks ette näha kolm paralleelkultuuri iga kasutatava kontsentratsiooni kohta. Kui ei nõuta täheledatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) kindlakstegemist, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse kasutatavate kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab olema vähemalt kolm ja parimal juhul võiks neid olla kaks korda rohkem kui paralleelkultuure iga kasutatava kontsentratsiooni kohta.
24. Uuritava kemikaali kontsentratsioonide määramiseks võib valmistada eraldi katselahuste seeria (vt punktid 36 ja 38).
25. Kui uuritava kemikaali lahustamiseks kasutatakse lahustit, tuleb katseplaanis ette näha täiendavad kontrollkultuurid, mis sisaldavad lahustit samas kontsentratsioonis kui uuritava kemikaaliga kultuurid.

**Inokulum-kultuuri valmistamine**

26. Et võimaldada katsevetikatel kohaneda katsetingimustega ja tagada, et katselahuste inokuleerimisel on vetikad eksponentsiaalse kasvu faasis, valmistatakse 2–4 päeva enne katse algust katsesöötmel põhinev inokulum-kultuur. Vetikate biomassi kogust tuleks kohandada nii, et inokulum-kultuuris oleks enne katse algust ülekaalus eksponentsiaalne kasv. Inokulum-kultuuri inkubeeritakse samades tingimustes kui katsekultuure. Et veenduda, et katses

▼ **M6**

kasutatav tüvi kasvab kultiveerimistingimustes normaalselt, mõõdetakse biomassi suurenemist inokulum-kultuuris. Üks vetikate kultiveerimise meetodi näide on esitatud 4. liites. Rakkude sünkroonse jagunemise ärahoidmiseks katse ajal võib olla vajalik inokulum-kultuuri teistkordne ümberkultivamine.

**Katselahuste valmistamine**

27. Kõigis katselahustes peab söötme kontsentratsioon ja katsevetikate biomassi algkontsentratsioon olema ühesugune. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga katselahused uuritava kemikaali põhilahuse, söötme ja inokulum-kultuuri segamise teel. Põhilahuse saamiseks lahustatakse uuritav kemikaal tavaliselt katsesöötmes.
28. Vees raskesti lahustuvate kemikaalide lisamiseks katsesöötmesse võib kasutada lahusteid, näiteks atsetooni, *t*-butüülalkoholi või dimetüülformamiidi (2, 3). Lisatud lahusti kontsentratsioon ei tohiks olla suurem kui 100 µl/l ja see peaks olema sama kõigis katseseeria kultuurides, sealhulgas kontrollkultuurides.

**Inkubeerimine**

29. Katsenõud suletakse õhku läbi laskvate korkidega. Nõusid loksutatakse ja need asetatakse kultiveerimisseadmesse. Katse ajal on vaja hoida vetikaid suspensioonis ja soodustada CO<sub>2</sub> ülekannet lahusesse. Selleks tuleks kultuure pidevalt loksutada või segada. Kultuure tuleks kasvatada temperatuurivahemikus 21–24 °C ning temperatuuri tuleks hoida täpsusega ± 2 °C. Kui kasutatakse 2. liites loetlemata liike (nt troopilised liigid), võib valida kõrgema temperatuuri, kui see ei takista nõuetele vastavuse kriteeriumide täitmist. Kolvid soovitatakse paigutada inkubaatoris juhuslikult ja muuta iga päev nende paigutust.
30. Katse ajal ei tohiks kontrollsöötme pH tõusta rohkem kui 1,5 ühiku võrra. Kui uuritakse metalle või kemikaale, mis katses kasutatavale pH-le lähedasel pH väärtusel osaliselt ioniseeruvad, võib reprodutseeritavate ja üheselt tõlgendatavate tulemuste saamiseks olla vaja piirata pH muutumise ulatust. Tehniliselt on võimalik saavutada olukord, kus pH muutus on väiksem kui 0,5 ühikut, kui tagatakse piisav CO<sub>2</sub> massiülekanne ümbritsevast õhust katselahusesse, näiteks loksutamiskiiruse suurendamise teel. Teine võimalus on vähendada CO<sub>2</sub> tarvet, vähendades algset biomassi või lühendades katse kestust.
31. Pinda, kus kultuure inkubeeritakse, tuleks valgustada pidevalt ja ühtlaselt luminofoorlambiga, mille valgus on näiteks külmvalge või päevavalguse spektriga. Vetikate ja tsüanobakterite tüvede valgusevajadus on erinev. Valgustustihedus tuleks valida lähtuvalt kasutatavast katseorganismist. Soovitavate rohevetikaliikide puhul valitakse valgustustiheduseks katselahuste tasapinnal 60–120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, mõõdetuna sobiva anduri abil fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm. Mõne liigi, eriti *Anabaena flos-aquae* tsüanobakterid kasvavad hästi väiksema valgustustiheduse juures ja suurem valgustustihedus võib neid kahjustada. Sellise liigi puhul tuleks valida keskmiseks valgustustiheduseks 40–60 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. (Luksides kalibreeritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valgustustiheduse vahemikule 60–120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> vahemik 4 440–8 880 luksit.) Valgustustihedus inkubatsioonipinnal ei tohi hälbida keskmisest valgustustihedusest rohkem kui ± 15 %.

▼ **M6****Katse kestus**

32. Katse kestab tavaliselt 72 tundi. Võib siiski kasutada ka lühema või pikema kestusega katseid tingimusel, et on võimalik täita kõiki punkti 11 kohaseid nõuetele vastavuse kriteeriume.

**Mõõtmised ja analüüsid**

33. Vetikate biomassi igas kolvis määratakse katse ajal vähemalt üks kord ööpäevas. Kui mõõtmiseks kasutatakse katselahusest pipetiga võetud väikesi vedelikukoguseid, ei viida neid enam katselahusesse tagasi.
34. Biomassi mõõdetakse kas mikroskoobi abil rakkude loendamise teel või elektroonilise osakeste loenduriga (määratakse rakkude arv ja/või biomaht). Võib kasutada ka alternatiivmeetodeid, näiteks läbivoolutsütomeetria, klorofüllü fluoresentsi määramist *in vitro* või *in vivo* (5, 6) või optilise tiheduse mõõtmist, kui on võimalik tõendada, et katses esinevas biomassivahemikus on asjaomaste parameetrite ja biomassi vahel piisav korrelatsioon.
35. Lahuste pH-d mõõdetakse katse alguses ja lõpus.
36. Kui on olemas meetod uuritava kemikaali määramiseks katses kasutatavas kontsentratsioonivahemikus, tuleks kontrollida kemikaali algsisaldust katselahuses ja selle sisalduse püsivust katse vältel.
37. Kui kontsentratsiooni muutus katse vältel on eeldatavalt alla 20 % nominaalväärtusest, võib piisata uuritava kemikaali sisalduse määramisest katse alguses ja lõpus ühel väikesel ja ühel suurel kontsentratsioonil ja eeldatavale EC<sub>50</sub>-le lähedal kontsentratsioonil. Kui kontsentratsioon tõenäoliselt ei püsi vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, soovitatakse määrata uuritava kemikaali sisaldus katse alguses ja lõpus igal kasutataval kontsentratsioonil. Kui uuritav kemikaal on lenduv, ebapüsiv või tugevasti adsorbeeruv, soovitatakse katse ajal võtta määramiseks iga 24 tunni järel lisaproove, et paremini jälgida uuritava kemikaali kadu. Selliste kemikaalide puhul võib olla vaja kasutada täiendavaid paralleelkultuure. Kõikidel juhtudel on uuritava kemikaali sisaldust igal kasutataval kontsentratsioonil vaja määrata ainult ühes paralleelkultuuris (või paralleelkultuuridest kokku segatud ühes proovis).
38. Söötmeid, mis on spetsiaalselt valmistatud kokkupuutekontsentratsiooni määramiseks katse ajal, tuleks käidelda täpselt samal viisil kui katses kasutatavaid söötmeid, st need inokuleeritakse vetikatega ja neid inkubeeritakse samades tingimustes. Kui on vaja määrata uuritava lahustunud kemikaali sisaldust, võib olla vaja eraldada söötmest vetikad. Eraldamiseks tuleks eelistatult kasutada tsentrifuugimist väikesel kiirendusel, millest piisab vetikate sadestamiseks.
39. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui  $\pm 20\%$ , võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui  $\pm 20\%$ , tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinevate väärtuste geomeetriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (3, 7).

**▼ M6**

40. Vetikate kasvu pidurdumise katse on dünaamilisem kui enamik muid veeorganismidele avalduva lühiajalise mürgisuse määramise katseid. Seepärast võib tegeliku kokkupuutekontsentratsiooni kindlakstegemine olla raskendatud, eriti kui uuritakse adsorbeeruvat kemikaali väiksel kontsentratsioonil. Sellisel juhul ei tähenda uuritava kemikaali kadu lahusest seoses vetikate suurenevale biomassile adsorbeerumisega, et kemikaal on katsesüsteemist kadunud. Katsetulemuste analüüsimisel tuleks kontrollida, kas uuritava kemikaali sisalduse vähenemisega katse ajal kaasneb kasvu pidurdumise vähenemine. Kui see on nii, võib kaaluda uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldava sobiva mudeli rakendamist (7). Kui kasvu pidurdumine ei vähene, võib olla sobiv võtta tulemuste analüüsimisel aluseks nominaalsisaldus või mõõdetud algsisaldus.

**Muud vaatlused**

41. Inokulum-kultuuri tuleks vaadelda mikroskoobi all, et veenduda, et kultuur näeb välja normaalne ja elujõuline, ning katse lõpus tuleks vetikakultuuri samal viisil uurida morfoloogiliste muutuste tuvastamiseks, mis võivad olla põhjustatud kokkupuutest uuritava kemikaaliga.

**Piirsalduskatse**

42. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesõdmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on väiksem) mürgist mõju, võib teha piirsalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonil. Piirsalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele vastavuse kriteeriume; ainasa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema vähemalt kuus. Kontroll- ja katserühmas mõõdetud muutujate analüüsil võib keskvaärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil. Kui kahe rühma andmete hajuvused on erinevad, tuleks kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Kasvukõverate koostamine**

43. Katsenõus oleva biomassi kogust võib väljendada mõõtmisel kasutatud asendusparameetri (nt rakkude arv, fluorestsents) ühikutes.
44. Katse- ja kontrollkultuurides määratud biomassi ja uuritava kemikaali kontsentratsioonid ning mõõtmise ajad, mis registreeritakse vähemalt täistunni täpsusega, kantakse tabelisse ja nende andmete põhjal koostatakse kasvukõverad. Siin kirjeldatud esimeses etapis võib olla kasulik kasutada nii logaritmilist kui ka lineaarset skaalat, kuid logaritmiline skaala on kohustuslik ja võimaldab katse kestel esinevaid kasvukiiruse muutusi üldjuhul paremini esitada. Tuleb silmas pidada, et logaritmilisel skaalal saadakse eksponentsiaalse kasvu puhul sirge, mille tõus väljendab kasvu erikiirust.
45. Kasvukõverate abil kontrollitakse, kas kontrollkultuurid kasvavad kogu katse jooksul eksponentsiaalselt ja eeldatava kiirusega. Iga andmepunkti ja graafikute kuju hinnatakse kriitiliselt ning veendutakse, et töötlemata andmetes ei ole vigu ja katse on läbi viidud korrektselt. Eelkõige kontrollitakse andmepunkte, mille puhul kõrvalekalle näib tulenevat süstemaatilistest veast. Kui on võimalik tuvastada viga katse läbiviimisel või vea esinemist võib pidada väga tõenäoliseks, tähistatakse asjaomane andmepunkt võrvaärtusena ja jäetakse järgnevast statistilisest analüüsist välja. (Näiteks

▼ **M6**

võib vetikate nullsisaldus ühes kahest või kolmest paralleelnõust osutada sellele, et inokuleerimine ei toimunud selles nõus õigesti või nõu ei olnud korralikult puhastatud.) Katseprotokollis esitatakse selgelt põhjus, miks teatav andmepunkt on võõrväärtusena analüüsist välja jäetud. Vastuvõetavaks põhjuseks loetakse ainult (harva esinevaid) vigu katse läbiviimisel, mitte aga vähest täpsust. Kõnealuse probleemi puhul on statistiliste meetodite kasutusvõimalused võõrväärtuste kindlakstegemiseks piiratud ja need ei asenda eksperdi hinnangut. Katseandmete esitamisel graafikul või tabelis on soovitatav esitada koos teiste andmepunktidega ka võõrväärtustele vastavad (ja sellisena tähistatud) punktid.

**Uuritavad muutujad**

46. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju vetikate kasvule. Kuna eelistused ja regulatiivsed vajadused eri jurisdiktsioonides on erinevad, kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis kahte uuritavat muutujat. Et tagada katsetulemuste vastuvõetavus kõikides jurisdiktsioonides, tuleks vaadeldava mõju hindamisel kasutada mõlemat allpool kirjeldatud muutujat (a ja b).
- a) Keskmine kasvu erikiirus: see uuritav muutuja arvutatakse katse ajal toimunud biomassi juurdekasvu logaritmitud väärtuste alusel ja seda väljendatakse kasvukiirusena ööpäevas.
- b) Saagis: see uuritav muutuja on biomassi koguste vahe katse lõpus ja alguses.
47. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja abil arvatud mürgisuse väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvesse võtta. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad  $EC_x$  väärtused ( $E_r C_x$ ) üldjuhul suuremad kui saagisel põhinevad väärtused ( $E_y C_x$ ), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusest; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse määramine põhineb vetikate üldisel piiramatul eksponentsiaalsel kasvul kultuuris, kusjuures mürgisust hinnatakse kasvukiirusele avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri absoluutsest kasvu erikiirusest, kontsentratsioonist ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõusust ega katse kestusest. Kui uuritav muutuja on aga saagis, sõltuvad tulemused kõikidest eespool nimetatud lisamuutujatest.  $E_y C_x$  väärtus sõltub katses kasutatud vetikaliigi kasvu erikiirusest ja maksimaalsest kasvu erikiirusest, mis võib eri vetikaliikidel ja isegi sama liigi eri tüvedel olla erinev. Seda uuritavat muutujat ei tohiks kasutada, kui võrreldakse vetikaliikide või -tüvede tundlikkust mürgiste kemikaalide suhtes. Ehkki keskmise kasvu erikiiruse kasutamine mürgisuse hindamiseks on teaduslikult paremini põhjendatud, käsitletakse käesolevas katsemeetodis mõnes riigis kehtivate regulatiivsete nõuete järgimise võimaldamiseks ka saagisel põhinevat mürgisuse hindamist.

**Keskmine kasvukiirus**

48. Keskmine kasvu erikiirus teataval ajavahemikul arvutatakse kontrollrühma ja katserühmade iga nõu puhul biomassi juurdekasvu logaritmitud väärtuse põhjal vastavalt järgmisele võrrandile:

▼ **M6**

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

kus

$\mu_{i-j}$  on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul  $i-j$ ,

$X_i$  on biomass ajahetkel  $i$  ja

$X_j$  on biomass ajahetkel  $j$ .

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

49. Arvutatakse keskmine kasvu erikiirus kogu katseaja (tavaliselt päevad 0–3) jooksul, võttes aluseks inokuleerimiseks kasutatud biomassi nominaalväärtuse, mitte mõõdetud algväärtuse, sest tavaliselt saadakse sel viisil täpsem tulemus. Biomassi mõõdetud algsisaldust võib siiski kasutada juhul, kui biomassi mõõtmise seade (nt läbivoolutsütomeeter) võimaldab määrata inokulumi biomassi piisavalt täpselt. Kasvu erikiiruse hindamiseks ajavahemike kaupa arvutatakse see katse vältel iga ööpäeva kohta (katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) ja kontrollitakse, kas kontrollkultuuri kasvukiirus püsib muutumatuna (vt nõuetele vastavuse kriteeriumid punktis 11). Kui kasvu erikiirus esimesel katsepäeval on üldisest keskmisest väärtusest oluliselt väiksem, võib see osutada ootefaasi esinemisele. Kontrollkultuuri ootefaasi saab mini-meerida või praktiliselt kõrvaldada eelkultuuri õige paljundamisega; uuritava kemikaaliga kultuuride puhul aga võib ootefaas osutada taastumisele esialgselt mürgise mõjuga seotud stressist või uuritava kemikaali sisalduse vähenemisele seoses esialgse kokkupuute järgse kemikaali kaoga (muu hulgas vetikate biomassile adsorbeerumise tõttu). Seega võib kasvukiiruse hindamist ajavahemike kaupa kasutada uuritava kemikaali mõju jälgimiseks kokkupuuteaja jooksul. Ajavahemike kaupa arvutatud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse vahelised olulised erinevused osutavad pidevast eksponentsiaalsest kasvust kõrvalekaldumisele ning sel juhul on vaja kasvukõveraid üksikasjalikult uurida.
50. Uuritavat kemikaali sisaldava iga paralleelkultuuri puhul arvutatakse kasvukiiruse pidurdumise määr protsentides järgmise võrrandi abil:

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

kus

$\% I_r$  on keskmise kasvu erikiiruse pidurdumise määr protsentides,

$\mu_c$  on keskmise kasvu erikiiruse ( $\mu$ ) keskvärtus kontrollrühmas ja

$\mu_r$  on keskmine kasvu erikiirus uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris.

51. Kui katselahuste valmistamiseks kasutatakse lahusteid, tuleks pidurdumise määr arvutada lahustit sisaldavate, mitte lahustivabade kontrollkultuuride põhjal.

### Saagis

52. Saagis arvutatakse kontrollrühma ja katserühmade iga nõu kohta, lahutades katse lõpus määratud biomassi kogusest biomassi algkoguse. Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides ( $\% I_y$ ) võib uuritava kemikaali sisaldava iga paralleelkultuuri puhul arvutada järgmiselt:

▼ **M6**

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

kus

$\% I_y$  on saagise vähenemise määr protsentides,

$Y_C$  on keskmine saagis kontrollrühmas ja

$Y_T$  on saagis uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris.

### Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera koostamine

53. Koostatakse graafik, mis väljendab kasvukiiruse pidurdumise või saagise vähenemise protsentuaalse määra sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest; graafikut uuritakse üksikasjalikult, jättes kõrvale kõik esimeses etapis väärtustena välja jäetud andmepunktid. Läbi punktide tõmmatakse käsitsi või arvutipõhise interpoleerimise abil sujuv kõver, mis annab esmapildi kontsentratsiooni ja mõju vahelisest seosest, ning seejärel rakendatakse üksikasjalikumalt lähenemisviisi, soovitatavalt mõnda arvutipõhist statistilist meetodit. Olenevalt andmete kasutusotstarbest, kvaliteedist (täpsusest) ja hulgast ning andmeanalüüsi meetodite kättesaadavusest võidakse andmete analüüsimine sellega lõpetada (teatavatel juhtudel on see õigustatud) ja lugeda silma järgi koostatud kõveralt kõige olulisemad näitajad  $EC_{50}$  ja  $EC_{10}$  (ja/või  $EC_{20}$ ) (vt ka stimuleerivat mõju käsitlev punkt allpool). Mõjuvad põhjused statistiliste meetodite kasutamisest loobumiseks võivad olla näiteks järgmised:

— andmed ei võimalda saada arvutipõhiste meetoditega usaldusväärsemaid tulemusi kui eksperdi hinnangu alusel saadud tulemused – sellisel juhul ei pruugi mõned arvutiprogrammid üldse anda usaldusväärseid lahendeid (iteratsioonid ei pruugi koonduda jne);

— olemasolevad arvutiprogrammid ei võimalda piisavalt hästi hinnata stimuleerivat mõju kasvule (vt allpool).

### Statistilised meetodid

54. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli jaotuse kujule (8), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (8). Tuleks silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsi-meetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleb kasvu- või biomassandmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetseid meetodeid  $EC_x$  väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud allikates 9, 10 ja 11. Mittelineaarse regressiooni kasutamist on üksikasjalikult käsitletud 5. liites.

55. Kummagi uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal  $EC_x$  hinnangulised väärtused. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskvaartusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud

▼ **M6**

väärtusi. Kui andmete suure hajuvuse tõttu on kõvera mittelineaarne lähendamine raske või võimatu, võib probleemi lahendamiseks kasutada regressioonanalüüsi puhul siiski rühmade keskvärtusi – selle praktilise lähenemisviisiga vähendatakse eeldatavate võõrväärtuste mõju. Sellise võimaluse kasutamise korral tuleks katseprotokollis lisada märkus, et tavapärasest analüüsimetodist kalduti kõrvale, kuna iga üksiku paralleelkultuuri andmetest lähtuv kõvera lähendamine ei andnud head tulemust.

56. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib  $EC_{50}$  hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (13).
57. Et teha kasvukiiruse puhul kindlaks uuritava kemikaali vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja selle alusel ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC), on vaja võrrelda katserühmade keskvärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskvärtust võrreldakse seejärel kontrollrühmas saadud keskvärtusega, kasutades sobivat mitmese võrdluse või trenditesti meetodit. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (12, 14, 15, 16, 17). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (17), näiteks Levene'i või Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamisega. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuvii sililise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised NOEC väärtuse määramiseks on esitatud allikas 11.
58. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda NOEC väärtuse mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga  $EC_x$ . Kõnealuse vetikatega tehtava katse jaoks ei ole sobivat  $x$  väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii  $EC_{10}$  kui ka  $EC_{20}$ .

**Stimuleeriv mõju kasvule**

59. Mõnikord täheldatakse väikestel kontsentratsioonidel stimuleerivat mõju kasvule (negatiivne pidurdumine). Selle põhjuseks võib olla hormees (mürgise kemikaali stimuleeriv mõju) või kasutatavasse minimaalsöötmesse stimuleeriva kasvufaktori lisamine koos uuritava kemikaaliga. Tuleb silmas pidada, et anorgaaniliste toitainete lisamine ei tohiks avaldada otsest mõju, sest katesöötmes peaks kogu katse vältel olema tagatud toitainete liig. Tavaliselt võib  $EC_{50}$  arvutamisel väikeste koguste stimuleeriva mõju arvestamata jätta, kui see mõju ei ole väga suur. Kui stimuleeriv mõju on väga suur või on vaja leida  $EC_x$ , mille puhul  $x$  väärtus on väike, võib olla vaja kasutada erimeetodeid. Võimaluse korral tuleks hoiduda stimuleerivat mõju kajastavate tulemuste väljajätmisest andmeanalüüsil; kui olemasolev kõvera lähendamise tarkvara ei võimalda nõrka stimuleerivat mõju arvesse võtta, võib kasutada lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega. Kui stimuleeriv mõju on väga tugev, võib kaaluda hormeesimudeli kasutamist (18).

**Kasvu pidurdumine muul põhjusel kui mürgisus**

60. Valgust neelavad uuritavad kemikaalid võivad vähendada kasvukiirust kättesaadava valgushulga vähendamise kaudu. Seda tüüpi füüsikalist mõju tuleks katsetingimuste muutmisega mürgisest mõjust lahus hoida ja eraldi kirjeldata. Asjaomased juhised on esitatud allikates 2 ja 3.

**KATSEPROTOKOLL**

61. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.



**▼ M6***Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline iseloomustus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, sealhulgas vees lahustuvuse piirkontsentratsioon;
- kemikaali identifitseerimisandmed (nt CASi number) ja puhtus (lisandid).

*Katseliik:*

- tüvi, tarnija või päritolu ja kasutatud kultiveerimistingimused.

*Katsetingimused:*

- katse alustamise kuupäev ja kestus;
- katseplaani kirjeldus: katsenõud, kultuuride maht, biomassi tihedus katse alguses;
- söötme koostis;
- kasutatud kontsentratsioonid ja paralleelkultuurid (paralleelkultuuride arv, kasutatud kontsentratsioonide arv ja geomeetriselise jada tegur);
- katselahuste valmistamise, sealhulgas lahustite jms kasutamise kirjeldus;
- kultiveerimisseade;
- valgustustihedus ja valguse kvaliteet (valgusallikas, valguse ühtlus);
- temperatuur;
- kasutatud kontsentratsioonid: nominaalne sisaldus ja katsenõudes oleva uuritava kemikaali sisalduse määramise tulemused; tuleks märkida asjaomase meetodi tõhusus kemikaali tuvastamisel ja meetodi määramispiir katselahuses;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist;
- biomassi määramise meetod ning tõendid mõõdetava parameetri ja kuivmassi vahelise korrelatsiooni kohta.

*Tulemused:*

- pH väärtused katse alguses ja lõpus igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil;
- biomass igas kolvis igas ajapunktis ning biomassi mõõtmise meetod;
- kasvukõverad (biomassi ajas muutumise graafikud);
- uuritavate muutujate arvatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskvaartused ja variatsioonikordajad;
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;

▼ **M6**

- uuritavate muutujate kaudu määratud mürgisuse näitajad – nt  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral LOEC ja NOEC ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);
- katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;
- mis tahes muu täheldatud mõju, nt vetikate morfoloogilised muutused;
- tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

## KIRJANDUS

- (1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1998). ISO/DIS 14442: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1998). ISO 5667-16: Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R., ja Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res.* 31: 2525–2531.
- (6) Slovencey, R. E., ja Hanna, P. J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll. *Limnol. Oceanogr.* 22: 919–925.
- (7) Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L., ja Batley, G. E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073–2079.
- (8) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 19: 713–718.
- (9) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., ja Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157–167.
- (10) Bruce, R. D., ja 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

**▼M6**

- (12) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. 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. USA Keskkonnakaitseamet, 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., ja Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, teine väljaanne. Wiley, New York.
- (18) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29: 93–96.

▼ **M6***1. liide***Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

**Biomass** – populatsiooni elusaine kuivmass ruumalaühiku kohta, nt vetikate kuivmass milligrammides katselahuse liitri kohta. Tavaliselt tähendab „biomass” massi, kuid käesoleva katsemeetodi tähenduses on see mass ruumalaühiku kohta. Kuna käesoleva meetodi puhul mõõdetakse tavaliselt biomassi asendusparameetreid, näiteks rakkude arvu, fluorestsentsi vms, tähistatakse mõistega „biomass” ka kõnealuseid asendusparameetreid.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Variatsioonikordaja** – mõõtühikuta suurus, mis iseloomustab asjaomase parameetri varieeruvust ning on määratletud standardhälbe ja keskvärtuse suhtarvuna. Seda võib väljendada ka protsentides. Paralleelsete kontrollkultuuride keskmise kasvu erikiiruse keskmine variatsioonikordaja tuleks arvutada järgmiselt:

1. ajavahemike kaupa, st iga ööpäeva kohta arvatud kasvukiiruste põhjal leitakse asjaomase paralleelkultuuri keskmise kasvu erikiiruse variatsioonikordaja protsentides;
2. paralleelsete kontrollkultuuride puhul iga ajavahemiku ehk ööpäeva kohta arvatud keskmise kasvu erikiiruse keskmise variatsioonikordaja leidmiseks arvutatakse eelmise punkti kohaselt leitud väärtuste keskmine.

**EC<sub>x</sub>** – katsesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul katseorganismi kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E<sub>r</sub>C” ja saagise puhul tähist „E<sub>y</sub>C”.

**Sööde** – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsevetikaid kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

**Kasvukiirus** (keskmine kasvu erikiirus) – biomassi logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul.

**Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon** (LOEC) – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon** (NOEC) – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool LOEC väärtust.

**Uuritav muutuja** – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on tuletatud biomassi kirjeldava mõõdetud parameetri põhjal vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi tähenduses on uuritavateks muutujateks kasvukiirus ja saagis, mis tuletatakse biomassi otsesel või asendusparameetrite kaudu mõõtmisel saadud andmete põhjal.

▼ **M6**

**Kasvu erikiirus** – uuritav muutuja, mis on määratletud kui jälgitava parameetri (käesoleva katsemeetodi puhul biomass) väärtuste naturaallõgaritmide vahe ja asjaomase ajavahemiku jagatis.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Saagis** – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mis väljendab biomassi suurenemist katse vältel.

▼ **M6**

## 2. liide

**Tüved, mille sobivus käesoleva katsemeetodi puhul on tõendatud****Rohevetikad**

*Pseudokirchneriella subcapitata* (varasem liiginimi *Selenastrum capricornutum*),  
ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

*Desmodesmus subspicatus* (endine liiginimi *Scenedesmus subspicatus*), 86.81  
SAG

**Ränivetikad**

*Navicula pelliculosa*, UTEX 664

**Tsüanobakterid**

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

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

**Tüvekollektsioonid**

Soovitavad tüved on kättesaadavad ühest isendist saadud vetikakultuurina järgmistest kollektsioonidest (tähestikulises järjestuses):

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

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

SAG: Sammlung von Algenkulturen  
Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften  
Universität Göttingen  
Nikolausberger Weg 18  
D-37073 Göttingen  
SAKSAMAA

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

▼ **M6****Soovitavate liikide organismide kuju ja omadused**

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Kuju	Kõverduvad krüvitud eraldi rakud	Ovaalsed enamasti eraldi rakud	Kepikujulised rakud	Ovaalsete rakkude ahelad	Kepikujulised rakud
Mõõtmed (pikkus × läbimõõt), µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Raku ruumala (µm <sup>3</sup> /rakk)	40–60 <sup>(1)</sup>	60–80 <sup>(1)</sup>	40–50 <sup>(1)</sup>	30–40 <sup>(1)</sup>	2,5 <sup>(2)</sup>
Raku kuivmass (mg/rakk)	2–3 × 10 <sup>-8</sup>	3–4 × 10 <sup>-8</sup>	3–4 × 10 <sup>-8</sup>	1–2 × 10 <sup>-8</sup>	2–3 × 10 <sup>-9</sup>
Kasvukiirus <sup>(3)</sup> (ööpäevas)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0– 2,4

<sup>(1)</sup> Määratud elektroonilise osakeste loenduri abil.

<sup>(2)</sup> Arvutatud mõõtmete alusel.

<sup>(3)</sup> Kõige sagedamini täheldatav kasvukiirus OECD söötmes valgustustihedusel umbes 70 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ja temperatuuril 21 °C.

**Konkreetsed soovitused soovitavate katseliikide kultiveerimiseks ja käitlemiseks*****Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus***

Nende rohevetikate säilitamine mitmesugustes söötmetes on üldjuhul hõlbus. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektioonidest. Rakud on tavaliselt üksteisest eraldi ja nende kontsentratsiooni on kerge määrata elektroonilise osakeste loenduri või mikroskoobi abil.

***Anabaena flos-aquae***

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Kultuuri uuendamisel on eriti tähtis ära hoida mittepideva kultuuri kasvu väljumist logaritmilisest faasist, sest kultuuri taastamine on sellisel juhul raske.

*Anabaena flos-aquae* kokkukeerdunud rakuahelad moodustavad kogumikke. Nende rakkogumike suurus võib olenevalt kultiveerimistingimustest olla erinev. Kui biomassi määramiseks kasutatakse loendamist mikroskoobi abil või elektroonilist osakeste loendurit, võib olla vaja need kogumikud lõhkuda.

Rakuahelate lõhkumiseks võib osaproove töödelda ultraheliga, et vähendada loendamistulemuste varieeruvust. Kui osaproove töödeldakse ultraheliga kauem, kui on vaja rakuahelate lõhkumiseks väiksema pikkusega juppideks, võivad rakud hävida. Ultraheliga töötlemise intensiivsus ja kestus peab olema kõigi proovide puhul ühesugune.

Tulemuste varieeruvuse vähendamiseks hemotsütomeetriga loendamisel kasutatakse piisaval arvul väljasid (loendatakse vähemalt 400 raku). See muudab rakkude kontsentratsiooni mikroskoobiga määramise usaldusväärsemaks.

Pärast hoolika ultrahelitöötlemise abil rakuahelate lõhkumist võib *Anabaena* rakkude üldmahu määramiseks kasutada elektroonilist osakeste loendurit. Ultraheli energia tuleb reguleerida tasemele, mille puhul rakud jäävad terveks.

Katsenõude inokuleerimiseks kasutatava vetikasuspensiooni korralikuks läbisegamiseks ja homogeensuse tagamiseks kasutatakse keerissegistit või muud sobivat meetodit.

**▼ M6**

Katsenõud tuleks paigutada orbitaal- või võnkloksuti plaadile ja loksutada neid kiirusel umbes 150 pööret minutis. *Anabaena* rakukogumike moodustumist võib takistada ka perioodilise loksutamise. Kui rakukogumikud siiski tekivad, tuleb jälgida, et biomassi mõõtmiseks võetavad proovid oleksid representatiivsed. Vetikakogumike lõhkumiseks võib olla vaja kultuuri enne proovivõtmist tugevalt loksutada.

***Synechococcus leopoliensis***

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektsioonidest.

*Synechococcus leopoliensis* kasvab eraldi kepikujuliste rakkudena. Rakud on väga väikesed ning see raskendab biomassi mõõtmist rakkude mikroskoobi abil loendamise teel. Võib kasutada sellist elektroonilist osakeste loendurit, mis võimaldab loendada osakesi, mille väikseim läbimõõt on 1 µm. Võib kasutada ka fluori-meetrilist mõõtmist *in vitro*.

***Navicula pelliculosa***

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada eri söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta saab vetikakultuuride kollektsioonidest. Tuleb silmas pidada, et sööde peab sisaldama silikaati.

*Navicula pelliculosa* võib teatavates kasvutingimustes moodustada rakukogumikke. Lipiidide sünteesi tõttu võivad vetikarakud mõnikord koguneda pindki-lesse. Sel juhul tuleb biomassi määramiseks vajalike osaproovide võtmisel rakendada erimeetmeid, et tagada proovide representatiivsus. Kultuuri võib olla vaja tugevalt segada, kasutades näiteks keerissegistit.



▼ **M6**

## 3. liide

**Söötmed**

Võib kasutada ühte järgmistest söötmetest.

— OECD sööde: OECD katsejuhendile nr 201 vastav originaalsööde, vastab ka standardile ISO 8692.

— USA Keskkonnakaitseameti sööde AAP, vastab ka USA Materjalide Katsetamise Ühingu standardile.

Nende söötmete valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtsastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

**Söötme AAP (USA Keskkonnakaitseamet) ja OECD katsejuhendi nr 201 kohase söötme koostis**

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

EDTA ja raua moolisuhe on veidi suurem kui 1. See hoiab ära raua sadestumise ning samal ajal on kelaatide moodustumine raskmetallide ioonidega minimeeritud.

Kui katses kasutatakse ränivetikat *Navicula pelliculosa*, lisatakse kummalegi söötmele ainet Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O kontsentratsioonini 1,4 mg Si/l.

**▼ M6**

Söötme nõutav pH saavutatakse, kui söötme karbonaatsüsteem on tasakaalus CO<sub>2</sub> osarõhuga atmosfääriõhus. Temperatuuril 25 °C on pH väärtuse ja vesinikkarbonaadi molaarse kontsentratsiooni vaheline ligikaudne seos järgmine:

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

NaHCO<sub>3</sub> kontsentratsioonil 15 mg/l on pH<sub>eq</sub> 7,5 (sööde AAP) ja NaHCO<sub>3</sub> kontsentratsioonil 50 mg/l on pH<sub>eq</sub> 8,1 (OECD sööde).

**Elementide sisaldus katsesöötmes**

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

**OECD söötme valmistamine**

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
Põhilahus 1: makrotoitained	
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,2 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,8 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g/l
Põhilahus 2: raud	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	64 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100 mg/l
Põhilahus 3: mikrotoitained	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg/l
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	415 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg/l

▼ **M6**

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Põhilahus 4: vesinikkarbonaat	
$\text{NaHCO}_3$	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Põhilahused steriliseeritakse membraanfiltrimise (keskmine poori läbimõõt 0,2 µm) või autoklaavimise (120 °C, 15 min) teel. Lahuseid hoitakse valguse eest kaitstult 4 °C juures.

Põhilahuseid 2 ja 4 ei autoklaavita, vaid need steriliseeritakse membraanfiltrimise teel.

Söötme valmistamiseks lisatakse veele vajalikus mahus põhilahuseid 1–4.

500 ml steriliseeritud veele lisatakse:

10 ml põhilahust 1;

1 ml põhilahust 2;

1 ml põhilahust 3;

1 ml põhilahust 4.

Lahuse ruumala viiakse steriliseeritud veega 1 000 milliliitriini.

Lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et sööde saavutaks tasakaalu atmosfääris oleva süsihappegaasiga; vajaduse korral barboteeritakse filtritud steriilset õhku mõne tunni jooksul läbi lahuse.

#### Söötme AAP valmistamine

1. Umbes 900 milliliitri deioniseeritud või destilleeritud veele lisatakse 1 ml iga põhilahust 2.1–2.7 ja saadud lahuse ruumala viiakse 1 liitriini.
2. Makrotoitainete põhilahuse valmistamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid. Reaktiividest 2.1, 2.2, 2.3 ja 2.4 võib valmistada ühe kombineeritud põhilahuse.

2.1.	$\text{NaNO}_3$	12,750 g.
2.2.	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,082 g.
2.3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g.
2.4.	Mikrotoitainete põhilahus (vt punkt 3).	
2.5.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6.	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,522 g.
2.7.	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	7,500 g.
2.8.	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	vt märkus 1.

**▼M6**

*Märkus 1:* kasutatakse ainult katsetes ränivetikaliikidega. Võib lisada söötmesse otse (202,4 mg) või põhilahuse kujul, et saavutada söötmes räni lõppkontsentratsioon 20 mg/l.

3. Mikrotoitainete põhilahuse saamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid.

3.1.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	92,760 mg.
3.2.	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	207,690 mg.
3.3.	ZnCl <sub>2</sub>	1,635 mg.
3.4.	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	79,880 mg.
3.5.	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,714 mg.
3.6.	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,006 mg.
3.7.	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,630 mg.
3.8.	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	150,000 mg [dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat].
3.9.	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005 mg (vt märkus 2).

*Märkus 2:* kasutatakse ainult ränivetikaliikide tüvikultuuride jaoks ette nähtud söötmetes.

4. pH reguleeritakse 0,1 N või 1,0 N NaOH või HCl lahusega väärtusele 7,5 ± 0,1.
5. Sööde filtritakse steriilsesse nõusse läbi membraanfiltrit, mille poori läbimõõt on 0,22 µm (kui kasutatakse osakeste loendurit) või 0,45 µm (kui osakeste loendurit ei kasutata).
6. Söödet hoitakse kuni kasutamiseni valguse eest kaitstult 4 °C juures.

**▼ M6**

## 4. liide

**Vetikate kultiveerimise meetodi näide****Üldised märkused**

Allpool kirjeldatud meetodit kasutatakse vetikate kultiveerimiseks mürgisuse määramise katsete jaoks.

Rakendatakse sobivaid meetmeid, et hoida ära vetikakultuuride nakatumine bakteritega. Tuleks eelistada puhaskultuuri; kasutatav vetikakultuur tuleb aga kindlasti saada ühestainsast organismist.

Teiste vetikate ja bakteritega saastumise ärahoidmiseks töötatakse steriilsetes tingimustes.

**Seadmed ja materjalid**

Vt jaotise „Katsemeetodi kirjeldus” alljaotist „Seadmed”.

**Vetikakultuuride saamise meetodid***Toitelahuste (söötmete) valmistamine*

Kõikidest söötmes kasutatavatest toitesooladest valmistatakse kontsentreeritud põhilahused, mida hoitakse jahedas ja valguse eest kaitstult. Need lahused steriliseeritakse filtrimise või autoklaavimise teel.

Söötme valmistamiseks lisatakse steriilsele destilleeritud veele vajalik kogus põhilahust, jälgides, et lahusesse ei satuks nakatumist põhjustavaid organisme. Tahke söötme saamiseks lisatakse 0,8 % agarit.

*Tüvikultuur*

Tüvikultuur on väikesemahuline vetikakultuur, mida kantakse korrapäraselt üle värskesse söötmesse ja kasutatakse katse algmaterjalina. Kui tüvikultuuri regulaarselt ei kasutata, külvatakse see viirgudena katseklaasidesse längagarile. Vähe- malt kord kahe kuu jooksul kantakse kultuur üle uuele söötmele.

Tüvikultuuri kasvatatakse sobivat söödett sisaldavates koonilistes kolbides mahuga umbes 100 ml. Vetikate inkubeerimisel 20 °C juures pideva valgustuse tingimustes tuleb kultuur igal nädalal värskesse söötmesse üle kanda.

Selleks viiakse teatav kogus vana kultuuri steriilse pipetiga üle värskesse söötme kolbi nii, et kiirelt kasvava liigi puhul oleks vetikate algsisaldus umbes 100 korda väiksem kui vanas kultuuris.

Asjaomase liigi kasvukiiruse võib määrata kasvukõvera alusel. Kui see on teada, on võimalik hinnata, millise tiheduse juures tuleks kultuur üle viia uude söötmesse. Kultuur tuleb üle kanda enne, kui see jõuab suremisfaasi.

*Eelkultuur*

Eelkultuur on ette nähtud sellise vetikakoguse saamiseks, mis on piisav katse- nõude inokuleerimiseks. Eelkultuuri inkubeeritakse asjaomastes katsetingimustes ja kasutatakse siis, kui see on veel eksponentsiaalse kasvu faasis, tavaliselt pärast 2–4 päeva kestnud inkubeerimist. Kui vetikakultuur sisaldab moondunud või ebanormaalse väljanägemisega rakke, tuleb see kõrvaldada.

▼ **M6**

## 5. liide

**Mittelineaarsel regressioonil põhinev andmeanalüüs****Üldkaalutlused**

Vetikate ja muude mikroorganismide kasvu katsetes on uuritav muutuja biomassi kasv, mis on oma olemuselt pidev mõõdetav muutuja ja mis väljendub protsessi kiiruses, kui vaadeldakse kasvukiirust, või selle ajaintegraalis, kui vaadeldakse saagist. Kumbagi uuritavat muutujat võrreldakse vastava muutuja keskmise väärtusega paralleelsetes uuritava kemikaalita kontrollkultuurides, kus asjaomane muutuja omandab kohaldatavates tingimustes – vetikakatses puhul on peamised kasvu mõjutavad tegurid valgus ja temperatuur – maksimaalse väärtuse. Tegemist on hajus- või homogeense süsteemiga, mille biomassi võib käsitada pideva suurusena, arvestamata iga üksikut rakku. Sellises süsteemis sõltub uuritava muutuja jaotuse hajuvus üksnes katsetingimustest (tavaliselt on vea jaotus loognormaalne või normaalne). See olukord on teistsugune kui tavapäraste binaarse muutujaga biokatsete puhul, kus hajuvuse peamise komponendina käsitatakse sageli iga üksiku organismi taluvust ja mille andmed on tavaliselt binoomjaotusega. Käesoleval juhul on null- ehk taustase uuritava muutuja väärtus kontrollrühmas.

Lihtsal juhul kahaneb uuritava muutuja normaliseeritud ehk suhteline väärtus  $r$  monotoonselt, vähenedes väärtuselt 1 (pidurdumine puudub) väärtuseni 0 (täielik pidurdumine). Tuleb silmas pidada, et uuritava muutuja mõõtmine on alati seotud veaga ning arvatud näiline negatiivne pidurdumine saab tuleneda üksnes juhuslikust veast.

**Regressioonanalüüs***Mudelid*

Regressioonanalüüsi eesmärk on kirjeldada kvantitatiivselt kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverat matemaatilise regressioonifunktsiooni  $Y = f(C)$  kujul või sagedamini funktsioonina  $Y = F(Z)$ , kus  $Z = \log C$ . Pöördfunktsioon  $C = f^{-1}(Y)$  võimaldab arvutada  $EC_x$  väärtused, sealhulgas  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$  ja  $EC_{20}$ , ning nende usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Vetikate kasvu pidurdumise katsetes on kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kirjeldamisel edukalt kasutatud mitut lihtsat matemaatilist funktsiooni. Sellised funktsioonid on näiteks logistiline võrrand, mittersümmeetriline Weibulli võrrand ja loognormaalse jaotuse funktsioon, mis kõik kujutavad endast sigmoidikõveraid ning lähenevad asümptootiliselt nullile, kui  $C \rightarrow 0$ , ja ühele, kui  $C \rightarrow \infty$ .

Viimasel ajal on asümptootiliste mudelite alternatiivina välja pakutud pideva lävivõrdfunktsiooni mudelid (nt Kooijmani mudel populatsiooni kasvu pidurdumise kirjeldamiseks; Kooijman *et al.*, 1996). Kooijmani mudeli puhul eeldatakse, et teatavast kontsentratsiooni läviväärtusest  $EC_{0+}$  allpool uuritav mõju puudub; selle läviväärtuse leidmiseks ekstrapoleeritakse kontsentratsiooni ja mõju sõltuvuse kõverat kuni lõikumiseni kontsentratsiooniteljega, kasutades lihtsat pidevat funktsiooni, mis ei ole algpunktis diferentseeruv.

Analüüs võib seisneda lihtsalt hälvete ruutude summa minimeerimises (kui eeldatakse, et hajuvus on ühtlane) või kaalutud hälvete ruutude summa minimeerimises (hajuvuse heterogeensuse kompenseerimise puhul).

*Analüüsi käik*

Analüüsi käiku võib kirjeldada järgmiselt. Valitakse sobiv funktsioon  $Y = f(C)$  ja lähendatakse see katseandmete mittelineaarse regressiooni teel. Et saada katseandmete alusel võimalikult palju teavet, soovitatakse paralleelkultuuride keskmiste väärtuste asemel kasutada iga üksiku kolvi kohta saadud mõõteväärtusi. Praktilisest

▼ **M6**

kogemusest nähtub siiski, et kui hajuvus on suur, võib paralleelkultuuride keskmise väärtuse kasutamisel saada usaldusväärsema, katseandmetes esinevatest süstemaatilistest vigadest vähem mõjutatud matemaatilise hinnangu kui iga üksiku andmepunkti kasutamisel.

Lähendatud kõver ja mõõteandmed kantakse graafikule ning kontrollitakse kõvera sobivust andmetega. Selleks võib olla eriti kasulik rakendada hälvete analüüsi. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse väljendamiseks valitud funktsionaalne seos ei kirjelda hästi kogu kõverat või mõnda selle olulist osa, nt kemikaali mõju väikestel kontsentratsioonidel, valitakse lähendamiseks mõni muu kõver – näiteks võib sümmeetrilise kõvera asemel valida mittedünaamilise kõvera, mis vastab näiteks Weibulli funktsioonile. Kasvu negatiivne pidurdumine võib näiteks lognormaalse jaotuse funktsiooni korral probleeme tekitada ning ka sel juhul tuleb kasutada mõnda alternatiivset regressioonifunktsiooni. Selliste negatiivsetele väärtustele ei soovitata omistada nullväärtust või väikest positiivset väärtust, kuna sellega moonutatakse vigade jaotust. Kõvera teatud lõikudes – näiteks kasvu vähese pidurdumise lõigus – võib olla vaja kasutada eraldi lähendust  $EC_x$  leidmiseks väikestel  $x$  väärtustel. Lähendatud võrrandi ja pöördfunktsiooni  $C = f^{-1}(Y)$  abil arvutatakse mõju iseloomustavate punktide  $EC_x$  hinnangulised väärtused ning esitatakse vähemalt  $EC_{50}$  väärtus ja üks või kaks  $EC_x$  väärtust väikestel  $x$  väärtustel. Praktilistest katsetest saadud kogemusest nähtub, et vetikakatse puhul on tavaliselt võimalik hinnata piisava täpsusega kontsentratsiooni, mille juures kasv pidurdub 10 % võrra, kui andmepunkte on küllaldaselt ja väikestel kontsentratsioonidel ei täheldata segava tegurina stimuleerivat mõju.  $EC_{20}$  hinnanguline väärtus on sageli oluliselt täpsem kui  $EC_{10}$  väärtus, kuna  $EC_{20}$  asub tavaliselt kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera keskmises, ligikaudu lineaarses osas. Kasvule avalduva stimuleeriva mõju tõttu on  $EC_{10}$  väärtust mõnikord raske tõlgendada. Ehkki tavaliselt on  $EC_{10}$  piisava täpsusega määratav, soovitatakse seepärast alati esitada ka  $EC_{20}$ .

*Kaalutegurid*

Katsetulemuste hajuvus ei ole üldjuhul ühtlane ja hõlmab tavaliselt proportsionaalsuskomponenti; seepärast eelistatakse alati kasutada kaalutud regressiooni. Tavaliselt eeldatakse sellise analüüsi puhul, et kaalutegur on pöördvõrdeline hajuvusega:

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

Paljud regressiooniprogrammid võimaldavad kasutada kaalutud regressiooni, millele vastavad kaalutegurid esitatakse tabelina. Kaalutegurid tuleks normaliseerida, korrutades need teguriga  $n/\sum W_i$  ( $n$  on andmepunktide arv), nii et kõikide kaalutegurite summa on 1.

*Uuritava muutuja normaliseerimine*

Kontrollrühmas määratud muutuja keskvaartuse alusel normaliseerimine toob kaasa mõned põhimõttelised probleemid ja muudab hajuvuse struktuuri küllalt keeruliseks. Kui kasvu pidurdumise protsentuaalse määra leidmiseks jagatakse uuritava muutuja väärtus asjaomase muutuja keskvaartusega kontrollrühmas, tuuakse sisse kõnealuse keskvaartuse määramise veast tulenev lisaviga. Kui see viga ei ole tühiselt väike, tuleb regressiooni kaalutegureid ja usalduspiire korrigeerida, võttes arvesse kovariatsiooni kontrollväärtusega (Draper ja Smith, 1981). Tuleb silmas pidada, et kontrollrühma andmete keskvaartuse täpne määramine on oluline, sest selle kaudu minimeeritakse uuritava muutuja suhtelise väärtuse üldhajuvus. Seda hajuvust väljendatakse järgmiselt.

(Alaindeks  $i$  tähistab kontsentratsiooni  $i$  ja alaindeks 0 kontrollrühma.)

$$Y_i = \text{uuritava muutuja suhteline väärtus} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼ **M6**

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

ning kuna  $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$  ja  $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

ning andmete normaaljaotuse ja paralleelkultuuride arvu  $m_i$  ja  $m_0$  puhul  $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$ ,

on uuritava muutuja suhtelise väärtuse  $Y_i$  üldhajuvus järgmine:

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

Kontrollrühma andmete keskvaartuse viga on pöördvõrdeline kontrollkultuuride keskmistatud arvu ruutjuurega; seepärast võib vea oluliseks vähendamiseks mõnikord olla õigustatud varasemate andmete kaasamine analüüsi. Teine võimalus on loobuda andmete normaliseerimisest ja kasutada lähendamisel uuritava muutuja absoluutseid väärtusi, sealhulgas kontrollkultuuride andmeid, käsitledes kontrollrühmas leitud uuritava muutuja väärtust siiski mittelineaarse regressiooni teel lähendatava lisaparameetrina. Tavalise kaheparameetrilise regressioonivõrrandi puhul nõuab see meetod lähendamist kolme parameetri alusel ja sellest tulenevalt suuremat hulka andmepunkte võrreldes mittelineaarse regressiooniga, mis põhineb kontrollrühma kindlaksmääratud tulemuste alusel normaliseeritud andmetel.

#### *Usaldusvahemike leidmine pöördhinnangu abil*

Mittelineaarse regressiooni usaldusvahemike arvutamine pöördhinnangu abil on üsna keeruline ega kuulu tavaliste statistilise tarkvara pakettide standardsete võimaluste hulka. Ligikaudsed usalduspiirid võib arvutada standardsete mittelineaarset regressiooni võimaldavate programmide abil, kasutades ümberparametriseerimist (Bruce ja Versteeg, 1992), mille puhul matemaatiline võrrand kirjutatakse ümber nii, et hinnatavateks parameetriteks on soovitatavad hinnangulised väärtused, nt  $EC_{10}$  ja  $EC_{50}$ . (Olgu funktsioon  $I = f(\alpha, \beta, \text{konsentratsioon})$ ; kasutatakse määratlusest tulenevaid seoseid  $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$  ja  $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ , et asendada  $f(\alpha, \beta, \text{konsentratsioon})$  samaväärse funktsiooniga  $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{konsentratsioon})$ .)

Otsesema arvutusmeetodi kasutamisel (Andersen *et al.*, 1998) jäetakse võrrand originaalkujule ja arendatakse funktsioon Taylori ritta  $r_i$  ja  $r_0$  keskvaartuste ümbruses.

Viimasel ajal on muutunud populaarseks andmete usaldusväarsuse iteratiivsel kontrollimisel põhinevad meetodid (*bootstrap*-meetodid). Nende meetodite puhul kasutatakse hajuvuse empiirilise jaotuse hindamiseks katseandmeid ja sagedast korduvat valimi moodustamist juhuslike arvude generaatori abil.

#### KIRJANDUS

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

Draper, N. R., ja Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, teine väljaanne. Wiley, New York.

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

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., ja Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *J. Agr. Biol. Envir. St.* 3: 405–420.C.



**▼B****C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE****I OSA ÜLDPÕHIMÕTTED****I.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatakse kuut katsemeetodit, mis sobivad kemikaalide kohese biolagunduvuse sõelkatseteks aeroobses veekeskkonnas:

- a) lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) kõrvaldamine (meetod C.4-A);
- b) muudetud OECD sõelkatse – DOC kõrvaldamine (meetod C.4-B);
- c) süsinikdioksiidi (CO<sub>2</sub>) eraldumine (muudetud Sturm'i katse) (meetod C.4-C);
- d) manomeetriline respiromeetria (meetod C.4-D);
- e) kinnise pudeli katse (meetod C.4-E);
- f) MITI (Jaapani Väliskaubandus- ja Tööstusministeeriumi) katse (meetod C.4-F).

Kõigi kuue katse üldpõhimõtted on esitatud meetodi I osas. Üksikute meetodite spetsiifilised osad on esitatud II–VII osas. Lisades on toodud määratlused, valemid ja suunismaterjalid.

1988. a tehtud OECD laboritevaheline võrdluskatse näitas, et nende meetoditega saadakse ühtseid tulemusi. Siiski võib mõni meetod olenevalt aine füüsikalistest omadustest olla eelistatav.

**I.2. SOBIVA MEETODI VALIMINE**

Sobivaima meetodi valikul on olulised andmed kemikaali lahustuvuse, aururõhu ja adsorptsiooniomaduste kohta. Teoreetiliste väärtuste arvutamisel ja/või mõõdetud väärtuste, nt ThOD, ThCO<sub>2</sub>, DOC, TOC, COD (vt 1. ja 2. liide) kontrollimisel on vaja teada aine keemilist struktuuri või valemit.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 100 mg/ml, võib analüüsida kõigi meetoditega eeldusel, et ained ei ole lenduvad ega adsorbeeruvad. Tabelis 1 on märgitud meetodid, mis sobivad vees vähe lahustuvate, lenduvate või adsorbeeruvate kemikaalide puhul. Vees vähelahustuvate ja lenduvate kemikaalide käsitlemisviise on kirjeldatud 3. liites. Mõõdukalt lenduvaid kemikaale võib uurida DOC kõrvaldamise katse eeldusel, et katseanumates (mis peaksid olema sobival moel suletud) on küllaldaselt vaba ruumi gaasifaasile. Sellisel juhul tuleb füüsikaliste kadude arvessevõtmiseks teha ka abiootiline kontrollkatse.



Tabel 1

## Katsemetodite kohaldatavus

Katse	Analüüsimeetod	Sobivus ainetele, mis on:		
		vähelahustuvad	lenduvad	adsorbeeruvad
DOC kõrvaldamine	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
Muudetud OECD sõelkatse	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
CO <sub>2</sub> eraldumine	Respiromeetria: CO <sub>2</sub> eraldumine	+	—	+
Manomeetriline respiromeetria	Manomeetriline respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+
Kinnise pudeli katse	Respiromeetria: lahustunud hapnik	+/-	+	+
MITI katse	Respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+

Saadud tulemuste tõlgendamisel on vaja andmeid katsematerjali puhtusastme või põhikomponentide osakaalu kohta, eriti kui tulemused on väikesed või piiripealsed.

Andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele (IV liide) võivad olla sobivate katsekonsentratsioonide valikul väga kasulikud ja madalate biolagunduvuse väärtuste õigel tõlgendamisel hädavajalikud.

## I.3. VÕRDLUSAINED

Töövõtete kontrollimiseks tehakse koos tavaliste katsetega sobivas kolvis paralleelkatse kohese biolagunduvuse kriteeriumidele vastavate võrdlusainetega.

Sobivad võrdlusained on aniliin (värselt destilleeritud), naatriumatsetaat ja naatriumbensoaat. Võrdlusained lagunevad nende meetodite puhul isegi ilma otseselt inokulaati lisamata.

On tehtud ettepanekuid bioloogiliselt kergesti laguneva, kuid inokulaadi lisamist nõudva võrdlusaine otsimiseks. Välja on pakutud kaaliumvesinikftalaati, kuid enne selle aine võrdlusainena tunnustamist tuleb selle kohta rohkem andmeid koguda.

Respiromeetrilistes katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

## I.4. KATSEMETODITE PÕHIMÕTE

Testaine lahus või suspensioon mineraalses toitelahuses inokuleeritakse ja seda inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes pimedas või hajutatud valguse käes. Inokulaadist pärit DOC kogus katselahuses tuleks testainest pärit DOC kogusega võrreldes hoida võimalikult madal. Et arvestada endogeenset aktiivsust inokulaadis, tehakse paralleelne pimekatse inokulaadiga ja ilma testaineta, ehkki endogeenne aktiivsus rakkudes testaine juuresolekul ei ole täpselt identne endogeense kontrollproovi omaga. Töövõtete toimimise kontrolliks tehakse paralleelkatse võrdlusainega.

**▼ B**

Üldjuhul jälgitakse lagundamisprotsessi mitmesuguste parameetrite, nagu DOC, CO<sub>2</sub> eraldumise ja hapniku tarbimise põhjal ja mõõtmisi tehakse nii sageli, et see võimaldab määrata biolagundamise algust ja lõppu. Automaatsete respiromeetrite kasutamisel toimub mõõtmine pidevalt. Lisaks mingile muule parameetrile mõõdetakse vahel DOC-d, kuid tavaliselt tehakse seda ainult katse alguses ja lõpus. Kasutada võib ka spetsiifilist keemilist analüüsi testaine esmase lagunemise ja mis tahes tekkinud vaheühendite kontsentratsiooni määramiseks (nõutav MITI katses).

Üldjuhul on katse pikkus 28 päeva. Katsed võib siiski lõpetada enne 28 päeva möödumist, st kohe, kui biolagundamise graafik on jõudnud platooni ja jäänud sinna vähemalt kolmeks mõõtmiseks. Katseid võib pikendada ka pikemaks kui 28 päeva, kui graafik näitab, et biolagundamine on alanud, kuid platooni ei ole 28 päeva jooksul jõutud.

## I.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

### I.5.1. Reproduitseeritavus

Biodegradatsiooni ja inokulaadina kasutatud bakteripopulatsioonide iseloomu tõttu tuleks kõiki määramisi teha vähemalt kahe paralleelina.

Kogemus näitab, et mida suurem on katsekeskkonda lisatud mikroorganismide kontsentratsioon, seda väiksemad on korduskatsete vahelised erinevused. Laboritevahelised võrdlused on näidanud ka seda, et eri laborites saadud tulemused võivad erineda üsna palju, kuid tavaliselt saadakse hea biolagunduvusega ühendite puhul üsna sarnased tulemused.

### I.5.2. Katse kehtivus

Katse loetakse kehtivaks, kui uuritava kemikaali kõrvaldamisparameetri kordusväärtuste suurim erinevus platool ja katse lõpus või kümnapäevase akna lõpus on väiksem kui 20 % ja kui võrdlusaine protsentuaalne lagunemine on 14 päeva jooksul jõudnud kohese biolagunduvuse määrani. Kui kas või üks neist tingimustest ei ole täidetud, tuleb katset korrata. Meetodite piiratuse tõttu ei tähenda madalad väärtused tingimata seda, et testaine keskkonnas bioloogiliselt ei lagune, küll aga seda, et biolagunduvuse määramine nõuab rohkem tööd.

Kui lagunemise määr on testaine ja võrdlusainega mürgisuse katses 14 päeva jooksul alla 35 % (DOC järgi) või alla 25 % (ThOD või ThCO<sub>2</sub> järgi), võib testaine lugeda bioloogilisi protsesse pidurdavaks (vt ka IV liidet). Katseseeriat tuleks korrata, võimaluse korral uuritava kemikaali madalama kontsentratsiooni ja/või inokulaadi kõrgema kontsentratsiooniga, kuid mitte rohkem kui 30 mg tahkeid aineid/liitris.

## I.6. ÜLDISED TÖÖMEETODID JA ETTEVALMISTUSED

Katsete puhul kehtivad üldnõuded on kokku võetud tabelis 2. Konkreetsetelt üksikute katsetega seotud seadmeid ja katsetingimusi kirjeldatakse hiljem, vastava katse alapunktis.



Tabel 2

## Katsetingimused

Katse	DOC kõrvaldamine	CO <sub>2</sub> eraldumine	Manomeetriline respiromeetria	Muudetud OECD sõelkatse	Kinnise pudeli katse	MITI (l)	
Testaine kontsentratsioon							
mg/l			100		2–10	100	
mg DOC/l	10–40	10–20	10–40	10–40			
mg ThOD/l			50–100		5–10		
Inokulaadi kontsentratsioon (rakkudes/l, ligikaudne)	≤ 30 mg/l hõljumit või ≤ 100 ml reovett/l (10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup> )			0,5 ml töödeldud reovett/l (10 <sup>5</sup> )	≤ 5 ml reovett/l (10 <sup>4</sup> –10 <sup>6</sup> )	30 mg/l hõljumit (10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup> )	
Elementide kontsentratsioonid mineraalses toitela-huses (mg/l)							
P	116					11,6	29
N	1,3					0,13	1,3
Na	86					8,6	17,2
K	122					12,2	36,5
Mg	2,2					2,2	6,6
Ca	9,9					9,9	29,7
Fe	0,05–0,1					0,05–0,1	0,15
pH	7,4± 0,2						eelistatavalt 7,0
Temperatuur	22 ± 2 °C						25 ± 1 °C

DOC = lahustunud orgaaniline süsinik

ThOD = lahustunud orgaaniline süsinik

SS = hõljuvaine

## I.6.1. Lahjendusvesi

Kasutatakse deioniseeritud või destilleeritud vett, mis ei sisalda inhibeerivates kontsentratsioonides mürgiseid aineid (nt Cu<sup>++</sup> ioone). Orgaanilise süsiniku sisaldus ei tohi olla suurem kui 10 % testainest tulenevast orgaanilise süsiniku sisaldusest. Vee kõrge puhtusaste aitab välistada kõrgete tulemuste saamise nullproovidega. Saastus võib tuleneda nii testaines olevatest lisanditest kui kaioonvahetusvaikudest ja lüüsunud bakteri- või vetikamaterjalist. Igas katseeserias tuleb kasutada ainult samast partiist pärit vett, millele on eelnevalt tehtud DOC analüüs. Kinnise pudeli katses selline analüüs vajalik ei ole, kuid vee hapnikutarve peab olema madal.

**▼B****I.6.2. Mineraalainete põhilahused**

Katselahuste jaoks valmistatakse sobivate mineraalainete kontsentratsioonidega põhilahused. Järgmised põhilahused sobivad (erinevaid lahjendusastmeid kasutades) DOC kõrvaldamise katse, muudetud OECD sõelkatse, CO<sub>2</sub> eraldumise katse, manomeetrilise respirometria katse ja kinnise pudeli katse jaoks.

Lahjendusastmed ja MITI katse mineraalse toitelahuse valmistamisjuhend on esitatud vastavate katsete alapunktides.

*Põhilahused*

Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

- |    |   |         |
|----|---|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                | 8,50 g  |
|    | Dikaaliumvesinikfosfaat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                | 21,75 g |
|    | Dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O | 33,40 g |
|    | Ammooniumkloriid, NH <sub>4</sub> Cl  | 0,50 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitri.<br>Lahuse pH peaks olema 7,4.         |         |
| b) | Kaltsiumkloriid, veevaba, CaCl <sub>2</sub>   | 27,50 g |
|    | või kaltsiumkloriididihüdraat, CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O                   | 36,40 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitri  |         |
| c) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                   | 22,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitri  |         |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O                    | 0,25 g  |

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitri.

Märkus. Vältimaks vajadust valmistada lahus vahetult enne kasutamist, tuleb neile 1 liitri kohta lisada üks tilk konts. vesinikkloriidhapet või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe dinaatriumsoola.

**I.6.3. Kemikaalide põhilahused**

Juhul kui aine lahustuvus ületab 1 g/l, lahustada vastavalt vajadusele 1–10 g test- või võrdlusainet deioniseeritud vees ja täiendada veega 1 liitri. Teise võimalusena võib valmistada põhilahuse mineraalses toitelahuses või lisada kemikaali otse mineraalsele toitelahusele. Halvemini lahustuvate kemikaalide käsitlemist vt 3. liitest, kuid MITI katses (meetod C.4-F) ei tohi kasutada ei lahusteid ega emulgaatoreid.

**▼B****1.6.4. Inokulaadid**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, (klooritamata) reovett, pinnavett või mulda või nende segu. DOC kõrvaldamise, CO<sub>2</sub> eraldumise või manomeetrilise respirometria katses aktiivmuda kasutamisel peaks see olema pärit valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest. Teistest allikatest pärit inokulaatide puhul on ilmnenud tulemuste suurem hajuvus. Muudetud OECD sõelkatse ja kinnise pudeli katse jaoks on vaja lahjemat, mudahelvesteta inokulaati, eelistatav allikas on valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuv töödeldud reovesi. MITI katse inokulaat valmistatakse mitmete lähtematerjalide segust ja vastav kirjeldus on esitatud konkreetse katse alapunktis.

**1.6.4.1. Aktiivmudast saadud inokulaat**

Proov võetakse valdavalt olmereovett töötleva puhastusjaama või laborimõõdus seadme aeratsioonibasseini värskest aktiivmudast. Vajaduse korral eemaldatakse peene sõelaga filtrimisel jämedad osakesed ja hoitakse muda seejärel aeroobsena.

Teine võimalus on muda pärast jämedate osakeste eemaldamist setitada või tsentrifugeerida (näiteks 1 100 g 10 min). Kõrvaldatakse supernatant. Muda võib pesta mineraalse toitelahusega. Kõrvaldatakse kontsentratsioonil 3–5 g hõljumit/l ja aereeritakse tarvitamiseni.

Muda tuleks võtta tavapärasest, töökorras puhastusjaamast. Suure koormusega puhastusjaamast pärinevat või inhibiitoreid sisaldada võivat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda seeditakse või tsentrifugeeritakse, kõrvaldatakse supernatant ja resuspendeeritakse muda järgmises koguses mineraalses toitelahuses. Protseduuri korratakse, kuni muda loetakse substraadi liist või inhibiitorist vabaks.

Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljumi kuivmassi määramiseks.

Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljumit/l). Muda töödeldakse keskmisel kiirusel 2 min mehaanilises segistis. Homogeniseeritud muda seeditakse 30 min või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulaadina kontsentratsioonil 10 ml/l mineraalse toitelahuse kohta.

**1.6.4.2. Muud inokulaadiallikad**

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Selleks võetakse värske proov, mida hoitakse transportimisel aeroobsena. Mudal lastakse 1 h seista või filtritakse see läbi jämeda filterpaberi ja hoitakse dekanteeritud vedelik või filtraat kuni tarvitamiseni aeroobsena. Sellist inokulaati võib kasutada kuni 100 ml toitelahuse liitri kohta.

**▼B**

Veel üks võimalik inokulaadiallikas on pinnavesi. Sobivast pinnaveekogust, nt jõest või järvest võetakse proov ja hoitakse seda tarvitamiseks aeroobsena. Vajaduse korral kontsentreeritakse inokulaati filtrimise või tsentrifuugimise teel.

**I.6.5. Inokulaatide kohandamine**

Inokulaate võib lasta kohanduda katsetingimustega, kuid mitte adapteeruda uuritava kemikaaliga. Kohandamine seisneb aktiivmuda aeratsioonis mineraalses toitelahuses või töödeldud reovees katsetemperatuuril 5–7 päeva jooksul. Mõnikord parandab kohandamine katsete meetodite täpsust, vähendades nullproovidega saadavaid tulemusi. MITI inokulaadi kohandamist ei peeta vajalikuks.

**I.6.6. Abiootilised kontrollproovid**

Vajaduse korral kontrollitakse testaine võimalikku abiootilist lagunemist, uurides DOC kõrvaldamist, hapniku tarbimist või süsinikdioksiidi eraldumist steriilsetes inokulaadita kontrollproovides. Proov steriliseeritakse filtrimisel läbi membraani (0,2–0,45 µm) või sobiva mürkaine lisamisel vajalikus kontsentratsioonis. Membraanfiltratsiooni kasutamisel võetakse proovid steriilsuse tagamiseks aseptiliselt. Kui uuritava kemikaali adsorbeerumine ei ole eelnevalt välisutatud, tuleb katsetes, kus biolagundumist mõõdetakse DOC kõrvaldamise järgi, eriti aktiivmuda-inokulaatide kasutamisel, kasutada inokuleeritavat ja mürgitatavat abiootilist kontrollproovi.

**I.6.7. Kolbide arv**

Kolbide arv tüüpilises katses on ära toodud iga katse alapunktis.

Kasutada võib järgmisi kombinatsioone:

- katsesuspensioon: sisaldab testainet ja inokulaati;
- inokulaadi nullproov: sisaldab ainult inokulaati;
- protseduuri kontrollproov: sisaldab võrdlusainet ja inokulaati;
- abiootiline steriilne kontrollproov: steriilne, sisaldab testainet (vt I.6.6);
- adsorptsiooni kontrollproov: sisaldab testainet, inokulaati ja steriliseerivat ainet;
- mürgisuse kontrollproov: sisaldab testainet, võrdlusainet ja inokulaati.

Paralleelmõõtmised katsesuspensiooni ja inokulaadi nullprooviga on kohustuslikud. Soovitav on teha mõõtmised ka ülejäänud paralleelidega.

See ei pruugi aga alati võimalik olla. Tagada tuleb küllaldane proovide või mõõtmiste arv protsentuaalse kõrvaldamise leidmiseks 10-päevase akna kestel.

**▼B**

## I.7. ANDMED JA HINDAMINE

Protsentuaalse lagunemise ( $D_t$ ) arvutamisel kasutatakse nii katse-  
numa kui ka inokulaadi nullproovi kordusmõõtmiste keskmisi.  
Vastavad valemid on sätestatud allpool, konkreetsetele katsetele  
vastavates alapunktides. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt ja  
näidatakse ära kümnapäevane aken. Tuleks arvutada ja esitada  
kõrvaldamisprotsent kümnapäevase akna lõpus ja väärtus platool  
või katse lõpus, vastavalt vajadusele.

Respiromeetrilistes katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid  
nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

I.7.1. **DOC määramise põhjal mõõdetud lagunemine**

Katse kehtivuse hindamiseks tuleks testainet sisaldavate kolbide  
kohta eraldi arvutada protsentuaalne lagunemine ( $D_t$ ) igal proovi  
võtmise hetkel, kasutades DOC topeltmõõtmiste keskmisi väärtusi  
(vt I.5.2). See arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left( 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

kus:

$D_t$  = lagunemisprotsent ajahetkel  $t$ ,

$C_o$  = DOC keskmine algkontsentratsioon testainet sisaldavas  
inokuleeritud toitelahuses (mg DOC/l),

$C_t$  = DOC keskmine kontsentratsioon testainet sisaldavas inokulee-  
ritud toitelahuses ajahetkel  $t$  (mg DOC/l),

$C_{b0}$  = DOC keskmine algkontsentratsioon substraadivabas inokulee-  
ritud mineraalses toitelahuses (mg DOC/l),

$C_{bt}$  = DOC keskmine kontsentratsioon substraadivabas inokulee-  
ritud mineraalses toitelahuses ajahetkel  $t$  (mg DOC/l).

Kõik kontsentratsioonid määratakse katseliselt.

I.7.2. **Spetsiifilise analüüsi põhjal mõõdetud lagunemine**

Kui on olemas spetsiifilise analüüsi andmed, arvutatakse esmane  
biolagunemine valemist:

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

kus:

$D_t$  = lagunemisprotsent ajahetkel  $t$ , üldjuhul 28 päeva möödumisel,

$S_a$  = testaine jääk inokuleeritud toitelahuses katse lõpul (mg),

$S_b$  = testaine jääk pimekatses vee/toitelahusega, kuhu on lisatud  
ainult testaine (mg).



**▼B**1.7.3. **Abiootiline lagunemine**

Abiootilise steriilse kontrollproovi kasutamisel arvutatakse protsentuaalne abiootiline lagunemine valemist:

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kus

$C_{s(o)}$  = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis 0-päeval,

$C_{s(t)}$  = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis päeval t.

I.8. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- test- ja võrdlusaineid ning nende puhtusastet;
- katsetingimusi;
- inokulaadi kohta: tüüpi ja päritolu, kontsentratsiooni ja kohandamist, kui seda kasutati;
- tööstuslike heitmete osakaalu ja iseloomu reovees, kui see on teada;
- katse kestust ja temperatuuri;
- vahelahustuvate testainete puhul nende käsitlemise meetodeid;
- kasutatud katsemeetodit; meetodi mis tahes muudatusi tuleb teaduslikult põhjendada ja seletada;
- andmeid;
- kõiki täheldatud inhibitsiooninähte;
- abiootilist lagunemist, kui seda täheldati;
- spetsiifilise keemilise analüüsi andmeid, kui neid on;
- vaheühendite analüüsiandmeid, kui neid analüüsiti;
- test- ja võrdlusainete protsentuaalse lagunemise graafikut ajas; selgelt tuleks näidata ootefaas, lagunemisfaas, kümnapäevane aken ja tõus (1. liide). Kui katse vastab kvaliteedinõuetele, võib graafikul kasutada testainet sisaldavate kolbide lagunemisprotsentide keskmist väärtust;
- lagunemisprotsenti kümnapäevase akna lõpus ja platool või katse lõpus.

II OSA **DOC KÕRVALDAMISE KATSE** (meetod C.4-A)II.1. **PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse pimedas või hajutatud valguse käes  $22 \pm 2$  °C juures.

**▼ B**

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsidega. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

**II.2. MEETODI KIRJELDUS****II.2.1. Seade**

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolbide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolbides;
- c) sobivate membraanidega filtrimisseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

**II.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahendusveega, liidetakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitri.

**II.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda; reovett; pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

**II.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikontsentratsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga (vt I.6.4), lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

**▼B**

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitrini ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liide). Kolbide avad kaetakse nt alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

#### II.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

#### II.2.6. **Katse tegemine**

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon, piisava sagedusega kümnapäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnapäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifugeeritakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifugeeritud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

### II.3. **ANDMED JA ARUANDLUS**

#### II.3.1. **Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis 1.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

**▼B**II.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Vt punkti I.5.2.

II.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

II.4. **ANDMETABEL**

Järgneb andmetabeli näide.

**DOC KÕRVALDAMISE KATSE****1. LABOR****2. KATSE ALGUSKUUPÄEV****3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $t_0$ : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)**4. INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

**5. SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_x$
Testaine koos inokulaadiga	1	$a_1$					
		$a_2$					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	$b_1$					
		$b_2$					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					

## ▼B

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
Inokulaadi null- proovid testaineta	3	C <sub>1</sub>					
		C <sub>2</sub>					
		c, keskmine C <sub>c(t)</sub>					
	4	d <sub>1</sub>					
		d <sub>2</sub>					
		d, keskmine C <sub>d(t)</sub>					
$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$							

## 6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE

Kolvi nr		Lagunemisprotsent in päeva möödumisel				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(\*) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

*Märkus.* Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

## 7. ABIOTOILINE KONTROLLPROOV (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	C <sub>s(o)</sub>	C <sub>s(t)</sub>

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

## 8. SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S <sub>b</sub>	

**▼B**

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Inokuleeritud toitelahus	$S_a$	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

**III OSA MUUDETUD OECD SÕELKATSE (meetod C.4-B)****III.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, inokuleeritakse 0,5 ml reoveega liitri lahuse kohta. Seejärel aereeritakse segu pimedas või hajutatud valguse käes  $22 \pm 2$  °C juures.

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsides. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

**III.2. MEETODI KIRJELDUS****III.2.1. Seadmed:**

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolvide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolvides;
- c) sobivate membraanidega filtrimiseseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

**III.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 80 ml lahendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b–d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Selles meetodis kasutatakse ainult 0,5 ml inokulaati liitri kohta, mistõttu võib olla vaja lisada toitelahusele mikroelemente ja kasvatageid. Selleks lisatakse liitri lõpliku toitelahuse kohta 1 ml igast järgmisest lahusest:

**▼B**

Mikroelementide lahus:

Mangaansulfaattetraahüdraat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Boorhape, $\text{H}_3\text{BO}_3$	57,2 mg
Tsinksulfaatheptahüdraat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Ammooniumheptamolüüdaat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-kelaat ( $\text{FeCl}_3$ -etüleendiamiintetraaadikhape)	100,0 mg

Lahustatakse vees ja täiendatakse lahjendusveega 1 000 ml-ni.

Vitamiinilahus:

pärmiekstrakt	15,0 mg
---------------	---------

Pärmiekstrakt lahustatakse 100 ml vees. Lahus steriliseeritakse filtrimisel läbi 0,2  $\mu\text{m}$  membraani või valmistatakse vahetult enne kasutamist.

### III.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Vt punkte I.6.4.2 ja I.6.5.

Kasutatav kogus on 0,5 ml ühe liitri mineraalse toitelahuse kohta.

### III.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikoostsentsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtust ja viiakse see vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse 0,5 ml reovee lisamisega liitri kohta (vt I.6.4.2). Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitri ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liidet). Kolbide avad kaetakse näiteks alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

**▼B****III.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

**III.2.6. Katse tegemine**

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon piisava sagedusega kümnepäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnepäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

**III.3. ANDMED JA ARUANDLUS****III.3.1. Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel  $t$  arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis I.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

**III.3.2. Tulemuste kehtivus**

Vt punkti I.5.2.

**III.3.3. Aruandlus**

Vt punkti I.8.

**III.4. ANDMETABEL**

Järgneb andmetabeli näide.

**MUDETUD OECD SÕELKATSE****1. LABOR****2. KATSE ALGUSKUUPÄEV**



**▼ B****3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $t_0$ : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)**4. INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

**5. SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_x$
Testaine koos inokulaadiga	1	$a_1$					
		$a_2$					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	$b_1$					
		$b_2$					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					
Inokulaadi null-proovid testaineta	3	$C_1$					
		$C_2$					
		c, keskmine $C_{c(t)}$					
	4	$d_1$					
		$d_2$					
		d, keskmine $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

**6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE**

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_x$
1	$D_1 = \left( 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				

▼ B

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
2	$D_2 = \left( 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(\*) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

*Märkus.* Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. **ABIOOTILINE KONTROLLPROOV** (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	C <sub>S(o)</sub>	C <sub>S(t)</sub>

$$\text{Protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{S(o)} - C_{S(t)}}{C_{S(o)}} \times 100$$

8. **SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S <sub>b</sub>	
Inokuleeritud toitelahus	S <sub>a</sub>	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV OSA CO<sub>2</sub> ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)

## IV.1. PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–20 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse süsinikdioksiidivaba õhu läbipuhumisega kindlal kiirusel pimedas või hajutatud valguse käes. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul eralduva CO<sub>2</sub> määramise abil, viimane püütakse baarium- või naatriumhüdroksiidi ja mõõdetakse hüdroksiidi jäägi tiitrimise või anorgaanilise süsiniku määramise teel. Testainest tekkinud süsinikdioksiidi kogus (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThCO<sub>2</sub>-st. Biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava DOC analüüsi põhjal.

**▼B**

## IV.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS

IV.2.1. **Seadmed**

- a) 2–5liitrised kolvid peaaegu põhjani ulatava aeratsioonitoru ja väljaviiuga;
- b) vähelahustuvate ainete uurimisel magnetsegajad;
- c) gaasipüüdurpudelid;
- d) õhuvoolu reguleerimise ja mõõtmise seade;
- e) seade süsinikdioksiidi väljapesemiseks süsinikdioksiidivaba õhu valmistamiseks; teise võimalusena võib kasutada õiges vahekorras segu (20 % O<sub>2</sub>; 80 % N<sub>2</sub>) CO<sub>2</sub>-vabast balloonihapnikust ja CO<sub>2</sub>-vabast ballooniämmastikust;
- f) seade süsinikdioksiidi määramiseks kas tiitrimetriselt või mis tahes põhimõttel töötava anorgaanilise süsiniku analüsaatori abil;
- g) membraanfiltratsiooniseade (ei ole kohustuslik);
- h) DOC analüsaator (ei ole kohustuslik).

IV.2.2. **Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitri.

IV.2.3. **Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4. **Kolbide ettevalmistamine**

Järgmises näites on esitatud mahulised kogused ja kaalutised viieliitriste kolbide jaoks 3 l suspensiooniga. Väiksemate koguste kasutamisel võib koguseid vastavalt muuta, kuid tagada tuleb täpseks mõõtmiseks piisav süsinikdioksiidi eraldumine.

Igasse viieliitrisesse kolbi lisatakse 2 400 ml mineraalset toitelahust. Seejärel lisatakse sobiv kogus ettevalmistatud aktiivmuda (vt I.6.4.1 ja I.6.5) nii, et hõljumi kontsentratsioon lõplikus 3 liitris inokuleeritud segus ei ületa 30 mg/l. Teise võimalusena võib ettevalmistatud muda kõigepealt lahjendada mineraalse toitelahusega nii, et saadakse suspensioon kontsentratsiooniga 500 – 1 000 mg/l, misjärel lisatakse sellest kindel kogus viieliitrisesse kolbi nii, et saadakse lõppkontsentratsioon 30 mg/l; nõnda tagatakse suurem täpsus. Kasutada võib muid inokulaadiallikaid (vt I.6.4.2).

Inokuleeritud segusid aereeritakse üleöö CO<sub>2</sub>-vaba õhuga, et puhastada süsteem süsinikdioksiidist.

**▼B**

Eraldi paralleelkolbidele lisatakse kindla koguse põhilahuse näol test- ja võrdlusaine nii, et neist tulenev DOC või TOC kontsentratsioon on 10–20 mg/l; mõned kolvid jäetakse kemikaalita inokulaadi kontrollproovideks. Vähelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitletakse 3. liites kirjeldatud moel.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, lisades kolbi ülejäänud kolbidega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6). Proov steriliseeritakse sobivas kontsentratsioonis mürkaine lisamisega.

Enne seda täiendatakse suspensioonid kõigis kolmes kolvis CO<sub>2</sub>-vaba õhuga aereeritud mineraalse toitelahusega 3 liitri. Lisaks võib võtta proove DOC analüüsiks (vt II.4 liidet) ja/või spetsiifiliseks analüüsiks. Pesupudelid ühendatakse kolbide väljaviiguga.

Baariumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse iga viieliitrise kolviga järjestikku kolm pesupudelit, millest igaüks on 100 ml 0,0125 M baariumhüdroksiidlahust. Lahus ei tohi sisaldada sulfaadi ja karbonaadi sadet ja selle kontsentratsioon tuleb määrata vahetult enne kasutamist. Naatriumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse järjestikku kaks püüdurit, kusjuures teine on kontrollpüüdur, mis peab näitama, kas esimene absorbeeris kogu süsinikdioksiidi. Sobivad ka seerumpudeli sulguriga pesupudelid. Igasse pudelisse lisatakse 200 ml 0,05 M naatriumhüdroksiidi, mis on küllaldane kogu testaine täielikul lagunemisel tekkiva süsinikdioksiidi absorbeerimiseks. Isegi vahetult enne kasutamist valmistatud naatriumhüdroksiidi lahus sisaldab väikestes kogustes karbonaate, vastav viga korrigeeritakse nullproovi karbonaadikoguse lahutamiseks.

#### IV.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

#### IV.2.6. **Katse tegemine**

Katset alustatakse CO<sub>2</sub>-vaba õhu juhtimisega läbi suspensioonide kiirusega 30–100 ml/min. Süsinikdioksiidi absorbendist võetakse CO<sub>2</sub> sisalduse määramiseks regulaarselt proove. Esimese kümne päeva jooksul on soovitatav teha analüüse iga kahe või kolme päeva tagant, seejärel iga viie päeva tagant kuni 28. päevani, nii et saab määrata kümnepäevase aknaperioodi.

**▼B**

28. päeval võetakse proovid DOC ja spetsiifilise analüüsi jaoks (kui neid tehakse), mõõdetakse suspensioonide pH ja lisatakse igasse kolbi 1 ml kontsentreeritud vesinikkloriidhapet; kolbe aereeritakse üleöö, et kõrvaldada suspensioonides olev süsinikdioksiid. 29. päeval tehakse viimane eralduva süsinikdioksiidi analüüs.

CO<sub>2</sub> mõõtmise päevadel eemaldatakse kõige kolvipoolsem baariumhüdroksiidiga pesupudel ja tiitritakse hüdroksiidilahust 0,05 M HCl-ga, kasutades indikaatorina fenoolftaleiini. Ülejäänud pesupudelid nihutatakse ühe koha võrra kolvile lähemale ja paigutatakse kaugemasse otsa uus pesupudel 100 ml värske 0,0125 M baariumhüdroksiidiga. Tiitrimisi tehakse kas vastavalt vajadusele, näiteks siis, kui esimeses püüduris täheldatakse märgatavat sadet ja enne sademe teket teises pudelis või vähemalt kord nädalas. NaOH kasutamisel absorbendina võetakse süstlaga väike proov (mille suurus sõltub kasutatavast süsinikuanalüsaatorist) kolvipoolses pesupudelis olevast naatriumhüdroksiidilahusest. Proov süstitakse eraldunud süsinikdioksiidi otseseks määramiseks süsinikuanalüsaatori anorgaanilise süsiniku määrajasse.

Teise püüduri sisu analüüsitakse alles katse lõpus, et vajaduse korral lisada arvutustesse läbikandunud süsinikdioksiidi arvestav parandus.

## IV.3. ANDMED JA ARUANDLUS

## IV.3.1. Tulemuste käsitlemine

Püüdurisse kogutud CO<sub>2</sub> kogus leitakse tiitrimisel järgmise valemi järgi:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times v \times C_A) \times 44$$

kus:

V = 100 ml absorbeerimislahuse tiitrimiseks kulunud HCl maht (ml),

C<sub>B</sub> = baariumhüdroksiidilahuse kontsentratsioon (M),

C<sub>A</sub> = vesinikkloriidhappelahuse kontsentratsioon (M),

kui C<sub>B</sub> on 0,0125 M ja C<sub>A</sub> on 0,05 M, kulub 100 ml baariumhüdroksiidi tiitrimiseks 50 ml lahust ja CO<sub>2</sub> mass leitakse järgmisest valemist:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{tiitrimiseks kulunud HCl (ml)} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Seega on teisendustegur tekkinud CO<sub>2</sub> massi (mg) arvutamisel tiitrimisel kulunud HCl mahust (ml) 1,1.

Vastavate tiitrimisandmete põhjal arvutatakse ainult inokulaadist tekkiva CO<sub>2</sub> ning inokulaadi ja testaine segust tekkiva CO<sub>2</sub> massid, nende vahe ongi ainult testainest tekkiva CO<sub>2</sub> mass.

Näiteks kui inokulaadiga kulub tiitrimisele 48 ml ning inokulaadi ja testaine seguga 45 ml,

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

**▼B**

$\text{CO}_2$  inokulaadi ja testaine segust =  $1,1 \times (50-45) = 5,5$  mg

on testainest tekkiva  $\text{CO}_2$  mass 3,3 mg.

Biolagundumise protsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{lisatud testainemass (mg)}}$$

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{katses lisatud TOC(mg)} \times 3,67}$$

kus 3,67 on teisendustegur (44/12) üleminekul süsiniku massilt süsinikdioksiidi massile.

Lagunemisprotsent mis tahes ajavahemiku järel leitakse kõigi mõõtmispäevale eelnevate päevade kohta arvatud protsentuaalsete  $\text{ThCO}_2$  väärtuste liitmisel.

Naatriumhüdroksiidiga absorbeerimisel arvutatakse tekkinud süsinikdioksiidi kogus, väljendatuna anorgaanilise süsinikuna (IC) milligrammides, korrutades IC kontsentratsiooni absorbendis absorbendi mahuga.

Lagunemisprotsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\% \text{ of ThCO}_2 = \frac{\text{IC katsekolvi (mg)} - \text{IC nullproovi(mg)}}{\text{Katseaine a lisatud TOC(mg)}} \times 100$$

DOC kõrvaldamise võib arvutada vastavalt punktile I.7. Need ja kõik ülejäänud tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

#### IV.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Katseaine – mineraalse toitelahuse suspensiooni anorgaanilise süsiniku sisaldus katse algul peab olema vähem kui 5 % süsiniku üldsisaldusest (TC) ja eraldunud  $\text{CO}_2$  summaarne kogus inokulaadiga nullproovi puhul ei tohiks katse lõpul üldjuhul ületada 40 mg/l lahuse kohta. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 70 mg  $\text{CO}_2$ /l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata.

Vt ka punkti I.5.2.

#### IV.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

#### IV.4. **ANDMETABEL**

Järgneb andmetabeli näide.

### SÜSINIKDIOKSHIDI ERALDUMISE KATSE

#### 1. **LABOR**

#### 2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**

#### 3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

**▼B**

Algkonts. toitelahuses: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Kolbi lisatud süsiniku koguhulk: ...mg C

ThCO<sub>2</sub>:...mg CO<sub>2</sub>

**4. INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

**5. SÜSINIUKDIOKSIIDI ERALDUMINE JA LAGUNDUVUS**

Meetod: Ba(OH)<sub>2</sub>/NaOH/muu

Aeg (päevades)	Tekkinud CO <sub>2</sub> Katselahus (mg)		Tekkinud CO <sub>2</sub> nullproov (mg)		Tekkinud CO <sub>2</sub> kumu- latiivne (mg) (ja nullproovi vahe keskmise)		ThCO <sub>2</sub> kumulatiivne $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	keskmise	3 4	keskmise	1	2	1	2	keskmise
0									
n <sub>1</sub>									
n <sub>2</sub>									
n <sub>3</sub>									
28									

*Märkus:* Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

**5. SÜSINIUKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)**

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine (mg/l)
0	C <sub>b(o)</sub>	C <sub>o</sub>
28 (*)	C <sub>b(t)</sub>	C <sub>t</sub>

(\*) või inkubatsiooniperioodi lõpus.

**▼B**

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

**7. ABIOTOILISE LAGUNEMISE KATSE** (pole kohustuslik)

$$\text{abiootilise lagunemise\%} = \frac{\text{CO}_2 - \text{CO}_2 \text{ teke steriilses kolvis 28 päeva jarel (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

**V. OSA MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE**  
(meetod C.4-D)**V.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (100 mg/l testainet, ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, segatakse kuni 28 päeva kinnises kolvis konstantsel temperatuuril (kõikumisega  $\pm 1$  °C või alla selle). Hapniku tarbimine määratakse kas konstantse gaasiruumala hoidmiseks vajaliku (elektrolüüsil saadud) hapniku koguse mõõtmisel või ruumala või rõhu (või mõlema) muutuse järgi seadmes. Tekkiv süsinikdioksiid absorbeeritakse kaaliumhüdrosiidi või muu sobiva absorbendi lahuses. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st. Lisaks võib inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal arvutada ka esmase biolagundumise määra ja DOC analüüsi põhjal lõpliku biolagundumise määra.

**V.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS****V.2.1. Seadmed**

- a) sobiv respiromeeter;
- b) termostaat täpsusega  $\pm 1$  °C või täpsem;
- c) membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik);
- d) süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

**V.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitri.

**V.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett ja mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

**V.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Põhilahustest valmistatakse eraldi test- ja võrdlusainete lahused mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 100 mg keemikaali/liitris (ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l).



**▼B**

ThOD arvutatakse ammooniumisoolade moodustumise põhjal, välja arvatud juhul, kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, sel juhul eeldatakse arvutustes nitraadi moodustumist (vt II liidet punkti 2).

Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral  $7,4 \pm 0,2$ ni.

Vähelahustuvad ained tuleks lisada hilisemas faasis (vt allpool).

Testaine mürgisuse kontrollimisel valmistatakse ette veel üks lahus, mis sisaldab üksikute lahustega võrdses kontsentratsioonis nii testkui ka võrdlusainet.

Kui on vaja määrata füüsikalis-keemiline hapnikutarve, valmistatakse testaine lahus ThOD-ga üldjuhul 100 mg/l, mis steriliseeritakse sobiva mürkaine lisamisega (vt I.6.6).

Vähemalt kahtedesse paralleelkolbidesse lisatakse vajalikud kogused test- ja võrdlusainete lahuseid. Täiendavad kolvid valmistatakse ette ainult mineraalse toitelahusega (inokulaadi kontrollproovid) ning vajaduse korral test- ja võrdlusaine seguga ja steriilse lahusega.

Vähelahustuvad testained lisatakse selles faasis massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitsetakse 3. liites kirjeldatud moel. CO<sub>2</sub>-püüduri kambritesse lisatakse kaaliumhüdroksiidi, naatronlubja graanuleid või muud absorbenti.

**V.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

**V.2.6. Katse tegemine**

Kolbidel lastakse jõuda soovitud temperatuurini ning asjaomased kolvid inokuleeritakse ettevalmistatud aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Katseaparatuur pannakse kokku, käivitatakse segaja ning kontrollitakse seadme hermeetilisust ja alustatakse hapnikutarve mõõtmist. Üldjuhul ei ole vaja katseaparatuuri rohkem jälgida, välja arvatud vajalike tulemuste registreerimine ja igapäevase temperatuuri- ja segamisrežiimi kontrollimine.

Hapnikutarve arvutatakse regulaarselt ja sageli loetavate näitude põhjal, seadme tootja ette nähtud meetodite abil. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva pärast, mõõdetakse kolbide pH, eriti kui hapnikutarve on madal või kõrgem kui ThODNH<sub>4</sub> (lämmastikku sisaldavate ühendite puhul).

**▼ B**

Vajaduse korral võetakse respiromeetri kolbidest katse alguses ja lõpus proove DOA analüüsiks või spetsiifilise aine analüüsiks (vt II.4 liidet). Pärast proovi võtmist katse alguses peab teada olema kolbi jääva katesuspensiooni maht. Kui hapniku tarbimine on tingitud lämmastikku sisaldavast testainest, mõõdetakse nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõus 28 päeva jooksul ja arvutatakse välja nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus (V liide).

## V.3. ANDMED JA ARUANDLUS

## V.3.1. Tulemuste käsitlemine

Testaine hapnikutarve (mg) kindlaksmääratud aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta.

Biolagundumise protsent arvutatakse kas valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2(\text{mg})/\text{testaine (mg)})}{\text{ThOD}(\text{O}_2(\text{mg})/\text{testaine (mg)})} \times 100$$

või valemist

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

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada esimest meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d ( $\text{NH}_4$  või  $\text{NO}_3$ ) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele. Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Valikulistel orgaanilise süsiniku ja/või spetsiifilise aine määramistel arvutatakse lagunemisprotsent punktis I.7 kirjeldatud moel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

## V.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg  $\text{O}_2$ /l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.



## ▼ B

		Aeg (päevades)											
		0		7		14		21				28	
Lagunemisprotsent	D <sub>1</sub> (a <sub>1</sub> )												
	D <sub>2</sub> (a <sub>2</sub> )												
	$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$												
	Keskmine (*)												

V = lahuse maht katsekolvis

(\*) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

NB: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

#### 6. NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V liidet)

Päev	0	28	Erinevus
i) Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris),			(N)
ii) Hapnikuekvivalent ( $4,57 \times N \times V$ ) (mg)	—	—	
iii) Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)			(N)
iv) Hapnikuekvivalent ( $3,43 \times N \times V$ ) (mg)	—	—	
ii + iv) Summaarne hapnikuekvivalent	—	—	

#### 7. SÜSINIKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine mg/l
0	(C <sub>blo</sub> )	(C <sub>o</sub> )
28 (1)	(C <sub>blt</sub> )	(C <sub>t</sub> )

(1) või inkubatsiooniperioodi lõpus

$$\% \text{ DOC kõrvaldamisprotsent} = \left( 1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

#### 8. SPETSIIFILINE AINE (pole kohustuslik)

S<sub>b</sub> = kontsentratsioon füüsikalises-keemilises (steriilses) kontrollproovis 28 päeva möödumisel.

S<sub>a</sub> = kontsentratsioon inokuleeritud kolvis 28 päeva möödumisel.

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

#### 9. ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

a = hapnikutarve steriilsetes kolvides 28 päeva möödumisel (mg)

$$\text{hapnikutarve testaine mg kohta} = \frac{a}{C_o V}$$

**▼B**

(vt jaotiseid 1 ja 3)

$$\text{abiootilise lagunemise protsent} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

## VI OSA KINNISE PUDELI KATSE (meetod C.4-E)

### VI.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testaine lahustatakse mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 2–5 mg/l, inokuleeritakse suhteliselt väikese arvu segapopulatsiooni mikroorganismidega ja seda hoitakse täiesti täis suletud pudelites konstantsel temperatuuril. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul lahustunud hapniku analüüsimisega. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st.

### VI.2. MEETODI KIRJELDUS

#### VI.2.1. Seadmed

- a) Klaaskorkidega BHT pudelid mahuga näiteks 250–300 ml.
- b) Vesivann või inkubaator pudelite termostateerimiseks konstantsel temperatuuril ( $\pm 1$  °C või täpsem) pimedas.
- c) Suured klaaspudelid (2–5 l) lahuste valmistamiseks ja BHT pudelite täitmiseks.
- d) Hapnikuelektrood ja -mõõtur või seadmed ja reaktiivid Winkleri tiitrimiseks.

#### VI.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

1 (üks) ml lahuseid a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse lahendusveega 1 liitrini.

#### VI.2.3. Inokulaadi valmistamine

Inokulaat valmistatakse üldjuhul valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Veel üks võimalik inokulaadi allikas on pinnavesi. Üldjuhul lisatakse liitri lahuse kohta üks tilk (0,05 ml) kuni 5 ml filtraati; antud reoveele vastava optimaalse koguse määramiseks võib vaja olla eelkatseid (vt I.6.4.2 ja I.6.5).

#### VI.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Mineraalset toitelahust aereeritakse tugevalt vähemalt 20 minutit. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärinevat mineraalset toitelahust. Üldjuhul on lahus kasutusvalmis pärast 20tunnist katsetemperatuuril seismist. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis peaks 20 °C juures olema umbes 9 mg/l. Kõik ülekande- ja täitmisoperatsioonid õhuga küllastatud toitelahusega tuleb teha mullivabalt, näiteks sifooni abil.

**▼B**

Test- ja võrdlusainete uurimiseks üheaegsetes katseseeriates valmistatakse ette paralleelsed BHT pudelite rühmad. Katses kasutatakse küllaldast arvu BHT pudelid, sealhulgas inokulaadiga nullproove, nii et soovitatavate ajavahemike, näiteks 0, 7, 14, 21 ja 28 päeva järel, saab hapnikutarvet mõõta vähemalt kahes paralleelis. Kümnepäevase akna määramiseks võib vaja olla täiendavaid pudelid.

Suured pudelid täidetakse põhjalikult aereeritud mineraalse toitelahusega umbes ühe kolmandiku ulatuses. Seejärel lisatakse eraldi suurtesse pudelitesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid nii, et kemikaalide lõplik kontsentratsioon ei ületa üldjuhul 10 mg/l. Täiendavas suures pudelis olevale kemikaalivabale kontrolltoitelahusele kemikaale ei lisata.

Et mitte piirata inokulaadi aktiivsust, ei tohi lahustunud hapniku kontsentratsioon BHT pudelites langeda alla 0,5 mg/l. Seega on testaine kontsentratsioon piiratud umbes 2 mg/l. Raskestilagunevate ja madala ThOD-ga ühendite puhul võib siiski kasutada kontsentratsiooni 5–10 mg/l. Mõningatel juhtudel võib soovitada teha paralleelseid katseseeriaid kahe erineva testaine kontsentratsiooniga, näiteks 2 ja 5 mg/l. ThOD arvutatakse üldjuhul ammooniumisoolade moodustumise põhjal, kuid kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist või selle toimumine on teada, arvutatakse see nitraadi moodustumise põhjal (ThODNO<sub>3</sub>: vt II liite punkti 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, parandatakse tulemust, arvestades analüütiliselt leitud nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutusi (vt V liidet).

Testaine mürgisuse uurimisel (näiteks madala biolagunduvuse tulemuse puhul) on vaja veel üht pudeliseeriat.

Valmistatakse ette veel üks suur pudel, mis sisaldab aereeritud mineraalset toitelahust (umbes 1/3 pudeli mahust) ja ülejäänud suurte pudelitega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Lahused suurtes pudelites inokuleeritakse töödeldud reoveega (1 tilk ehk umbes 0,05 ml kuni 5 ml/l) või muu inokulaadi, nagu jõeveega (vt I.6.4.2). Seejärel täiendatakse lahused aereeritud mineraalse toitelahusega vajaliku mahuni, kasutades piisava segunemise saavutamiseks pudeli põhjani ulatuvat voolikut.

#### VI.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses

Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudelid:

- vähemalt 10 pudelit testaine ja inokulaadiga (katsesuspensioon);
- vähemalt 10 pudelit ainult inokulaadiga (inokulaadiga nullproov);
- vähemalt 10 pudelit võrdlusaine ja inokulaadiga (protseduuri kontrollproov),

**▼B**

- ning vajaduse korral 6 pudelit nii testaine, võrdlusaine kui ka inokulaadiga (mürgisuse kontrollproov). Kümnepäevase akna määramiseks võib aga vaja olla umbes kahekordset arvu pudeleid.

## VI.2.6. Katse tegemine

Kõik valmis lahused viiakse kohe vastavasse BHT pudelite rühma, kasutades voolikut, mille ots on BHT pudelite täielikuks täitmiseks vastava suure pudeli alumises veerandis (mitte põhjas). Õrnalt koputades eemaldatakse õhumullid. Nullhetkel määratakse kõigis pudelites Winkleri meetodi või hapnikuelektroodi abil kohe lahustunud hapnik. Proovid võib mangaan(II)sulfaadi ja naatriumhüdroksiidi (esimese Winkleri reaktiivi) abil konserveerida hilisemaks analüüsiks, kasutades Winkleri meetodit. Hoolikalt suletud pudeleid, milles hapnik on fikseeritud pruuni mangaan(III)oksiidi hüdraadina, hoitakse enne Winkleri meetodi järgmiste etappidega jätkamist pimedas 10–20 °C juures kõige rohkem 24 tundi. Ülejäänud paralleelpudelid suletakse õhumullide pudelitesse jäämise vältimiseks korgiga ja inkubeeritakse 20 °C juures pimedas. Iga katseseeriaga peab kaasnema täielik paralleelseeria inokuleeritud, testaineta toitelahuse uurimiseks. Igast seeriast võetakse 28 päeva jooksul kindlate ajavahemike järel (vähemalt kord nädalas) korraga vähemalt kaks pudelit lahustunud hapniku määramiseks.

Nädalaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kõrvaldamisprotsendi 14päevases aknas, 3–4päevaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kümnepäevase akna, selleks on vaja umbes kaks korda rohkem pudeleid.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb tulemustesse teha nitriifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus. Selleks määratakse hapnikuelektroodi abil lahustunud hapniku kontsentratsioon ja võetakse BHT pudelist nitriti ja nitraadi analüüsiks proov. Nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõusu järgi arvutatakse välja vastav hapnikutarve (vt V liidet).

## VI.3. ANDMED JA ARUANDLUS

## VI.3.1. Tulemuste käsitlemine

Kõigepealt arvutatakse iga ajavahemiku BHT, lahutades testaine hapnikutarbest inokulaadiga nullproovi hapnikutarbe (mg/l). Suhtelise BHT (hapniku ja testaine masside (mg) suhte) saamiseks jagatakse parandatud hapnikutarve testaine kontsentratsiooniga (mg/l). Protsentuaalne biolagunduvus arvutatakse suhtelise BHT jagamisel suhtelise (II liite punktis 2 kirjeldatud viisil arvutatud) ThOD-ga või KHT-ga (mis on määratud analüütiliselt, vt II.3 liidet), seega:

$$\text{BOD} = \frac{\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

**▼ B**

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2(\text{mg})/\text{testain e}(\text{mg}))}{\text{ThOD}(\text{O}_2(\text{mg})/\text{testain e}(\text{mg}))} \times 100$$

või

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2\text{mg}/\text{testain emg})}{\text{KHT}(\text{O}_2\text{mg}/\text{testain emg})} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada viimast meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d (NH<sub>4</sub> või NO<sub>3</sub>) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

### VI.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul ei tohiks olla suurem kui 1,5 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad, tuleks katsetehnika üle vaadata. Lahustunud hapniku kontsentratsioon katsepudelites ei tohiks millalgi langeda alla 0,5 mg/l. Sellised madalad hapnikusisaldused saab kehtivaks lugeda ainult juhul, kui kasutatav lahustunud hapniku määramise meetod võimaldab selliseid sisaldusi täpselt määrata.

Vt ka punkti I.5.2.

### VI.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

### VI.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

#### KINNISE PUDELI KATSE

##### 1. LABOR

##### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

##### 3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... mg/l

Algkontsentratsioon pudelis: ... mg/l

ThOD või KHT: ... O<sub>2</sub> (mg)/testaine (mg)

##### 4. INOKULAAT

Allikas:

Töötlus:



**▼ B**

Kohandamine, kui seda tehti:

Kontsentratsioon katsesegus: ... mg/l

**5. LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE**

Meetod: Winkler/elektrood

**Kolbide analüüsitulemused**

Inkubatsiooniaeg (d)			Lahustunud hapnik (mg/l)			
			0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	
Nullproov (kemikaalita)	1	C <sub>1</sub>				
	2	C <sub>2</sub>				
Keskmine	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testaine	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
Keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

**6. NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V liidet)**

Inkubatsiooniaeg (d)		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>
i)	Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris)				
ii)	Nitraadi kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
iii)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)				
v)	Nitriti kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
vi)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Summaarne hapnikuekvivalent (mg/l)	—			

**7. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMIS-PROTSENT**

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	
1. KOLB: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> )				
2. KOLB: (m <sub>to</sub> - m <sub>tx</sub> ) - (m <sub>bo</sub> - m <sub>bx</sub> )				

**▼ B**

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	
1. KOLB: $\%D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
2. KOLB: $\%D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
$\text{keskmine \%D (*)} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(\*) Kordustlemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

$m_{t_0}$  = väärtus katsekolvis ajahetkel 0

$m_{t_x}$  = väärtus katsekolvis ajahetkel x

$m_{b_0}$  = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel 0

$m_{b_x}$  = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel x

Teha tuleb ka nitrifikatsiooni arvestav parandus jaotise 6 punktist iii + vi.

#### 8. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE NULLPROOVIDES

Nullproovi hapnikutarve: ( $m_{b_0} - m_{b_{28}}$ ) mg/l. Nullproovi hapnikutarve on oluline katse kehtivuse seisukohalt. See peaks olema alla 1,5 mg/l.

#### VII OSA MITI KATSE (meetod C.4-F)

##### VII.1. PÕHIMÕTE

28 päeva kestel mõõdetakse automaatselt pimedas, suletud respiromeetris  $25 \pm 1$  °C juures oleva, pidevalt segatava, testainest ja mineraalsest toitelahusest koosneva, spetsiaalselt kasvatatud, adapteerimata mikroorganismidega inokuleeritud lahuse või suspensiooni hapnikutarvet. Tekkinud süsinikdioksiid absorbeeritakse naatronlühajaga. Biolagunduvust väljendatakse nullproovi hapnikutarbe võrra parandatud hapnikutarbe protsendina teoreetilisest hapnikutarbest (ThOD). Lisaks arvutatakse inkubeerimise algul ja lõpul tehtava täiendava keemilise analüüsi ja soovi korral ka DOC analüüsi põhjal esmase biolagundumise määr.

##### VII.2. MEETODI KIRJELDUS

###### VII.2.1. Seadmed

a) Automaatne elektrolüütiline BHT mõõtur või respiromeeter, tavaliselt kuue 300 ml pudeliga ja topsidega CO<sub>2</sub> absorbendi jaoks.

**▼B**

- b) Püsiva temperatuuriga ruum ja/või veevann temperatuuriga 25 °C, lubatava kõikumisega  $\pm 1$  °C või alla selle.
- c) Membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik).
- d) Süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

**VII.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine**

Analüüsipuhastest reaktiividest ja veest (1.6.1) valmistatakse järgmised põhilahused:

- |    |   |         |
|----|---|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$   | 8,50 g  |
|    | Dikaaliumvesinikfosfaat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$   | 21,75 g |
|    | Dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
|    | Ammooniumkloriid, $\text{NH}_4\text{Cl}$  | 1,70 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini  |         |
|    | Lahuse pH peaks olema 7,2   |         |
| b) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                    | 22,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini  |         |
| c) | Veevaba kaltsiumkloriid, $\text{CaCl}_2$  | 27,50 g |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini  |         |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$                    | 0,25 g  |
|    | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini  |         |

3 ml igast lahusest a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse 1 liitrini.

**VII.2.3. Inokulaadi valmistamine**

Võetakse värsked proovid vähemalt kümnest kohast, peamiselt piirkondadest, kus kasutatakse ja kuhu suunatakse mitmesuguseid kemikaale. Üheliitrised muda, pindmise mullakihi, vee- jms proovid võetakse näiteks olme- ja tööstusliku heitvee puhastitest, jõgedest, järvedest ja meredest ning segatakse need hoolikalt kokku. Pärast hõljumi kõrvaldamist ja mõningast seismist viiakse supernatandi pH naatriumhüdrosiidi või fosforhappe abil väärtuseni  $7 \pm 1$ .

Sobiva koguse filtritud supernatandiga täidetakse edaspidi regulaarselt täidetav ja osaliselt tühjendatav aktiivmuda anum ja vedelikku aereeritakse umbes 23,5 tundi. 30 minutit pärast aereerimise lõppu kõrvaldatakse umbes kolmandik supernatandist ja lisatakse settinud materjalile samas mahus lahust (pH 7), mis sisaldab 0,1 % glükoosi, 0,1 % peptooni ja kaaliumdivesinikfosfaati, ning jätkatakse aereerimist. Protseduuri korratakse iga päev. Mudareservuaari tuleb käidelda hea tava kohaselt: väljavool peab olema selge, temperatuur peaks olema  $25 \pm 2$  °C, pH peaks olema  $7 \pm 1$ , muda peaks hästi settima, aeratsioon peaks segu pideva aeroobsuse tagamiseks olema küllaldane, segu peaks sisaldama algloomi ning muda aktiivsust võrdlusaine suhtes tuleks kontrollida vähemalt iga kolme kuu tagant. Muda võib inokulaadina kasutada pärast vähemalt ühekuulist töötlemist, aga hiljemalt nelja kuu pärast. Seejärel võetakse regulaarsete vaheaegade järel vähemalt kord kolme kuu jooksul jälle vähemalt kümnest paigast eespool kirjeldatud proovid.

**▼B**

Et tagada värsked ja vana muda ühesugune aktiivsus, segatakse kasutuses oleva aktiivmuda filtritud supernatant võrdsetes kogustes vahetult enne kogutud kümne allika segu filtritud supernatandiga ja kultiveeritakse saadud segu eespool kirjeldatud moel. Inokulaadiks võetakse muda 18–24 t pärast selle söötmist.

**VII.2.4. Kolbide ettevalmistamine**

Valmistatakse ette järgmised kuus kolbi:

nr 1: testaine lahjendusvees, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 2, 3 ja 4: testaine mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 5: võrdlusaine (nt aniliin) mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 6: ainult mineraalne toitelahtus.

Vähealahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse katsesegusse või käsitsetakse neid 3. liites kirjeldatud moel, kuid lahusteid ega emulgaatoreid kasutada ei tohiks. Kõikidele kolbidele lisatakse vastavasse tropsi CO<sub>2</sub> absorbent. pH kolbides nr 2, 3 ja 4 viiakse väärtuseni 7,0.

**VII.2.5. Katse tegemine**

Kolvid nr 2, 3 ja 4 (katsesuspensioonid), nr 5 (inokulaadi aktiivsuse kontrollproov) ja nr 6 (inokulaadiga nullproov) inokuleeritakse sellise väikese koguse inokulaadiga, et hõljumi kontsentratsioon segus oleks 30 mg/l. Abioteelise kontrollproovi kolvis nr 1 ei inokuleerita. Katseaparatuur pannakse kokku, kontrollitakse seadme hermeetilisust, käivitatakse segajad ja alustatakse pimeduses hapnikutarbe mõõtmist. Iga päev kontrollitakse temperatuuri, segajaid ja kulonomeetrilist hapnikutarbe meerikut ning märgitakse üles kõik kolbide sisu värvuse muutused. Sobival moel, näiteks kuue kanaliga meeriku abil jälgitakse vahetult kõigi kolbide BHT-d. Inkubatsiooni-perioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva möödumisel, mõõdetakse kolbide pH ja määratakse testaine jääkkontsentratsioon, kõigi vaheühendite kontsentratsioonid ja vees lahustuva ühendi puhul DOC kontsentratsioon (II.4 liide). Lenduvate kemikaalide puhul tuleb olla eriti hoolikas. Kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, mõõdetakse võimaluse korral nitriti ja nitraadi kontsentratsioon.

**VII.3. ANDMED JA ARUANDLUS****VII.3.1. Tulemuste käsitlemine**

Testaine hapnikutarve (mg) kindla aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st:

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutarve ve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve ve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg)/testaine (mg).

**▼B**

Biologundumise protsent arvutatakse seejärel valemist:

$$\text{biologundumise protsent} = \text{ThOD\%} \frac{\text{BHT (O}_2\text{(mg)/testain e (mg))}}{\text{ThOD (O}_2\text{(mg)/testain e (mg))}} \times 100$$

Segude puhul arvutatakse ThOD elementanalüüsi tulemuste põhjal, käsitledes segu ühendina. Kasutada tuleb asjakohast ThOD-d (ThOD<sub>NH4</sub> või ThOD<sub>NO3</sub>) vastavalt nitrifikatsiooni toimumisele või mittetoimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, tehakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus, mis arvutatakse välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Spetsiifilise (lähte-)aine kao järgi arvutatakse esmase biologundumise protsent (vt I.7.2).

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

Kui testaine sisaldus füüsikalise-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, registreeritakse see ja selles kolvis ( $S_b$ ) oleva testaine kontsentratsiooni kasutatakse 28 päeva möödumisel biologundumise protsendi arvutamisel.

DOC analüüside (pole kohustuslik) tegemisel arvutatakse biologundumise protsent valemist:

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

vastavalt kirjeldusele punktis I.7.1. Kui DOC sisaldus füüsikalise-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, kasutatakse DOC kontsentratsiooni selles kolvis biologundumise protsendi arvutamisel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

### VII.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg O<sub>2</sub>/l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

Kui hapnikutarbe põhjal arvutatud aniliini lagunemisprotsent ei ole 7 päeva jooksul suurem kui 40 % ja 14 päeva jooksul suurem kui 65 %, loetakse katse tühiuks.

### VII.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

### VII.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

MITI (I) KATSE

#### 1. LABOR

#### 2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

**▼B****3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses,  $C_0$ : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)Katseseгу maht,  $V$ : ... mlThOD: ... mg  $O_2$ /l**4. INOKULAAT**

Mudavõtukohad:

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

Hõljumi kontsentratsioon aktiivmudas pärast sünteetilise reoveega aklimatiseerimist = ... mg/l

Aktiivmuda maht liitri lõpliku lahuse kohta = ... ml

Muda kontsentratsioon lõplikus lahuses = ... mg/l

**5. HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS**

Kasutatava respiromeetri tüüp:

		Aeg (päevades)				
		0	7	14	21	28
Hapnikutarve (mg), testaine	$a_1$					
	$a_2$					
	$a_3$					
Hapnikutarve (mg), nullproov	$b$					
Parandatud hapnikutarve (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$					
BHT mg testaine kohta	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	1. kolb				
		2. kolb				
		3. kolb				
Lagunemisprotsent $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1				
		2				
		3				
		Keskmine (*)				

(\*) Kordustlemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

**▼B**

NB: Võrdlusaine jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

**6. SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Kolb	DOC			DOC kõrvaldamisprotsent	Keskmine
	Mõõdetud	Parandatud			
Vesi + testaine	a			—	—
Muda + testaine	b <sub>1</sub>		b <sub>1</sub> -c		
Muda + testaine	b <sub>2</sub>		b <sub>2</sub> -c		
Muda + testaine	b <sub>3</sub>		b <sub>3</sub> -c		
Testaineta kontrollproov	c		—	—	—

$$\text{kõrvaldamisprotsent} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

**7. SPETSIIFILISE KEEMILISE ANALÜÜSI ANDMED**

	Testaine jääk katse lõpus	Lagunemisprotsent
Nullproov veega	S <sub>b</sub>	
Inokuleeritud toitelahus	S <sub>a1</sub>	
	S <sub>a2</sub>	
	S <sub>a3</sub>	

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

Lagunemisprotsent arvutatakse kolbide a, a<sub>2</sub> ja a<sub>3</sub> puhul.

**8. MÄRKUSED**

Lisada tuleks BHT kõver ajas, kui see koostati.

**▼B***I liide***LÜHENDID JA MÕISTED**

- DO: lahustunud hapnik (mg/l) on vesikeskkonnaga proovis lahustunud hapniku kontsentratsioon.
- BHT: bioloogiline hapnikutarve (g) on mikroorganismide poolt testaine metaboliseerimisel tarvitatud hapniku kogus, väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.5).
- KHT: keemiline hapnikutarve (g) on testaine oksüdeerimisel kuuma happelise dikromaadiga tarvitatud hapniku kogus, näitab oksüdeeritava materjali sisaldust; väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.6).
- DOC: lahustunud orgaaniline süsinik on lahuses olev süsinik, mis läbib 0,45 µm filtri või jääb supernatanti 15minutilise tsentrifuugimisel 40 000 m/s<sup>-2</sup> (± 4 000 g) juures.
- ThOD: teoreetiline hapnikutarve (mg) on aine täielikuks oksüdeerimiseks vajalik hapnikukogus; arvutatakse brutovalemi järgi (vt II liite punkti 2) ning väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena.
- ThCO<sub>2</sub>: teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib katseühendi teadaolevast või määratud süsinikusisaldusest katseühendi täielikul mineraliseerumisel; väljendatakse ka mg katseühendi kohta eraldunud süsinikdioksiidi kogusena (mg).
- TOC: proovi kogu orgaaniline süsinik on lahuses ja suspensioonis oleva orgaanilise süsiniku sisalduse summa.
- IC: anorgaaniline süsinik.
- TC: üldsüsinik on proovis oleva orgaanilise ja anorgaanilise süsiniku summa.

*Esmane biolagundumine:*

bioloogilistest toimest tingitud muutus aine keemilises struktuuris, mille tulemusel see aine kaotab mingi spetsiifilise omaduse.

*Lõplik biolagundumine (aeroobne):*

lagunemise määr, mille puhul mikroorganismid on katseühendi täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalooladeks ja uute mikroobsete rakkude osaks (biomassiks).

*Bioloogiliselt kergesti lagunduv.*

teatavad kindlaksmääratud lõpliku biolagunduvuse sõelkatsed läbinud kemikaalide rangelt määratlemata klassifikatsioon; need katsed on nii ranged, et võib eeldada, et veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes biolagunduvad need ühendid kiiresti ja täielikult.



**▼ B***Potentsiaalselt biolagunduv:*

klassifikatsioon kemikaalide puhul, mille (esmase või lõpliku) biolagunduvuse kohta mis tahes tunnustatud biolagunduvuse katses on kindlaid tõendeid.

*Biotöödeldavus:*

ühendite kõrvaldatavus biopuhastusjaamades, rikkumata puhastusprotsesside normaalset käiku. Üldjuhul on bioloogiliselt kergesti lagunduvad ühendid biotöödeldavad, samal ajal kui kõik potentsiaalselt biolagunduvad ühendid ei ole biotöödeldavad. Toimida võivad ka abiootilised protsessid.

*Ooteaeg:*

kõrvaldamiskatses ajavahemik inokulatsioonist kuni hetkeni, kus lagunemine on jõudnud vähemalt 10 %ni. Ooteaja pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

*Lagunemisaeg:*

aeg ooteaja lõpust hetkeni, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

*Kümnepäevane aken*

on 10 % lagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

**▼B**

## 2. liide

**SOBIVATE SUMMAARSETE PARAMEETRITE ARVUTAMINE JA MÄÄRAMINE**

Olenevalt valitud meetodist on vajalikud teatavad summaarsed parameetrid. Järgmine jaotis kirjeldab nende väärtuste leidmist. Nende parameetrite kasutamist on kirjeldatud üksikute meetodite juures.

**1. Süsinikusisaldus**

Süsinikusisaldus arvutatakse testaine teadaoleva elemendilise koostise põhjal või määratakse elementanalüüsil.

**2. Teoreetiline hapnikutarve (ThOD)**

Teoreetilise hapnikutarbe (ThOD) saab arvutada siis, kui elemendiline koostis on teada või määratakse elementanalüüsil. Järgmise ühendi puhul:



on see nitrifikatsiooni mitteesisemisel

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

ja nitrifikatsiooni esinemisel

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

**3. Keemiline hapnikutarve (KHT)**

Keemiline hapnikutarve (KHT) määratakse meetodi C.6 kohaselt.

**4. Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC)**

Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) on määratletud kui mis tahes vees oleva, 0,45 µm filtrit läbiva aine või segu koostises olev orgaaniline süsinik.

Katseanumatest võetakse proovid ja filtritakse kohe sobiva membraanfiltriga filtrimisseadmes. Esimesed 20 ml filtraati (väikeste filtrite kasutamisel võib kogust vähendada) jäetakse kõrvale. 10–20 ml või süstimisel väiksemad kogused (maht sõltub süsinikuanalüsaatori jaoks vajalikust kogusest) jäetakse süsiniku analüüsiks alles. DOC kontsentratsioon määratakse orgaanilise süsiniku analüsaatori abil, mis suudab täpselt mõõta süsiniku kontsentratsiooni, mis on 10 % DOC kontsentratsioonist katse alguses või sellest madalam.

Filtritud proove, mida ei saa analüüsida samal tööpäeval, võib säilitada külmikus 2–4 °C juures kuni neli tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

*Märkused:*

Membranfiltrid on sageli hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega. Seega võib filter sisaldada mitu mg lahustuvat orgaanilist süsinikku, mis segaks biolagunduvuse määramist. Pindaktiivsed ained ja muud lahustuvad orgaanilised ühendid kõrvaldatakse filtritest kolme tunniajase keetmisega deioniseeritud vees. Filtreid võib seejärel nädal aega vees hoida. Ühekordse filterpadruni kasutamisel tuleb iga partii puhul kontrollida, et see ei eralda lahustuvat orgaanilist süsinikku.

**▼B**

Olenevalt membraanfiltrit tüübist võib testaine sellele adsorbeeruda. Seetõttu on soovitatav veenduda, et testainet filtrisse ei jää.

DOC eristamisel TOCst võib filtrimise asemel kasutada 15minutilist tsentrifuugimist  $40\,000\text{ m/s}^2$  (4 000 g) juures. Kui DOC algkontsentratsioon on alla 10 mg/l, ei ole see meetod usaldusväärne, kuna kõiki baktereid ei kõrvaldata või lahustatakse osa süsinikust bakteriplasmas.

*KIRJANDUS*

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.
- DIN-Entwurf 388 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammunter-schlammunter-suchung, Summarische Wirkungs- and Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschußnormenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984,984, vol 133 (1), 169.

*3. liide***VÄHELAHUSTUVATE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE**

Biolagunduvuse katsetes vähelahustuvate ainetega tuleks erilist tähelepanu pöörata järgmistele asjaoludele.

Sellal kui homogeensed vedelikud tekitavad proovi võtmisel harva probleeme, on soovitatav tahked ained sobival moel homogeniseerida, et vältida mittehomoogeensusest tingitud vigu. Eriti hoolikas tuleb olla siis, kui on vaja mõnemilligrammised proove suure lisandite sisaldusega segudest või ainetest.

Katsete käigus võib kasutada mitmesuguseid loksutamiskiive. Loksutada tuleks ainult aine dispergeerituna hoidmiseks vajalikul määral, vältides hoolikalt ülekuumutamist, liigset vahutamist ja liigseid nihkejõude.

Kasutada võib emulgaatorit, mille abil saadakse aine stabiilne dispersioon. Emulgaator ei tohiks olla bakteritele mürgine ega olla katse tingimustel biolagunduv või vahtu tekitav.

Lahustitele kehtivad samad nõuded nagu emulgaatoritele.

Tahkete testainete puhul ei ole tahkeid kandjaid soovitatav kasutada, küll aga võivad need olla sobivad õlitaoliste ainete puhul.

Abiainete, nagu emulgaatorite, lahustite ja kandjate kasutamisel tuleks teha nullproov abiainega.

Vähelahustuvate ühendite biolagunduvuse uurimiseks sobivad respiromeetristest katsetest nii CO<sub>2</sub>, BHT kui ka MITI katse.

*KIRJANDUS*

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

*IV liide***INOKULAADI SUHTES OLETATAVALT MÜRGISTE AINETE  
BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE**

Kui aine osutub kohese biolagunduvuse katses näiliselt mittelagunevaks, on inhibeerivuse ja inertsuse eristamise vajaduse korral soovitatav kasutada järgmist meetodit (Reynolds jt, 1987).

Mürgisuse ja biolagunduvuse katsetes tuleks kasutada samasuguseid või identseid inokulaate.

Kohese biolagunduvuse katsetes uuritud ainete mürgisuse hindamiseks peaks sobima muda hapnikutarbe inhibeerimise (aktiivmuda hapnikutarbe inhibeerimiskatse – direktiiv 88/302/EMÜ), BHT ja/või kasvu pidurdumise meetodid või nende kombinatsioon.

Kui mürgisusest tulenevat inhibeerumist soovitakse vältida, on kohese biolagunduvuse katsetes soovitatav kasutada testaine kontsentratsioone, mis on väiksemad kui 1/10 mürgisuse katsetes leitud EC<sub>50</sub> väärtustest (ehk väiksemad kui EC<sub>20</sub> väärtused). Ühendite puhul, mille EC<sub>50</sub> on kõrgem kui 300 mg/l, kohese biolagunduvuse katsetes tõenäoliselt mürgist mõju ei ilmne.

EC<sub>50</sub> väärtused alla 20 mg/l tekitavad järgnevates katsetes eeldatavalt tõsiseid probleeme. Kasutada tuleks madalaid katsekontsentratsioone, mistõttu tuleb kasutada ranget ja tundlikku kinnise pudeli katset või <sup>14</sup>C-märgistatud materjali. Aklimatiseerunud inokulaat võib võimaldada kasutada testaine kõrgemaid kontsentratsioone. Viimasel juhul ei ole aga täidetud kohese biolagunduvuse katse konkreetne kriteerium.

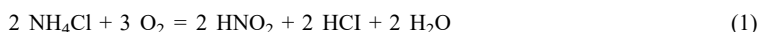
*KIRJANDUS*

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

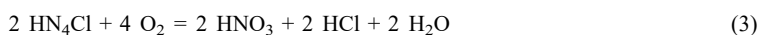
**▼B***V Liide***NITRIFIKATSIOONI HAPNIKUTARVET ARVESTAV PARANDUS**

Lämmastikku mittesisaldavate testainete puhul on nitrifikatsiooni arvestamatajätmisest tingitud viga testainete biolagundumise hapnikutarbe hindamisel tühine (ei ületa 5 %), isegi kui toitelahuse ammoniakaalse lämmastiku oksüdatsioon toimub ebaühtlaselt, näiteks erinevustega testainega pudelite ja nullproovidega anumate vahel. Lämmastikku sisaldavate testainete puhul võivad aga ilmnedä tõsised vead.

Kui nitrifikatsioon on toimunud, kuid ei ole täielik, võib nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutuste määramisel parandada segu mõõdetud hapnikutarvet järgmistele valemitele põhjal ammoniumiooni nitritiks ja nitraadiks oksüdeerimisel kuluva hapnikukoguse võrra:



Summaarselt:



Valemi 1 põhjal kulub ammoniumkloriidi ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) koosseisus oleva 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitritiks 96 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 3,43 (96/28). Samamoodi kulub valemi 3 põhjal 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitraadiks 128 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 4,57 (128/28).

Kuna need reaktsioonid on järjestikused ja neid viivad läbi erinevad bakteriliigid, võib nitriti kontsentratsioon nii väheneda kui ka suurendada; viimasel juhul tekib vastav kogus nitraati. Seega on nitraadi tekkel kuluv hapnikukogus 4,57kordne nitraadi kontsentratsiooni tõusuga võrreldes, sellal kui nitriti tekkel kuluv hapnikukogus on 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni tõusuga võrreldes ning nitriti kontsentratsiooni vähenemisega seotud hapnikukadu – 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni vähenemisega võrreldes.

Seega:

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitraadi tekkel} = 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (4)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitriti tekkel} = 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni tõus} \quad (5)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kadu nitriti kadumisel} = -3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni vähenemine} \quad (6)$$

Seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitrifikatsioonil} = \pm 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni muutus} + 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (7)$$

ja seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu süsiniku oksüdeerimisel} = \text{vaadeldud kogutarve} - \text{nitrifikatsioonist tingitud tarve} \quad (8)$$

Ainult summaarse oksüdeeritud lämmastiku hulga määramisel võib nitrifikatsioonist tingitud hapnikutarbe lugeda esimeses lähenduses oksüdeeritud lämmastiku hulga võrreldes 4,57kordseks.

Süsiniku oksüdeerimise hapnikutarbe parandatud väärtust võrreldakse seejärel 2. liite kohaselt arvatud  $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$  väärtusega.

**▼B****C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse tahkete või vedelate orgaaniliste ainete bioloogilist hapnikutarvet (BHT).

Katses leitud andmed kehtivad vees lahustuvate ühendite puhul; siiski võib vähemalt põhimõtteliselt uurida ka lenduvaid ja vees vähelahustuvaid ühendeid.

Meetod on kohaldatav ainult sellistele uuritavatele orgaanilistele katsematerjalidele, mis ei mõju katses kasutatavatel kontsentratsioonidel bakteritele inhibeerivalt. Kui uuritav materjal katsekonsentratsioonil ei lahustu, võib selle hea dispergeerituse saavutamiseks vaja olla erimeetmeid, näiteks ultrahelidispergeerimist.

Madalate biolagunduvuse väärtuste tõlgendamisel ja sobivate katsekonsentratsioonide valikul võivad kasulikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

BHT määratakse kindla koguse aine lahuse ettenähtud tingimustel biokeemiliseks oksüdeerimiseks vajaliku lahustunud hapniku massina.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Soovitav on kontrollida inokulaadi aktiivsust sobiva võrdlusaine abil.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindel kogus sobivas hästi aereeritud lahuses lahustatud või dispergeeritud ainet inokuleeritakse mikroorganismidega ja inkubeeritakse pimedas kindlaksmääratud konstantse temperatuuriga ruumis.

BHT määratakse lahustunud hapniku sisalduse vahe järgi katse algul ja lõpul. Katse kestus peab olema vähemalt viis ja mitte rohkem kui 28 päeva.

Paralleelselt tuleb teha testaineta nullproov.

**1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID**

BHT määramist ei saa lugeda aine usaldusväärseks biolagunduvuse määramise meetodiks. Meetod sobib kasutamiseks ainult sõelkatsena.

**1.6. MEETODI KIRJELDUS**

Ainest valmistatakse lähtelahus või dispersioon, mille BHT sobiks kasutatava meetodiga. Seejärel määratakse mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standardmeetodi abil BHT.

**▼ B****2. ANDMED JA HINDAMINE**

Lähtelahuse BHT arvutatakse vastavalt valitud standarditud meetodile ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

**3. ARUANDLUS**

Ära tuleb märkida kasutatud meetod.

Bioloogilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme nõuetekohase mõõtmise keskmine tulemus.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti aine lisandeid, füüsikalist olekut, mürgisust ja koostist käsitlevad andmed ja märkused.

Kui bioloogilise nitrifikatsiooni pidurdamiseks kasutatakse lisaainet, tuleb see ära märkida.

**4. VIITED**

Näitlike standardmeetodite nimekiri:

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

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

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

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



**▼B****C.6. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse valitud standarditud, kindlaks-määratud laboritingimustel tahkete või vedelate orgaaniliste ainete keemilist hapnikutarvet (KHT).

Katse tegemisel ja saadud tulemuste tõlgendamisel on kasulik teada aine struktuuri (nt orgaaniline halogeniidsool, orgaaniline Fe<sup>++</sup> sool, kloororgaaniline ühend).

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Keemiline hapnikutarve iseloomustab aine oksüdeeritavust ja seda väljendatakse kindlaks-määratud laboritingimustel aine oksüdeerimiseks kulunud oksüdeerija kogusele vastava hapniku kogusena.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

**1.3. VÕRDLUSAINED**

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi kalibreerimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindlaks-määratud kogust vees lahustatud või dispergeeritud ainet oksüdeeritakse kahe tunni jooksul tagasijooksuga kuumutamisel kaaliumdikromaadiga kontsentreeritud väävelhappes, hõbesulfaatkatüsaatori juuresolekul. Dikromaadi jääk määratakse raud(II)ammooniumsulfaadi standardlahusega tiitrimisel.

Kloori sisaldavate ühendite puhul lisatakse kloori segava mõju vähendamiseks elavhõbesulfaati<sup>(1)</sup>.

**1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID**

Rangelt määratlemata määramismeetodi tõttu on KHT „oksüdeeritavuse näitaja” ja on sellisena praktiline meetod orgaanilise aine sisalduse määramiseks.

Katset võib segada kloorisisaldus; KHT määramist võivad segada ka anorgaanilised redutseerijad ja oksüdeerijad.

Mõned tsüklilised ühendid ja paljud lenduvad ained (nt madalamad rasvhapped) ei oksüdeeru selles katses täielikult.

**1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS**

Ainest valmistatakse lähtelahus või -dispersioon, mille KHT jääb vahemikku 250–600 mg/l.

<sup>(1)</sup> Pärast kasutamist tuleb elavhõbedasooli sisaldavad lahused ümber töödelda, et vältida elavhõbeda sattumist loodusesse.

**▼B***Märkused*

Vähelahustuvate või mittedispergeeruvate ainete puhul võib kaaluda 5 mg KHT-le vastava koguse peenestatud ainet või vedelikku ja viia selle koos veega katseseadmesse.

Sageli ja eriti vähelahustuvate ainete puhul määratakse KHT meetodi ühe variatsiooni kohaselt, st suletud rõhuühtlustajaga süsteemis (H. Kelkenberg, 1975). Selle modifitseeritud meetodi abil saab edukalt uurida ka tavameetodi abil raskesti uuritavaid aineid, nt äädikhapet. Püridiiniga see meetod aga ei toimi. Kui kaaliumdikromaadi kontsentratsioon viiakse viite 1 kohaselt väärtuseni 0,0416 M (0,25 N), võimaldab see 5–10 mg ainet otse sisse kaaluda, mis on vees vähelahustuvate ainete KHT määramisel väga oluline (viide 2).

Muul juhul määratakse KHT seejärel mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standarditud meetodi abil.

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Kolvi sisu KHT arvutatakse valitud standarditud meetodi abil ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

3. **ARUANDLUS**

Ära tuleks märkida kasutatud standardmeetod.

Keemilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme mõõtmise keskmine tulemus. Registreerida tuleb kõik teadaolevad tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti tulemusi aine lisandeid, füüsikalist olekut ja omadusi käsitlevad andmed ja märkused.

Ära tuleb märkida elavhõbesulfaadi lisamine kloori segava mõju vähendamiseks.

4. **VIITED**

- 1) Kelkenberg, H., Z. Von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- 2) Gerike, P The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, 984, vol. 13, 169.

Standardmeetodite näidisloend:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

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

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

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

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

**▼B****C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDROLÜÜSI SÖLTUVUS pHst****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 111 (2004).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kemikaalid võivad sattuda pinnavette otsese kasutamise, pritsmete edasikandumise, äravoolu, drenaaži, jäätmete kõrvaldamise, tööstus-, olme- või põllumajandusheitvee ja atmosfäärisademetega ning võivad pinnavees muunduda keemiliste (nt hüdrolüüs, oksüdatsioon), fotokeemiliste ja/või mikrobioloogiliste protsesside teel. Käesolevas suunises kirjeldatakse laboratoorset katsemeetodit kemikaalide abiootilise hüdrolüütilise muundumise hindamiseks veesüsteemides pH väärtuste juures, mis esinevad tavaliselt keskkonnas (pH 4–9); meetod põhineb olemasolevatel suunistel (1–7).

Katsetega määratakse kindlaks i) uuritava aine hüdrolüüsi kiirus pH funktsioonina ja ii) hüdrolüüsisaaduste, millega organismid võivad kokku puutuda, koostis või laad ning tekkimis- ja lagunemiskiirus. Selliseid uuringuid võib olla vaja kemikaalide puhul, mida juhitakse otse vette või mis võivad sattuda keskkonda muudel eespool kirjeldatud viisidel.

**1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD**

Vt 2. liidet.

**1.3. KATSEMEETODI KASUTUSALA**

Meetod on üldiselt kasutatav (märgiseta või märgisega) keemiliste ainete puhul, mille jaoks on olemas piisava täpsuse ja tundlikkusega määramismeetod. Seda saab kasutada vähelenduva või lendumatu ühendi puhul, mis lahustub piisavalt hästi vees. Käesoleva meetodiga ei tuleks uurida kemikaali, mis lendub vesilahusest väga kergesti (nt fumigant, orgaaniline lahusti) ja mida seetõttu ei saa hoida lahuses käesoleva katse tingimustes. Katset võib olla raske teha vees väga vähe lahustuva ainega (8).

**1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Uuritav aine viiakse pH eri väärtusega (pH 4, 7 ja 9) steriilsetesse vesipuhverlahustesse ja neid inkubeeritakse kontrollitud laboritingimustes pimedas (püsival temperatuuril). Pärast ettenähtud ajavahe- mike möödumist määratakse puhverlahuses uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste sisaldus. Märgisega (nt <sup>14</sup>C) aine puhul on kergem koostada massibilanssi.

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse astmelist lähenemisviisi, mida on näidatud ja selgitatud 1. liites. Iga järgmine aste sõltub eelmise tulemustest.

**▼B**

## 1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Hüdrolüüsi kiiruse mõõtmiseks saab kasutada märgiseta või märgisega ainet. Märgisega ainet tuleb hüdrolüüsitee uurimisel ja massibilansi koostamisel üldiselt eelistada; siiski ei pruugi märgisega aine kasutamine olla erijuhtudel tingimata vajalik. Soovitatakse kasutada  $^{14}\text{C}$ -märgist, kuid teiste isotoopide, näiteks  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$  tarvitamine võib samuti kasulik olla. Märgisega aatom peaks võimaluse korral paiknema molekuli kõige stabiilsema(te)s osa(de)s. Kui uuritav aine sisaldab näiteks ühte tsükli, peaks märgis olema selles tsükli; kui uuritav aine sisaldab kaht või enam tsükli, võib olla vaja eraldi uuringuid, et hinnata iga märgisega tsükli muundumisi ja saada vajalikku teavet hüdrolüüsisaaduste moodustumise kohta. Uuritava aine puhtus peab olema vähemalt 95 %.

Enne hüdrolüüsitakse tegemist peab olema olema järgmine teave uuritava aine kohta:

- a) lahustuvus vees (katsemeetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (katsemeetod A.4) ja/või Henry konstant;
- d) jaotuskoeffitsient süsteemis n-oktaanol/vesi (katsemeetod A.8);
- e) dissotsiatsioonikonstant ( $\text{pK}_a$ ) (OECD suunis 112) (viide 9);
- f) otsese ja kaudse fototransformatsiooni kiirus vees (vajaduse korral).

On vaja määramismeetodeid uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks ning vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks määramiseks vesilahuses (vt ka punkt 1.7.2).

## 1.6. VÕRDLUSAINED

Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemiseks ja kvantitatiivseks määramiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite või muude piisavalt tundlike meetodite abil tuleks võimaluse korral kasutada võrdlusaineid.

## 1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

## 1.7.1. Saagis

Uuritava aine määramine puhverlahustest või nende ekstraktidest vähemalt kahes paralleelkatses kohe pärast uuritava aine lisamist annab esimese ettekujutuse määramismeetodi ja uuritava aine lisamise korratavusest. Hilisemate katsestaadiumide puhul saab määramissaagised leida vastavate massibilansside alusel (kui kasutatakse märgisega ainet). Määramissaagis peaks nii märgisega kui ka märgiseta kemikaali puhul olema vahemikus 90–110 % (7). Kui tehniliselt on sellist vahemikku raske saavutada, on 70 %line saagis märgiseta kemikaali puhul lubatav, kuid seda tuleb põhjendada.

**▼B****1.7.2. Määramismeetodi korratavus ja tundlikkus**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste kvantitatiivsel määramisel hiljem kasutatava(te) meetodi(te) korratavust saab kontrollida samade puhverlahuste (või nende ekstraktide) paralleelmääramistega siis, kui määramiseks on tekkinud piisav kogus hüdrolüüsisaadusi.

Määramismeetod peab olema piisavalt tundlik, et määrata katseaine kontsentratsioone 10 % või vähem algest kontsentratsioonist. Vajaduse korral peavad analüüsimeetodid olema ka piisavalt tundlikud, et määrata hüdrolüüsisaaduste kogust, mis moodustab 10 % või enam (ükskõik millisel uuringu hetkel) lisatud kogusest või 25 % või vähem selle saaduse maksimaalsest kontsentratsioonist.

**1.7.3. Hüdrolüüsi kineetiliste andmete usaldusvahemikud**

Kõigi regressioonikoefitsientide, kiiruskonstantide, poolestusaegade ja muude (nt DT50) kineetiliste parameetrite väärtuste jaoks tuleks arvutada ja esitada usaldusvahemikud.

**1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS****1.8.1 Laborivarustus ja seadmed**

Uuring tuleb teha klaasnõudes (nt katseklaasid, väikesed kolvid), vajaduse korral pimedas ja steriilsetes tingimustes, välja arvatud juhul, kui eelnev teave (nagu jaotuskoefitsient n-oktanooli/vee süsteemis) viitab sellele, et uuritav aine võib adsorbeeruda klaasile. Sellistel juhtudel tuleb võib-olla kaaluda muude materjalide (näiteks Teflon®) kasutamist. Klaasile adsorbeerumise mõju saab vähendada ka järgmiste meetoditega:

- katseanuma külge sorbeerunud uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste massi määramine;
- ultrahelivanni kasutamine;
- kõigi klaasnõude pesemine lahustiga iga katseintervalli ajal;
- kaubanduslikku segu jäljendavate toodete kasutamine;
- suurema koguse kaaslahusti kasutamine uuritava aine lisamiseks süsteemile; kui kasutatakse kaaslahustit, peab see olema selline, mis ei hüdrolüüsi uuritavat ainet.

Tavaliselt on vajalikud kontrollitava temperatuuriga vesivann-loksutid või termostateeritavad inkubaatorid eri katselahuste inkubeerimiseks.

Vaja läheb standardset laborivarustust, eriti järgmisi seadmeid:

- pH-meeter;

**▼B**

- analüüsiseadmed, nagu GC-, HPLC-, TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud seadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta ainete määramiseks või isotooplahjenduse pöördmeetodi kasutamiseks;
- seadmed identifitseerimise jaoks (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, TMR jne);
- vedelik-stsintillatsiooniloendaja;
- jaotuslehtrid vedelik-vedelik-ekstraktsiooni jaoks;
- seadmed lahuste ja ekstraktide kontsentreerimiseks (nt rotaatoraurusti);
- temperatuuri kontrollimise vahend (nt veevann).

Keemiareagentidest läheb vaja näiteks järgmisi:

- analüüsi puhtad orgaanilised lahustid, nagu heksaan, dikloromeetan jne;
- stsintillatsioonivedelik;
- puhverlahused (lähemalt vt punktist 1.8.3).

Kõik hüdrolüüsikatsetes kasutatavad klaasnõud, analüütilise puhtusega vesi ja puhverlahused peavad olema steriliseeritud.

### 1.8.2. Uuritava aine lisamine

Uuritav aine tuleb lisada vesilahusena erinevatesse puhverlahustesse (vt 3. liidet). Lahustumise parandamiseks on lubatud kasutada väikest kogust veega segunevat lahustit (nagu atsetonitriil, atsetoon, etanool), kuid lahusti kontsentratsioon ei tohi tavaliselt ületada 1 mahuprotsenti. Kõrgemat lahusti kontsentratsiooni võib kasutada (nt halvasti lahustuva uuritava aine puhul) ainult siis, kui saab näidata, et lahusti ei mõjuta uuritava aine hüdrolüüsi.

Kaubanduslikku segu jäljendava toote kasutamist üldiselt ei soovitata, kuna ei saa välistada, et segu koostisosad mõjutavad hüdrolüüsi. Siiski võib kaubanduslikku segu jäljendava materjali kasutamine olla sobiv lahendus vees halvasti lahustuva või klaasile adsorbeeruva uuritava aine puhul (vt punkti 1.8.1).

Tuleks kasutada ühte uuritava aine kontsentratsiooni; see ei tohiks ületada 0,01 M või poolt küllastuskontsentratsiooni (vt 1. liidet).

**▼B****1.8.3. Puhverlahused**

Hüdroolüüsikatsed tuleks sooritada pH väärtuste 4, 7 ja 9 juures. Selleks tuleb puhverlahuste valmistamisel kasutada analüüsi puhtaid kemikaale ja vett. Mõned sobivad puhversüsteemid on esitatud 3. liites. Tuleb märkida, et kasutatav puhversüsteem võib mõjutada hüdroolüüsi kiirust ja sellistel juhtudel tuleb kasutada alternatiivset puhversüsteemi <sup>(1)</sup>.

Iga puhverlahuse pH väärtust tuleb kontrollida kalibreeritud pH-meetriga, mille täpsus on vähemalt 0,1 nõutava temperatuuri juures.

**1.8.4. Katsetingimused****1.8.4.1. Katsetemperatuur**

Hüdroolüüsikatsed tuleb teha konstantse temperatuuri juures. Ekstrapoleerimise eesmärgil on oluline hoida temperatuuri vahemikus vähemalt  $\pm 0,5$  °C.

Kui uuritava aine hüdroolüüsi kohta ei ole midagi teada, tuleks teha eelkatse temperatuuril 50 °C (1. aste). Edasiste astmete kineetilised katsed tuleb teha vähemalt kolmel temperatuuril (kaasa arvatud katse 50 °C juures), välja arvatud juhul, kui 1. astme katse selgub, et uuritav aine on hüdroolüüsi suhtes stabiilne. Soovitatav temperatuurivahemik on 10–70 °C (eelistatavalt tuleks kasutada vähemalt ühte temperatuuri alla 25 °C); see hõlmab standardtemperatuuri 25 °C ja enamikku välitingimustes esinevaid temperatuure.

**1.8.4.2. Valgus ja hapnik**

Kõik hüdroolüüsikatsed tuleb teha, kasutades sobivaid meetodeid fotolüüsi vältimiseks. Tuleb võtta kõik sobivad meetmed hapniku toime vältimiseks (nt barboteerimine heeliumi, lämmastiku või argooniga viie minuti jooksul enne lahuse valmistamist).

**1.8.4.3. Katse kestus**

Eelkatse kestab viis päeva, samal ajal kui kõrgemate astmete katsed tehakse kuni 90 %lise hüdroolüüsini või kestavad 30 päeva, sõltuvalt sellest, kumb aeg on lühem.

**1.8.5. Katse käik****1.8.5.1. Eelkatse (1. aste)**

Eelkatse tehakse temperatuuril  $50 \pm 0,5$  °C pH väärtuste 4,0, 7,0 ja 9,0 juures. Kui viie päeva pärast täheldatakse alla 10 %list hüdroolüüsi ( $t_{0,5\ 25}$  °C juures > 1 aasta), peetakse uuritavat ainet hüdroolüüsi suhtes stabiilseks ja tavaliselt ei ole täiendavaid katseid vaja. Kui katseaine on teadaolevalt ebastabiilne keskkonna mõistes oluliste temperatuuride juures, <sup>(2)</sup> ei ole eelkatset vaja teha. Analüüsimeetod peab olema piisavalt täpne ja tundlik, et avastada esialgse kontsentratsiooni 10 %list vähenemist.

<sup>(1)</sup> Mabey ja Mill soovivad fosfaatpuhvri asemel kasutada boraat- või atsetaatpuhvreid (11).

<sup>(2)</sup> Selline teave võib pärineda muudest allikatest, nagu samalaadse struktuuriga ühendite hüdroolüüsi andmed kirjandusest või muud poolkvantitatiivsed hüdroolüüsi eelkatsed uuritava ainega varasemas väljaandamisetapis.

**▼B**1.8.5.2. *Ebastabiilse aine hüdrolüüs (2. aste)*

Kõrgema astme katse sooritatakse pH väärtustel, mille juures uuritava aine leiti olevat ebastabiilne vastavalt eespool toodud eelkatse määratlusele. Katseaine puhverdatud lahused termostateeritakse valitud temperatuuridel. Et kontrollida, kas tegemist on 1. järgu reaktsiooniga, tuleb iga reaktsioonilahust analüüsida ajavahemike järel, millega saadakse vähemalt kuus eraldi paiknevat andmepunkti uuritava aine 10–90 %lise hüdrolüüsi vahel. Võetakse individuaalsed paralleelsed proovid (vähemalt kaks proovi eraldi reaktsiooninõudest) vähemalt kuuel proovivõtuajal ja nende sisu analüüsitakse (et saada vähemalt kaksteist paralleeliga andmepunkti). Ühe koondproovi kasutamist, millest igal proovivõtuajal võetakse uuritava aine lahuse individuaalsed alikvoodid, peetakse ebapiisavaks, kuna see ei võimalda analüüsida andmete varieeruvust ja võivad tekkida raskused uuritava aine lahuse saastumise tõttu. Kõrgema astme katse lõpus (st 90 %lise hüdrolüüsi juures või 30 päeva möödudes) tuleb näidata, et lahuse steriilsus on säilinud. Kui lagunemist (st muundumist) ei täheldata, ei peeta steriilsuse katseid siiski vajalikuks.

1.8.5.3. *Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemine (3. aste)*

Sobivate määramismeetoditega tuleb kindlaks teha kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt sellised, mis moodustavad üle 10 % kasutatud kogusest.

1.8.5.4. *Mittekohustuslikud katsed*

Kergesti hüdrolüüsitava uuritava aine puhul võivad olla vajalikud lisakatsed muudel pH väärtustel kui 4, 7 ja 9. Näiteks võib füsioloogiaga seotud eesmärkidel olla vajalik teha katse happelisemates tingimustes (nt pH 1,2) füsioloogiliselt olulise temperatuuri (37 °C) juures.

**2. ANDMED**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste (kui neid on vaja uurida) kogused iga proovivõtuintervalli ning iga pH ja katsetemperatuuri puhul esitatakse, kui see on asjakohane, protsendina esialgselt kasutatud kontsentratsioonist ning vajaduse korral ühikutes mg/l. Kui kasutati määrgisega ainet, tuleb lisaks esitada massibilans protsendina esialgselt kasutatud kontsentratsioonist.

Tuleb koostada graafik uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi sõltuvuse kohta ajast. Kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt need, mis moodustavad  $\geq 10$  % kasutatud kogusest, tuleb kindlaks teha ja esitada nende kontsentratsiooni logaritmid samal viisil graafikul nagu nende lähteainete puhul, et näidata nende tekkimise ja lagunemise kiirust.



**▼ B**

## 2.1. ANDMETE TÖÖTLEMINE

Täpsema poolestusaja või  $DT_{50}$  väärtuse arvutamiseks tuleb kasutada sobivaid kineetilisi arvutusmudeleid. Poolestusaja ja/või  $DT_{50}$  väärtused (koos usalduspiiridega) tuleb arvutada iga pH ja temperatuuri jaoks, näidates ära ka mudeli, mida kasutati reaktsiooni kineetika järgu ja determinatsioonikordaja ( $r^2$ ) määramisel. Võimaluse korral tuleb need arvutused teha ka hüdrolüüsisaaduste jaoks.

Erinevatel temperatuuridel tehtud kiiruse mõõtmiste puhul tuleb pseudoesimest järku hüdrolüüsi kiiruskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) kirjeldada temperatuuri funktsioonina. Arvutus peaks põhinema nii  $k_{\text{obs}}$  eraldamisel happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi kiiruskonstantideks ( $k_{\text{H}}$ ,  $k_{\text{neutral}}$ ,  $k_{\text{OH}}$ ) kui ka Arrheniuse võrrandil:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{neutral}} + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = \sum_{i = \text{H, neutral, OH}} A_i e^{-B_i/T}$$

kus  $A_i$  ja  $B_i$  on regressioonikonstandid, mis leitakse sirge algordinaadist ja tõusust, mis on lineaarse regressiooniga pandud läbi  $\ln k_i$  väärtuse ja kelvinites väljendatud absoluutse temperatuuri ( $T$ ) pöördväärtusega määratud punktide. Kasutades neid Arrheniuse suhteid happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi jaoks, saab pseudoesimest järku kiiruskonstandid ja seega poolestusajad välja arvutada teiste temperatuuride jaoks, mille puhul otsene eksperimentaalne kiiruskonstandi määramine pole teostatav (10).

## 2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE

Enamik hüdrolüüsireaktsioone toimub pseudoesimest järku reaktsioonina ja seetõttu on poolestusajad sõltumatud kontsentratsioonist (vt 2. liites võrrandit 4). See võimaldab tavaliselt  $10^{-2}$  kuni  $10^{-3}$  M juures määratud laboratoorseid tulemusi üle kanda keskkonnamatingimustele ( $\leq 10^{-6}$  M) (10). Mabey ja Mill (11) on esitanud rea näiteid selle kohta, et puhtas vees ja looduslikus vees mõõdetud hüdrolüüsi kiirused on eri kemikaalide puhul olnud heas kooskõlas, kui nii pH kui ka temperatuur olid mõõdetud.

## 3. ARUANDLUS

## 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (milles on näidatud märgise asukoht, kui kasutatakse radioaktiivse märgisega materjali) ja olulised füüsikalise-keemilised omadused (vt punkti 1.5);

— uuritava aine puhtus (lisandid);

— märgise puhtus märgisega kemikaali puhul ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

**▼ B**

- Puhverlahused:
- valmistamise kuupäevad ja üksikasjad;
- kasutatud puhvrid ja vesi;
- puhverlahuste molaarsus ja pH.

## Katsetingimused:

- uuringute tegemise kuupäevad;
- uuritava aine kasutatud kogus;
- uuritava aine lisamiseks kasutatud meetod ja lahustid (liik ja kogus);
- inkubeeritud uuritava aine puhverdatud lahuste mahud;
- kasutatud inkubatsioonisüsteemi kirjeldus;
- pH ja temperatuur uuringu jooksul;
- proovivõtuajad;
- ekstraktsioonimeetod(id);
- uuritava aine ja selle hüdrolüüsisaaduste puhverlahuses kindlakstegemise ja nende koguse määramise meetodid;
- paralleelproovide arv.

## Tulemused:

- kasutatud määramismeetodite korratavus ja tundlikkus;
- määramissaagised (väärtused (%)) õigesti tehtud uuringu jaoks on esitatud punktis 1.7.1);
- paralleelproovide andmed ja keskmised tabelina;
- massibilanss kogu katse ajal ja lõpus (kui kasutatakse märgisega ainet);
- eelkatse tulemused;
- tulemuste arutelu ja tõlgendamine;
- kõik originaalandmed ja -näidud.

Järgmine teave on vajalik ainult siis, kui määratakse hüdrolüüsi kiirust:

- uuritava aine ja vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste kontsentratsiooni graafikud sõltuvusena ajast iga pH väärtuse ja temperatuuri juures;
- Arrheniuse võrrandi tulemuste tabelid temperatuuri 20 °C/25 °C jaoks koos pH, kiiruskonstandi [ $\text{h}^{-1}$  või  $\text{päev}^{-1}$ ], poolestusaja või  $DT_{50}$  ja temperatuuridega [°C], koos usalduspiiride ja korrelatsioonikordaja ( $r^2$ ) vms andmetega;
- hüpotees hüdrolüüsitee kohta.

**▼B**

4.

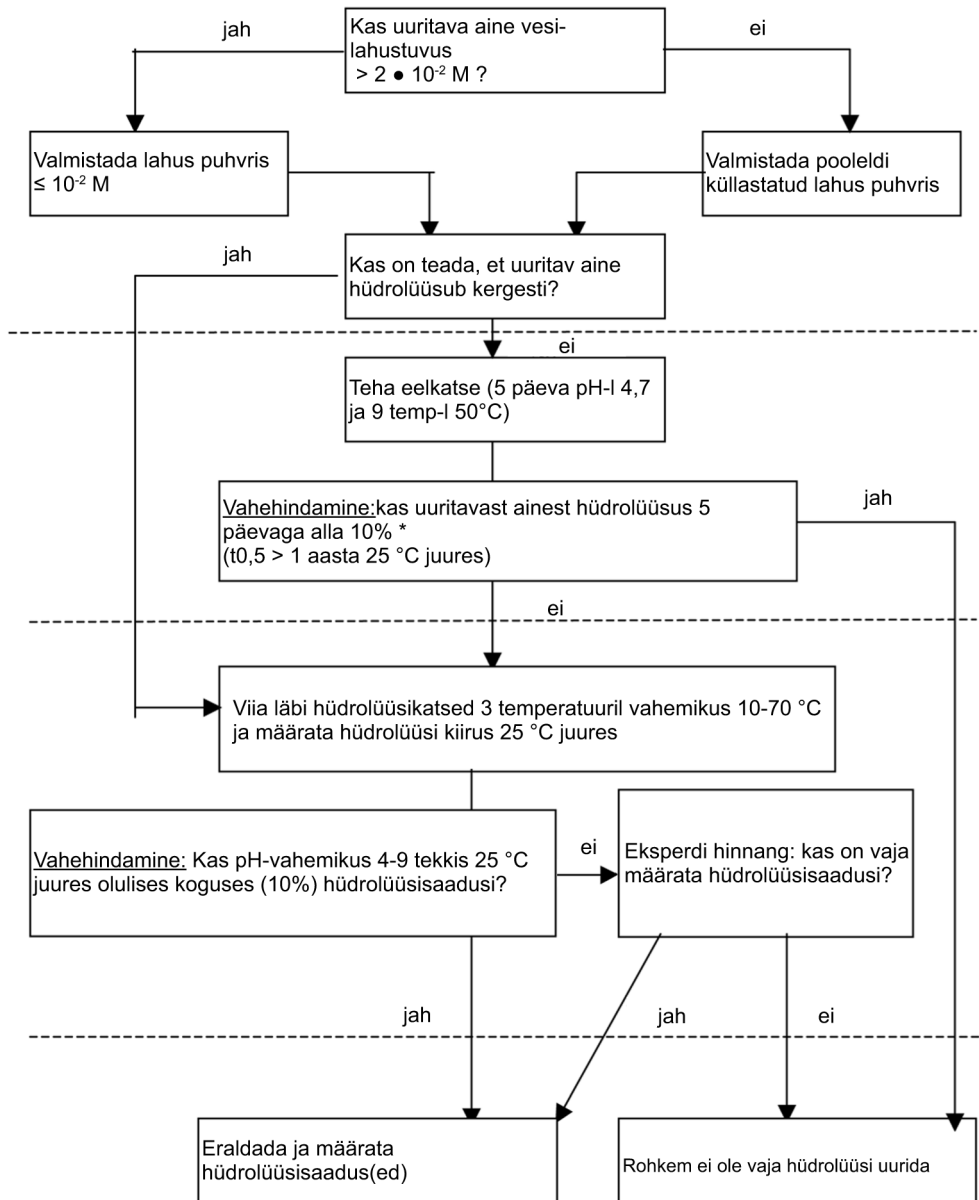
**VIITED**

- 1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.
- 2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 4) Euroopa Liit (EL) (1995). Komisjoni direktiiv 95/36/EÜ, millega muudetakse nõukogu direktiivi 91/414/EMÜ taimekaitsevahendite turuleviimise kohta; V liide. Säilimine ja toime keskkonnas.
- 5) 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.
- 6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- 7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 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 Nr.23.
- 9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
- 11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼ B

## 1. liide

## Hüdrolüüsi uuringu astmeline skeem



\* Uuritava aine 10 % line hüdrolüüs 50 °C juures vastab umbes 30 päevasele poolestusajale, mis omakorda vastab 1 aastale 25 °C juures.

**▼ B**

## 2. liide

**Mõisted ja mõõtühikud**

Kõigil juhtudel tuleb kasutada **rahvusvahelise süsteemi (SI) standardseid mõõtühikuid**.

**Uuritav aine** – mis tahes aine, kas lähteühend või asjaomased muundumissaadused.

**Muundumissaadused** – kõik ained, mis tekivad uuritava aine biotiliste või abiotiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

**Hüdrolüüsisaadused** – kõik ained, mis tekivad uuritava aine hüdrolüütiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

**Hüdrolüüs** – uuritava aine RX reaktsioon veega, mille tulemusena X-rühm reaktsioonitsentris asendub OH-rühmaga:



Aine RX kontsentratsiooni vähenemise kiirust selles lihtsustatud protsessis kirjeldab järgmine võrrand:

kiirus =  $k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}]$  teist järku reaktsioon

või

kiirus =  $k [\text{RX}]$  esimest järku reaktsioon,

sõltuvalt kiirust määravast staadiumist. Kuna vett on uuritava ainega võrreldes väga palju, kirjeldab seda tüüpi reaktsiooni tavaliselt pseudoesimest järku reaktsiooni võrrand, milles mõõdetav kiiruskonstant on määratud seosega

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

ja selle saab määrata valemist <sup>(1)</sup>

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

kus

t = on aeg

ja  $C_0$ ,  $C_t$  = on RX kontsentratsioonid ajahetkedel 0 ja t.

Selle konstandi ühik on  $(\text{aeg})^{-1}$  ja reaktsiooni poolestusaeg (aeg, mis kulub 50 % RX-i reageerimiseks) on määratud seosega

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

**Poolestusaeg** – ( $t_{0,5}$ ) on aeg, mis kulub 50 % uuritava aine hüdrolüüsiks, kui reaktsiooni saab kirjeldada esimest järku kineetikaga; see ei sõltu kontsentratsioonist.

<sup>(1)</sup> Kui logaritmitud andmete ja aja seose graafik ei ole sirge (mis vastab esimest järku reaktsioonile), siis ei sobi valem (3) katseaine hüdrolüüsi kiiruskonstandi määramiseks.

**▼B**

**DT<sub>50</sub> (50 % kadumisaeg)** – aeg, mille jooksul uuritava aine kontsentratsioon väheneb 50 % võrra; see on erinev poolestusajast  $t_{0,5}$ , kui reaktsioon ei järgi esimest järku kineetikat.

**k hindamine eri temperatuuridel**

Kui on teada kiiruskonstandid kahe temperatuuri juures, saab kiiruskonstandid teiste temperatuuride juures arvutada Arrheniuse valemiga:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ või } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graafik, mis kujutab  $\ln k$  sõltuvust  $1/T$ -st, annab sirgjoone tõusuga  $-E/R$ ,

kus:

$k$  = erinevatel temperatuuridel mõõdetud kiiruskonstant

$E$  = aktivatsioonienergia [kJ/mol]

$T$  = absoluutne temperatuur [K]

$R$  = gaasikonstant [8,314 J/mol.K]

Aktivatsioonienergia arvutatakse regressioonanalüüsi teel järgmisest võrrandist:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kus  $T_2 > T_1$ .

▼B

## 3. liide

## Puhversüsteemid

## A. CLARK ja LUBS

## CLARKI ja LUBSI puhversegud (\*)

Koostis	pH
<b>0,2 N HCl ja 0,2 N KCl 20 °C JUURES</b>	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,2
<b>0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N HCl 20 °C juures</b>	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,8
<b>0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures</b>	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,8

(\*) Nendes tabelites toodud pH väärtused on arvutatud potentsiaali mõõtmistest, kasutades Sørenseni standardvõrrandeid (1909). Vastavad pH väärtused on 0,04 ühikut suuremad kui tabelis olevad väärtused.

**▼B**

Koostis	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	6,0

**CLARKI ja LUBSI puhversegud (järg)**

<b>0,1 M monokaaliumfosfaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures</b>	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	8,0
<b>0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,1 M KCl-s + 0,1 N NaOH 20 °C juures</b>	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,2



**▼B**

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	10,0

**B. KOLTHOFF ja VLEESCHHOUWER****KOLTHOFFI ja VLEESCHHOUWERI tsitraatpuhvrid**

Koostis	pH
<b>0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N HCl 18 °C juures (*)</b>	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,6
<b>0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N NaOH 18 °C juures (*)</b>	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	6,0

(\*) Lisada väike tümooli- või samalaadse aine kristall hallitussente kasvu ärahoidmiseks.

▼B

## C. SÖRENSEN

## SÖRENSENI boraadisegud

Koostis		Sörensen 18 °C	Walbum, pH temperatuuril:		
ml booraksit	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
<b>0,05 M booraks + 0,1 N HCl</b>					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
<b>0,05 M booraks + 0,1 N NaOH</b>					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

## SÖRENSENI fosfaadisegud

Koostis	pH
<b>0,0667 M monokaaliumfosfaat + 0,0667 M dinaatriumfosfaat 20 °C juures</b>	
99,2 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,8 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0
98,4 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,2
97,3 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2,7 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,4
95,5 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 4,5 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,6
92,8 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 7,2 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8
88,9 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 11,1 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
83,0 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 17,0 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,2
75,4 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 24,6 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4
65,3 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 34,7 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,6

**▼B**

53,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 46,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6,8
41,3 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 58,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,0
29,6 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 70,4 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,2
19,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 80,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,4
12,8 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 87,2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,6
7,4 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 92,6 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,8
3,7 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 96,3 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,0



## C.8. TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE

### TEHISMULLA KATSE

#### 1. MEETOD

##### 1.1. SISSEJUHATUS

Selles laboratoorses katses lisatakse uuritav aine tehismullale, milles 14 päeva jooksul usse hoitakse. Pärast seda perioodi (ja valikuliselt seitsme päeva pärast) uuritakse katseaine letaalset mõju vihmaussidele. Katse annab suhteliselt kiire meetodi naha ja seedekulgla kaudu omastatavate kemikaalide mõju skriinimiseks vihmaussidel.

##### 1.2. DEFINITSIOON JA ÜHIK

LC<sub>50</sub> – aine kontsentratsioon, mis arvestuslikult tapab uuringuperioodil 50 % katseloomadest.

##### 1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainet kasutatakse perioodiliselt kui vahendit, mis näitab, et katse süsteemi tundlikkus pole oluliselt muutunud.

Võrdlusainena soovitatakse kasutada analüütilise klassi kloroatsetamiidi.

##### 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Muld on varieeruv keskkond, seepärast kasutatakse selles katses hoolikalt määratletud tehislikku liivsavi mulda. Täiskasvanud vihmausse liigist *Eisenia foetida* (vt märkust liites) hoitakse kindlas tehismullas, mida on töödeldud uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Konteinerite sisu puistatakse kandikule laiali 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) pärast katse algust ning loendatakse iga kontsentratsiooni juures ellujäänud vihmaussid.

##### 1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Katse on planeeritud katsesubstraadi ja organismi osas võimalikult hästi korratavana (reprodutseeritavana). Suremus kontrollis ei tohi katse lõpuks olla kõrgem kui 10 %, vastasel juhul on katse kehtetu.

##### 1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

###### 1.6.1. Materjalid

###### 1.6.1.1. Katsesubstraat

Katse põhisubstraadina kasutatakse kindla koostisega tehismulda.

a) Põhisubstraat (protsendid on antud kuivkaalu kohta)

— 10 % *Sphagnum* m'i turvast (pH võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0 ning ilma nähtavate taimejäänusteta, ühtlaselt peenestunud);

**▼B**

- 20 % kaoliniitsavi, milles võiks olla üle 50 % kaoliniiti;
- umbes 69 % tööstuslikku kvartsiliiva (ülekaalus oleva peene liiva osakestest üle 50 % on suurusega 0,05 kuni 0,2 mm). Kui aine vees piisavalt ei dispergeeru, tuleb jätta 10 g iga katseanuma jaoks saadavale, et see hiljem katseainega segada;
- lisatakse umbes 1 % keemiliselt puhast peenestatud kaltsiumkarbonaati ( $\text{CaCO}_3$ ), et pH oleks  $6,0 \pm 0,5$ .

## b) Katsesubstraat

Katsesubstraat sisaldab põhisubstraati, katseainet ja deioniseeritud vett.

Veesisaldus on 25–42 % põhisubstraadi kuivkaalust. Substraadi veesisaldus määratakse kindlaks proovi kuivatamisel 105 °C juures konstantse kaaluni. Võtmekriteerium on, et tehismuld tuleb niisutada punktini, kus pole seisvat vett. Segamisel tuleb hoolega jälgida, et substraat ja uuritav aine seguneksid ühtlaselt. Ära tuleb näidata uuritava aine substraati viimise viisi.

## c) Kontrollsubstraat

Kontrollsubstraat koosneb põhisubstraadist ja veest. Kui kasutatakse mõnda lisaainet, peab täiendav kontroll sisaldama sama koguse seda lisaainet.

## 1.6.1.2. Katseanumad

Umbes üheliitri mahuga klaasanumad (kaetud plastkaante, katete või plastkilega, milles on ventileerimiseks augud), mis on täidetud 500 g kuivale substraadile vastava koguse märja katse- või kontrollsubstraadiga.

## 1.6.2. Katsetingimused

Konteinereid tuleb hoida kliimakambris temperatuuri  $20 \pm 2$  °C pidevas valguses. Valgusintensiivsus peaks olema 400 kuni 800 luksit.

Uuringuperiood on 14 päeva, kuid suremust võib hinnata valikuliselt seitse päeva pärast katse algust.

## 1.6.3. Katse käik

## Katse kontsentratsioonid

Uuritava aine kontsentratsioonid väljendatakse aine massina põhisubstraadi kuivkaalu kohta (mg/kg).

## Vahemiku leidmise katse

Kontsentratsioonide vahemikku, mis põhjustab 0–100 %lise surevuse, võib määrata vahemiku leidmise katsega. Nii saadakse informatsiooni kontsentratsioonide vahemiku kohta, mida tuleb kasutada lõplikus katses.

**▼B**

Ainet tuleks uurida järgnevate kontsentratsioonide juures: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg ainet/kg uuritava substraati (kuivkaalus) kohta.

Kui tehakse täielik lõplik katse, piisab vahemiku leidmiseks ühest uuringuseeriast iga kontsentratsiooni kohta ja ühest uuringuseeriast töötlemata kontrolli kohta, igas seerias kümme vihmaussi.

**Lõplik katse**

Vahemiku leidmiseks tehtud uuringu tulemusi kasutatakse vähemalt viie geomeetrilises reas oleva kontsentratsiooni valimiseks, mis katavad surevuse vahemiku 0–100 % ja erinevad konstantse faktori poolest, mis ei ole suurem kui 1,8.

Uuringud, mis kasutavad neid kontsentratsiooni seeriaid, peaks võimaldama LC<sub>50</sub> väärtust ja selle usaldatavuse piire hinnata nii täpselt kui võimalik.

Lõpliku katse puhul kasutatakse vähemalt nelja uuringukomplekti iga kontsentratsiooni kohta ja nelja töötlemata kontrolli, igas kümme ussi. Nende korduskomplektide tulemused esitatakse keskmise ja standardhälbe kujul.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni suhtega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, siis need kaks väärtust on piisavad näitamaks vahemikku, kuhu LC<sub>50</sub> langeb.

**Katse põhisubstraadi ja uuritava aine segu**

Kui vähegi võimalik, tuleks katsesubstraat valmistada ilma igasuguse lisaaineta, v.a vesi. Vahetult enne uuringu algust segatakse uuritavast ainest deioniseeritud vette või muusse lahustisse tehtud emulsioon või dispersioon uuringu põhisubstraadiga või pritsitakse ühtlaselt selle peale peene kromatograafilise või samalaadse pihustiga.

Vees lahustumatu katseaine võib lahustada võimalikult väikeses sobiva orgaanilise lahusti koguses (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform).

Uuritava aine lahustamiseks, disperseerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lagunevaid aineid. Uuritavat substraati tuleb enne kasutamist aereerida. Aurustunud vesi tuleb samas koguses asendada. Kontroll peab sisaldama sama koguse iga lisaainet.

Kui uuritav aine pole orgaanilises lahustis lahustatav, disperseeritav või emulgeeritav, segatakse 10 g peeneteralise kvartslüüva ja 500 g kuivkaalus tehismulla töötlemiseks vajaliku katseaine segu 490 g kuiva katsesubstraadiga.

Iga katsekomplekti jaoks pannakse igasse klaasanumasse 500 g kuivkaalus substraadiga ekvivalentne kogus niisket substraati ning uuritava substraadi pinnale 10 vihmaussi, keda on eelnevalt 24 tunni jooksul hoitud samasuguses niiskes põhisubstraadis, siis kiirelt pestud ja enne kasutamist filterpaberil üleliigsest veest kuivatatud.

**▼B**

Konteinerid kaetakse perforeeritud plastkaante, katete või kilega, vältimaks substraadi kuivamist, ning hoitakse 14 päeva katsetingimustes.

Hindamised tuleb teha 14 päeva (valikuliselt seitse päeva) pärast katse üles seadmist. Substraat laotatakse klaasist või roostevabast terasest tehtud alusele. Vihmaussid vaadatakse üle ja loetakse kokku ellujäänud vihmaussid. Vihmaussid tunnistatakse surnuks, kui nad ei vasta keha eesosa õrnale mehhaanilisele stimuleerimisele.

Kui ülevaatus tehakse seitsmendal päeval, täidetakse konteiner uuesti substraadiga ja ellujäänud vihmaussid pannakse sama katsesubstraadi pinnale tagasi.

1.6.4. *Katseorganismid*

Katseorganismideks peavad olema täiskasvanud *Eisenia foetida* eksemplarid (vt märkust liites) (vähemalt kahe kuu vanused, klitelumiga) kaaluga 300 kuni 600 mg (kasvatamise meetodeid vt liitest).

2. **ANDMED**

## 2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE JA HINDAMINE

Uuritud aine kontsentratsioonid esitatakse vastavate surnud vihmausside protsentide suhtes.

Kui andmed on küllaldased, määratakse LC<sub>50</sub> väärtus ja usalduspiirid ( $p = 0,05$ ) standardmeetodite abil (Litchfield ja Wilcoxon, 1949, ekvivalentne meetod). LC<sub>50</sub> esitatakse kui testaine (mg) uuritava substraadi (kg) kohta (kuivkaalus).

Neil juhtudel, kui kontsentratsioonikõvera tõus on liiga järsk LC<sub>50</sub> arvutamise võimaldamiseks, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni vahega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, piisab neist kahest väärtusest selle vahemiku näitamiseks, kuhu LC<sub>50</sub> jääb.

3. **ARUANDLUS**

## 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

- kinnitus, et katse on tehtud vastavalt ülalmainitud kvaliteedikriteeriumidele;
- tehtud katse (vahemiku leidmise uuring ja/või lõplik katse);
- katsetingimuste täpne kirjeldus või kinnitus, et katse on tehtud kooskõlas meetodiga; kõik kõrvalekalded tuleb loetleda;
- täpne uuritava aine ja põhisubstraadi segamise kirjeldus;
- katseorganisme puudutav informatsioon (liik, vanus, keskmine kaal ja kaalude vahemik, hoidmise ja paljundamise tingimused, tarnija);

**▼B**

- LC<sub>50</sub> määramiseks kasutatud meetod;
- katse tulemused koos kõigi kasutatud andmetega;
- katseorganismidel täheldatud sümptomite või käitumise muutuste kirjeldus;
- surevus kontrollides;
- LC<sub>50</sub> või kõrgeim katsetatud ilma surevuseta kontsentratsioon ja madalaim 100 %lise surevusega katsetatud kontsentratsioon 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) pärast katse alustamist;
- kontsentratsiooni/vastusreaktsiooni kõvera joonistamine;
- võrdlusaine abil saadud tulemused, kas seoses käesoleva katsega või varasematest kvaliteedikontrollidest.

## 4.

**VIITED**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, p. 331.
- 3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- 4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments./. *Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, p. 99.
- 5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
- 6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.



**▼B**

## Liide

**Vihmausside kasvatamine ja hoidmine enne uurimist**

Loomade paljundamiseks pannakse 30 kuni 50 täiskasvanud ussi värske substraadiga kasvatamise karpi, kust nad võetakse välja 14 päeva pärast. Neid loomi võib kasutada edaspidiste paljundamiste jaoks. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse uuringuks, kui nad on täiskasvanud (ettenähtud tingimustes kahe või kolme kuu pärast).

**Hoidmise ja paljundamise tingimused**

Kliimakamber: temperatuur  $20 \pm 2$  °C, eelistatavalt pidevas valguses (intensiivsus 400 kuni 800 luksit).

Kasvatamise karbid: sobivad 10 kuni 20 l mahuga madalad anumad.

Substraat: *Eisenia foetida*'t võib kasvatada erinevate loomade ekskrementides. Kasvukeskkonnana soovitatakse 50 % turba ja 50 % lehma- või hobusesõnniku segu. Segu pH peaks olema 6 kuni 7 (reguleerida kaltsiumkarbonaadiga) ja ioonjuhtivus madal (väiksem kui 6 mmhos või 0,5 % soola kontsentratsioon).

Substraat peab olema niiske, kuid mitte liiga märg.

Lisaks ülaltoodud meetodile võib kasutada ka teisi tulemuslikke meetodikaid.

*Märkus.* Olemas on mitu *Eisenia foetida* rassi, mida mõned taksonomistid on eristanud liikidena (Bouche, 1972). Need on morfoloogiliselt sarnased, välja arvatud *Eisenia foetida foetida*, mille segmendid on tüüpiliselt põikitriipude või –ribadega, ja *Eisenia foetida andrei*, millel need puuduvad ja punane värvus on varieerunud. Võib kasutada teisi liike, kui vajalik meetoodika on olemas.

**▼B**

**C.9. BIODEGRADATSIOON ZAHNI-WELLENSI KATSE**

**▼M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

▼ **M4****C.10. REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONIKATSE:  
C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BIOKILED****C.10-A: Aktiivmuda**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 303 (2001). 1950. aastatel jõuti järeldusele, et hiljuti kasutusele võetud pindaktiivsed ained põhjustasid reoveepuhastites ja jõgedes liigset vahutamist. Neid ei kõrvaldatud täielikult aeroobse töötlemise käigus ja mõnel juhul need takistasid muude orgaaniliste ainete kõrvaldamist. Seepärast alustati mitmeid uuringuid selle kohta, kuidas pindaktiivseid aineid reoveest kõrvaldada ja kas tööstuses toodetud uusi kemikaale on üldse võimalik reoveest puhastada. Selleks kasutati mudelseadmeid, mis esindasid aeroobse bioloogilise reovee puhastamise kahte peamist tüüpi (aktiivmuda ja nõrgfiltrit kasutamine). Iga uue kemikaali jaotamine puhastusjaamadesse ja suuremahuliste puhastusjaamade jälgimine ei oleks olnud isegi kohalikul tasandil praktiline ning oleks olnud väga kulukas.

## ESIALGSED KAALUTLUSED

**Aktiivmuda**

2. Aktiivmuda mudelühiku suurus on vahemikus 300 ml kuni ligikaudu 2 000 ml. Mõned neist imiteerisid lähedaselt täiemahulisi puhastusjaamu; neil olid mudasettepaagid, milles settinud muda pumbati tagasi aeratsioonibasseini, teistel ei olnud settimisnõusid, näiteks Swisher (1). Seadme suuruse valimisel on tehtud kompromiss; ühelt poolt peab see olema piisavalt suur, et seda oleks võimalik tulemuslikult mehaaniliselt käitada ja tagada piisav proovide kogus ilma käitamist mõjutamata, kuid teiselt poolt ei tohiks see olla nii suur, et selle rajamiseks oleks vaja liiga palju ruumi ja materjale.
3. Kaks laialdaselt ja rahuldavalt kasutatud seadmete vormi on Husmanni seadmed (2) ja poorse poti seadmed (3, 4), mida kasutati esmakordselt pindaktiivsete ainete uurimisel. Kõnealuseid seadmeid on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Rahuldavalt on kasutatud ka muid seadmeid, vt näiteks Eckenfelder (5). Kõnealuse simulatsioonikatse tegemise jaoks vajalike suhteliselt suurte kulude ja jõupingutuste tõttu tehti sellega paralleelselt lihtsamad ja odavamad sõelkatsed, mis on nüüd esitatud käesoleva lisa peatüki C.4 meetodites C.4.-A kuni C.4-F (6). Kogemused paljude pindaktiivsete ainete ja muude kemikaalidega on näidanud, et sõelkatses kergesti biolagunevaks osunud ained lagundati ka simulatsioonikatses. Mõned sõelkatse järgi mittelagundatavaks klassifitseeritud ainetest olid loomuliku biolagundatavuse katsetes lagundatavad (käesoleva lisa peatükid C.12 (7) ja C.19 (8)), kuid ainult mõnda ainet viimati nimetatud rühmast lagundati simulatsioonikatses ning loomuliku biolagundatavuse katsetes mittelagunevaks klassifitseeritud kemikaalid ei lagunenu simulatsioonikatses (9, 10, 11).
4. Mõne eesmärgi saavutamiseks piisab ühe käitamistingimuste kogumiga tehtud simulatsioonikatsetest; katsete tulemused väljendatakse lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) või uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendiga. Käesolevas katsemeetodis on esitatud sellise katse kirjeldus. Erinevalt käesoleva peatüki varasemast versioonist, kus kirjeldati ainult ühte tüüpi seadet sünteetilise reovee töötlemiseks, mis töötas ühendatud seadmete režiimis ja milles kasutati suhteliselt algelist muda kõrvaldamise meetodit,

▼ **M4**

on käesolevas tekstis esitatud mitmesuguseid variante. On kirjeldatud seadme tüübi, käitamisrežiimi, reovee ja muda kõrvaldamise alternatiive. Käesolev tekst vastab üsna täpselt standardis ISO 11733 (12) kirjeldatule, mida kontrolliti koostamise ajal hoolikalt, kuigi meetodi jaoks ei ole veel laboritevahelist võrdluskatset korraldatud.

5. Muude eesmärkide saavutamiseks peab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus olema täpsemalt teada ja selleks vajatakse ulatuslikumat meetodit. Näiteks muda kõrvaldamise kiirust tuleb iga päev ja kogu katse ajal täpsemalt kontrollida ning seadmeid tuleb käitada mitmel erineval kõrvaldamise kiirusel. Täiemahulise meetodi jaoks tuleks katsed korraldada ka kahel või kolmel erineval temperatuuril: sellist meetodit on kirjeldanud Birch (13, 14) ja selle kokkuvõte on esitatud 6. liites. Praegused teadmised ei ole siiski piisavad, et otsustada, milline kineetilistest mudelitest on kemikaalide biolagunemisele reovee puhastamisel ja veekeskkonnas üldisemalt kohaldatav. Monod' kineetika kohaldamine, mis on näitena esitatud 6. liites, on piiratud kemikaalidega, mille sisaldus on vähemalt 1 mg/l, kuid mõne arvates on isegi see veel põhjendamata. Reoveele iseloomulikke kontsentratsioone täpsemalt peegeldavad katsed on esitatud 7. liites, kuid kõnealused katsed (ja 6. liites esitatud katsed) on esitatud liidetes ning neid ei ole avaldatud eraldi katsemeetoditena.

*Filtrid*

6. Palju vähem tähelepanu on pööratud nõrgfiltrimudelitele. See võib olla põhjustatud asjaolust, et need on kogukamad ja vähem kompaktsed kui aktiivmudapuhasti mudelid. Gerike *et al.* töötasid välja nõrgfiltrimiseseadmed ja käitasid neid ühendatud režiimis (15). Kõnealused filtrid olid suhteliselt suured (kõrgus 2 m; maht 60 l) ja iga filtri jaoks oli vaja 2 l/h reovett. Baumann *et al.* (16) simuleerisid nõrgfiltreid, sisestades 1 m torudesse (mille siseläbimõõt oli 14 mm) nn polüestervillaribad, mida oli 30 minuti vältel immutatud kontsentreeritud aktiivmudaga. Uuritav kemikaal, mis oli ainus süsinikuallikas mineraaloolade lahuses, sisestati püstsuunalisse torusse ja biolagundamist hinnati lahustunud orgaanilise süsiniku määramisega väljavoolus ning CO<sub>2</sub> mõõtmisega eralduvas gaasis.
7. Biofiltreid simuleeriti teise meetodi abil (15); horisontaalsuuna suhtes väikse nurga all olevate pöörlevate torude sisepindadele viidi reovett (ligikaudu 250 ml/h) koos uuritava kemikaaliga või ilma selleta ning kogutud väljavoolu analüüsiti lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või konkreetse uuritava kemikaali määramiseks.

**KATSE PÕHIMÕTE**

8. Käesolev meetod on kavandatud selleks, et määrata vees lahustuvate orgaaniliste kemikaalide kõrvaldamist ning esmast ja/või täielikku biolagundamist aeroobsete mikroorganismide poolt pidevalt käitatavas katsesüsteemis, millega simuleeritakse aktiivmuda protsessi. Lihtsasti biolagundatav orgaaniline kasvukeskkond ja orgaaniline uuritav kemikaal on mikroorganismidele energia- ja süsinikuallikateks.
9. Kaks pidevalt käitatavat katseseadet (aktiivmudapuhastid või poorsed potid) töötavad paralleelselt ühesugustel tingimustel, mis valitakse katse eesmärgi kohaselt. Keskmise hüdrauliline retentsiooniaeg on tavaliselt kuus tundi ja keskmine muda kasutamise aeg (muda retentsiooniaeg) on kuus kuni kümme päeva. Muda kõrvaldatakse ühega kahest meetodist. Uuritavat kemikaali lisatakse ainult ühte seadmetest sissevoolu (orgaaniline kasvukeskkond) kaudu tavaliselt kontsentratsiooniga vahemikus 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Teist seadet kasutatakse kontrollseadmena, et määrata orgaanilise kasvukeskkonna biolagunemist.

▼ **M4**

10. Väljavooludest võetakse sageli proove ja määratakse nendes (eelistatult) lahustunud orgaaniline süsinik või siis keemiline hapnikutarve; selle seadme väljavoolust, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali, määratakse spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kontsentratsioon (kui see on nõutav). Katse- ja kontrollseadme väljavoolus määratud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni või keemilise hapnikutarbe erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalst või selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritavast kemikaalst põhjustatud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooniga või keemilise hapnikutarbega sissevoolus, et määrata uuritava kemikaali kõrvaldamise määr.
  
11. Biolagunemist võib tavaliselt eristada bioadsorptsioonist nii, et graafikul uuritakse hoolikalt, kuidas kõrvaldamismäär sõltub ajast, ning seda võib tavaliselt kinnitada kiire biolagundatavuse katsega, kasutades selle seadme aklimatiseeritud inokulumi, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali.

## ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

12. Tulemuste õigesti tõlgendamiseks on vaja teada uuritava kemikaali puhtust, vees lahustuvust, lenduvus- ja adsorptsiooniomadusi. Tavaliselt ei ole lenduvaid ja lahustumatuid kemikaale võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt 5. liide). Samuti on vaja teada keemilist struktuuri või vähemalt empiirilist valemit, et arvutada teoreetilisi väärtusi ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, näiteks teoreetilist hapnikutarvet (ThOD), lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC) ja keemilist hapnikutarvet (COD).
  
13. Sobivate katsekontsentratsioonide valimiseks võivad vajalikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt 4. liide) ning vähesese biolagundatavuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks on sellised andmed hädavajalikud.

## KÜNNISVÄÄRTUSED

14. Käesoleva pindaktiivsete ainete esmase biolagundamise simulatsioonikatse (kinnitava katse) esimese rakendamise järel nõutakse konkreetse kemikaali kõrvaldamist rohkem kui 80 % ulatuses, et pindaktiivset ainet võiks lubada turule. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib rakendada kõnealust simulatsioonikatset (kinnitavat katset) ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui sellega kõrvaldatakse rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalst. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki lubamise/mittelubamise küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalide põhjustatud ohu hindamiseks. Tulemused järgivad üldjuhul põhimõtet „kõik või mitte midagi”. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatel kemikaalidel rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem 90 % puhul on see > 80 %.
  
15. Kõnealuses katses kasutatud kontsentratsioonidel (ligikaudu 10 mg C/l) esineb reovees suhteliselt väheseid kemikaale (näiteks pindaktiivseid aineid). Mõned kemikaalid võivad sellisel kontsentratsioonil inhibeerida ja mõne muu kemikaali kõrvaldamise kineetika võib väikesel kontsentratsioonil olla erisugune. Lagundamist oleks võimalik täpsemalt hinnata, kui kasutada muudetud meetodeid ja uuritava kemikaali realistlikult väikest kontsentratsiooni ning selliselt kogutud andmeid saaks kasutada kineetiliste konstantide arvutamiseks. Vajalikke katsemeetodeid ei ole siiski veel täielikult valideeritud ja biolagundamisreaktsioone kirjeldavad kineetilised mudelid ei ole veel kindlaks tehtud (vt 7. liide).

▼ **M4****VÖRDLUSKEMIKAALID**

16. Katse korraliku tegemise tagamiseks on kasulik kemikaalide uurimise ajal aeg-ajalt katsetada kemikaale, mille käitumine on teada. Sellised kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape, 1-naftoehape jne (9, 10, 11).

**KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS**

17. Simulatsioonikatsete uuringute kohta on olnud märksa vähem teateid kui kiire biolagundatavuse katsete kohta. 80 % või rohkem lagundatavate uuritavate kemikaalide puhul on (samaaegsete) paralleelproovide reprodutseeritavus hea (10–15 % piires), kuid vähem lagundatavate kemikaalide puhul on hajuvus suurem. Üheksanädalases lagundamiskatses on eri juhtudel registreeritud ka mõne piiripealse kemikaaliga väga erinevaid tulemusi (näiteks 10 %, 90 %).
18. Kahte tüüpi seadmetega saadud tulemustes on leitud vähe erinevusi, kuid mõne kemikaali puhul toimub olmereovee kasutamisel ulatuslikum ja järjepidevam lagunemine kui (OECD) sünteetilise reovee puhul.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Seadmed***Katsesüsteem*

19. Ühe uuritava kemikaali katsetamise süsteem koosneb katseseadmest ja kontrollseadmest, kuid vaid spetsiifiliste analüüside tegemisel (esmane biolagundamine) on vaja ainult katseseadet. Mitme katseseadme kohta, milles uuritakse kas üht ja sama kemikaali või erinevaid kemikaale, võib kasutada ainult ühte kontrollseadet. Ühendatud seadmete korral (3. liide) peab igal katseseadmel olema oma kontrollseade. Katsesüsteem võib olla kas aktiivmudapuhasti mudel, Husmanni seade (1. liite joonis 1) või poorne pott (1. liite joonis 2). Mõlemal juhul on sissevoolu ja väljavoolu jaoks vaja piisava suurusega säilitusnõusid ning pumпасid, et doseerida sissevoolu, kas eraldi või segatult uuritava kemikaali lahusega.
20. Iga aktiivmudapuhasti seade koosneb aeratsiooninõust, mille maht on teada, ligikaudu 3 liitrit aktiivmuda, ja separaatorist (teisesest selitist), mille maht on ligikaudu 1,5 liitrit. Mahte võib teatavas ulatuses separaatori kõrguse kohandamisega muuta. Eri suurusega nõude kasutamine on lubatud, kui neid käitatakse võrreldava hüdraulilise koormusega. Kui katseruumi temperatuuri hoidmine soovitud vahemikus ei ole võimalik, soovitakse kasutada veesärgiga nõusid, mille vee temperatuur on reguleeritav. Aktiivmuda tagasiiviimiseks separaatorist aeratsiooninõusse kasutatakse suruõhupumpa või doseerimispumpa, mis töötab kas pidevalt või korrapäraste ajavahemike järel.
21. Poorse poti süsteem koosneb sisemisest poorsest silindrist, mille koonuseline alaosa asub mõnevõrra suuremas sama kujuga nõus, mis on valmistatud vett mitte läbi laskvast plastmaterjalist. Poorse nõu jaoks on sobiv materjal poorne polüetüleen, mille pooride maksimaalne suurus on 90 µm ja paksus 2 mm. Muda eraldamine töödeldud orgaanilisest kasvukeskkonnast toimub poorse seina diferentseeritud läbimise teel. Väljavool koguneb ringikujulisse alasse, kust see kandub ülevoolamise teel kogumisnõusse. Settimist ei toimu ja muda seega tagasi ei suunata. Kogu süsteemi võib paigutada termostaadiga reguleeritavasse vesivanni. Poorsed potid ummistuvad algetappides ja võivad üle voolata. Sel juhul asendage poorne vooderdis puhtaga: kandke kõigepealt

▼ **M4**

muda pottist sifooniga puhtasse ämbrisse ning kõrvaldage ummistunud vooderdis. Pärast mitteläbilaskva välissilindri puhtakspühkimist pange sisse puhas vooderdis ja kandke muda tagasi potti. Ummistunud vooderdise külge jäänud muda tuleb samuti hoolikalt maha kraapida ja tagasi potti kanda. Puhastage ummistunud pott kõigepealt peene veejoaga, et eemaldada külgejäänud muda, ning leotage potti siis lahjas naatriumhüpokloriti lahuses ja seejärel vees ning loputage siis põhjalikult veega.

22. Muda aereerimiseks mõlema süsteemi aeratsiooninõus tuleb kasutada sobivat meetodit, näiteks klaasfilteraeraatoreid (aeratsioonielement) ja suruõhku. Õhku puhastatakse vajaduse korral, suunates selle läbi sobiva filtri ja kasutades vesipuhastust. Läbi süsteemi tuleb suunata piisavas koguses õhku, et säilitada aeroobseid tingimusi ja hoida mudahelbed katse vältel kogu aeg hõljuvas olekus.

*Filtrimisseade või tsentrifuug*

23. Seade proovide filtrimiseks, milles on sobiva poorisuurusega (ava nominaal-läbimõõt 0,45 µm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad lahustuvad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljajuhutav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s<sup>2</sup>.

*Analüüsideadmed*

24. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:
- lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;
  - konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist;
  - hõljuvaine, pH, hapniku kontsentratsioon vees;
  - temperatuur, happelisus ja leeliselisus;
  - ammonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

*Vesi*

25. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Määrake leeliselisus, kui see ei ole teada.
26. Deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

*Orgaaniline kasvukeskkond*

27. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud (11, 14), et ainult olmereovee kasutamise puhul saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent ning sellest saab kõrvaldada ja biolagundada mõnda kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatavad. Ka pidev või korrapärane olmereovee lisamine stabiliseerib sageli aktiivmuda, sh võimaldab üliolulise omadusena head settimist. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis tuleb mõõta lahustuva orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kontsentratsioon. Orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus peaks olema teada. Kui orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on vähene, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumdi-vesinikfosfaat), et säilitada katse ajal aeratsiooninõus pH ligikaudu 7,5 ± 0,5. Lisatava puhvri kogus ja selle lisamise aeg tuleb igal eraldi juhul kindlaks määrata. Kui segusid kasutatakse kas pidevalt või aeg-ajalt, tuleb segu lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) hoida ligikaudu püsivana, näiteks veega lahjendamise teel.

▼ **M4***Sünteeiline reovesi*

28. Ühes liitris kraanivees lahustatakse: 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti, 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati ( $K_2HPO_4$ ), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriidihüdraati ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ). See OECD sünteetiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kui on vajalik väiksema kontsentratsiooniga sissevool, lahjendage sünteetilist reovett näiteks 1 : 1 kraaniveega, et saada kontsentratsioon ligikaudu 50 mg/l. Kõnealune väiksema kontsentratsiooniga sissevool võimaldab nitriifitseerivatel organismidel paremini kasvada ja seda muutust tuleks kasutada juhul, kui on vajalik uurida nitriifitseerivate reoveepuhastite simuleerimist. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentratsiooni võib valmistada destilleeritud veega ja säilitada kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Enne kasutamist lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

*Olmereovesi*

29. Kasutage värskelt settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda enne esmast settimist esmase settimise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C (kuid üldiselt ei tohiks seda hoida üle seitsme päeva), kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal oluliselt vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partii viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

*Aktiivmuda*

30. Koguge inokulatsiooniks aktiivmuda hästi käitatud reoveepuhasti või peamiselt olmereovee puhastamiseks kasutatava laborisuuruses aktiivmudaseadme aeratsiooninõust.

*Uuritava kemikaali põhilahused*

31. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga (näiteks 1–5 g/l) põhilahus deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalses osas (lahustumatute ja lenduvate kemikaalide korral vt 5. liide). Määrake kindlaks põhilahuse lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrake mõõtmisi iga uue partii puhul. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust vees. Määrake põhilahuses lahustunud orgaanilise süsiniku või mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioon spetsiifilise analüüsi abil ja võrrelge nimiväärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada > 90 %). Veenduge (elkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul on vaja proovid tsentrifuugida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodiga.



▼ **M4**

32. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahus väikse koguse anorgaanilise happe või aluse lisamisega, et pH oleks  $7 \pm 0,5$ , kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

**KATSE KÄIK**

33. Siin on kirjeldatud aktiivmudapuhasti katset; poorse poti süsteemi puhul tuleb seda mõnevõrra kohandada.

*Inokulumi valmistamine*

34. Inokuleerige katsesüsteem katse alguses kas aktiivmuda või väikesekontsentratsioonilise mikroorganismide inokulumiga. Hoidke inokulumi toatemperatuuril aereerituna kuni selle kasutamiseni ja kasutage ee ära 24 tunni jooksul. Aktiivmuda kasutamise korral võtke aktiivmuda proov tõhusalt käitatava bioloogilise reoveepuhasti aeratsiooninõust või labori puhastist, milles käideldakse peamiselt olmereovett. Kui simuleeritakse nitrifitseerivaid tingimusi, võtke muda nitrifitseerivast reoveepuhastist. Määrake kindlaks hõljuvaine kontsentratsioon ja vajaduse korral suurendage muda setitamise teel selle kontsentratsiooni, et katsesüsteemi lisatav maht oleks minimaalne. Kuivaine lähtekontsentratsioon peab olema ligikaudu 2,5 g/l.
35. Teisel juhul kasutage inokulumina väljavoolu bioloogilisest olmereovee puhastist koguses 2 ml/l kuni 10 ml/l. Võimalikult paljude eri bakteriliikide saamiseks võib olla kasulik eri allikatest, näiteks pinnaveest, saadud inokulumide lisamine. Sel juhul hakkab aktiivmuda katsesüsteemis arenema ja paljunema.

*Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine*

36. Hoolitsege, et sisse- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõust väljuvad ja väljavoolunõusse sisenevad torud on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe. Seadke katsesüsteem üles ruumis, mille temperatuuri saab reguleerida (üldiselt vahemikus 20–25 °C) või kasutage veesärgiga katseseadmeid. Valmistage piisav kogus vajaminevat orgaanilist kasvukeskkonda (punktid 27–29). Täitke kõigepealt aeratsiooninõu ja separaator orgaanilise kasvukeskkonnaga ning lisage inokulum (punktid 34 ja 35). Alustage aereerimist nii, et muda jääks hõljuvasse ja aeroobsesse olekusse, ning alustage sissevooluvee doseerimist ja settinud muda ringlussevõttu. Doseerige hoiunõust orgaanilist kasvukeskkonda katse- ja kontrollseadmete aeratsiooninõudesse (punktid 20, 21) ning koguge vastavad väljavoolud samalaadsetesse kogumisnõudesse. Tavapärase kuuettunnise hüdraulilise retentsiooniaja saavutamiseks pumbatakse orgaanilist kasvukeskkonda juurde kiirusega 0,5 l/h. Selle kiiruse kontrollimiseks mõõtke iga päev doseeritud orgaanilise kasvukeskkonna kogus, märkides üles kasvukeskkonna koguse vähenemise hoiunõudes. Kemikaalide vahelduva vabanemise ja koormuse järsu suurenemise mõju uurimiseks on vaja kasutada muid doseerimisrežiime.
37. Kui orgaaniline kasvukeskkond valmistatakse kasutamiseks rohkem kui ühe päeva jooksul, on vaja see jahutada temperatuurini umbes 4 °C või rakendada muid asjakohaseid säilitusmeetodeid, et vältida mikroobide kasvu ja biolagunemist väljaspool katseseadet (punkt 29). Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib valmistada kontsentreeritud põhilahuse (näiteks tavapärasest kontsentratsioonist kümme korda suurema kontsentratsiooniga, punkt 28) ja seda säilitada ligikaudu 4 °C juures. Selle põhilahuse võib enne kasutamist hoolikalt segada vajaliku koguse kraaniveega; teise võimalusena võib seda ka otse katsenõusse pumbata, pumbates eraldi juurde vajaliku koguse kraanivett.

▼ **M4***Uuritava kemikaali doseerimine*

38. Lisage vajalikus koguses uuritava kemikaali põhilahust (punkt 31) sissevoolu vee nõusse või doseerige seda eraldi pumba abil otse aeratsiooninõusse. Sissevoolu tavaline keskmine kontsentratsioon peaks olema 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku ja ülempiir ei tohiks olla rohkem kui 50 mg/l. Kui uuritav kemikaal vees hästi ei lahustu või võib avalduda toksilisus, vähendage katsekontsentratsiooni väärtusele 5 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku või veel väiksemale kontsentratsioonile, aga seda ainult juhul, kui on olemas asjakohane spetsiifiline analüüsimeetod ja seda kasutatakse (vees halvasti lahustuvat dispersiooni moodustavat uuritavat kemikaali võib lisada doseerimise erimeetodite abil, vt 5. liide).
39. Alustage uuritava kemikaali lisamist pärast ajavahemikku, mille jooksul süsteem on stabiliseerunud ja kõrvaldab tõhusalt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilist süsinikku (ligikaudu 80 %). Enne uuritava kemikaali lisamist on tähtis kontrollida, et kõik seadmed töötaksid ühevõrra tõhusalt; kui need ei tööta ühevõrra tõhusalt, on üldiselt kasulik eri mudad kokku segada ja lisada eri seadmetesse uuesti võrdsed kogused muda. Kui kasutatakse aktiivmuda inokulumi (ligikaudu) 2,5 g/l (kuivkaal), võib uuritava kemikaali lisada katse alguses, kuna algusest peale üha suuremate koguste otse lisamine võimaldab aktiivmudal uuritava kemikaaliga paremini kohaneda. Olenemata uuritava kemikaali lisamise viisist, soovitatakse korrapäraste ajavahemike järel mõõta voolukiirust ja/või lahuste mahtu hoiunõu(de)s.

*Aktiivmuda käsitlemine*

40. Aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon stabiliseerub üldiselt katse jooksul vahemikus 1–3 g/l (kuivkaal), olenemata kasutatud inokulumist, kuid sõltuvalt orgaanilise kasvukeskkonna kvaliteedist ja kontsentratsioonist, käitamistingimustest, mudas olevate mikroorganismide laadist ning uuritava kemikaali mõjust.
41. Määrake aeratsiooninõudes hõljuvaine sisaldus vähemalt iga nädal ja kõrvaldage liigne muda, et hoida kontsentratsioon vahemikus 1 g/l kuni 3 g/l (kuivkaal) või hoidke püsivana muda keskmist kasutusaega, üldiselt vahemikus 6–10 päeva. Kui muda retentsiooniajaks valitakse näiteks kaheksa päeva, siis eemaldage iga päev 1/8 aeratsiooninõu aktiivmuda kogusest ja kõrvaldage see. Tehke seda iga päev või eelistatavalt automaatselt vahelduvalt sisselülitava pumba abil. Hõljuvaine kontsentratsiooni püsivana või kitsastes piirides hoidmisega ei säilitata püsivat muda retentsiooniaega, mis on käitamisinäitaja, mis määrab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus.
42. Eemaldage kogu katse vältel vähemalt kord päevas aeratsiooninõu ja separaatori seinte külge jäänud muda, et viia see tagasi suspensiooni. Kontrollige korrapäraselt kõiki torusid ja torustikku ning puhastage neid, et vältida biokile teket. Võtke separaatorist settinud muda aeratsiooninõus ringlusse, eelistatavalt vahelduva pumpamise teel. Poorse poti süsteemis ringlussevõttu ei toimu, kuid veenduge, et olete enne nõus mahu märkimisväärset suurenemist pannud sisse puhtad sisemised potid (punkt 21).
43. Husmanni puhasti seadmetes võib muda halvasti settida ja võivad tekkida mudakaod. Seda on võimalik vältida, kui teha katse- ja kontrolliseadmetes paralleelselt järgmist:

— korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga nädal, võib lisada värsket muda või flokulanti (näiteks igasse nõusse 2 ml  $\text{FeCl}_3$  lahust kontsentratsiooniga 50 g/l), kuid tuleb veenduda, et  $\text{FeCl}_3$  ei põhjusta uuritava kemikaali reaktsiooni või sadestumist;

▼ **M4**

- suruõhupumba võib asendada peristaltilise pumbaga, mis võimaldab kasutada sissevooluga ligikaudu võrdväärset muda ringlussevõtu voolu ja võimaldab luua settinud mudas anaeroobse ala (suruõhupumba geomeetria tõttu on tagasisuunatud muda minimaalne voolukiirus ligikaudu 12 korda suurem kui sissevoolu kiirus);
- muda võib pumbata separaatorist aeratsiooninõusse vahelduvalt sisselülituva pumbaga (näiteks 5 minutit iga 2,5 tunni tagant, et võtta muda ringlusse kiirusega 1–1,5 l/h);
- vahutamiskadude vältimiseks võib kasutada minimaalsel kontsentratsioonil mittemürgist vahutamistavast ainet (näiteks silikoonõli);
- õhku võib separaatoris juhtida läbi muda lühikeste järskude purse-tena (näiteks 10 sekundit kord tunnis);
- aeratsiooninõusse võib teatava ajavahemiku järel doseerida orgaanilist kasvukeskkonda (näiteks 3–10 minutit iga tund).

*Proovide võtmine ja analüüsimine*

44. Korrapärase ajavahemike järel tuleb aeratsiooninõudes mõõta aktiivmuda lahustunud hapniku kontsentratsiooni, temperatuuri ja pH-d. Tuleb veenduda, et alati on saadaval piisavalt hapnikku ( $> 2$  mg/l) ja et temperatuuri hoitakse nõutavas vahemikus (üldiselt 20–25 °C). Hoidke pH-d vahemikus  $7,5 \pm 0,5$ , doseerides aeratsiooninõusse või sissevoolu väikeses koguses anorgaanilist alust või hapet või suurendades orgaanilise kasvukeskkonna puhverduvvõimet (vt punkt 27). Nitrititseeerimise käigus tekib hapet, 1 mg N oksüdeerumisel tekib kogus, mis on ligikaudu võrdväärne kogusega 7 mg  $\text{CO}_3^-$ . Mõõtmiste sagedus oleneb mõõdetavast parameetrist ja süsteemi stabiilsusest ning võib varieeruda ühest korrast päevas kuni ühe korrani nädalas.
45. Kontroll- ja katsendõude sissevoolus tuleb mõõta lahustunud orgaanilist süsinikku või keemilist hapnikutarvet. Katse sissevoolu vees tuleb spetsiifilise analüüsiga mõõta uuritava kemikaali kontsentratsiooni või seda tuleb hinnata põhilahuse kontsentratsiooni (punkt 31), kasutatud mahu ja katseadmesse doseeritud reovee koguse põhjal. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni on soovitatav arvutada, et vähendada kontsentratsiooniandmete varieerumist.
46. Võtke kogutud väljavoolust vajalikud proovid (näiteks 24 tunni koondproovid) ja filtrige need läbi membraani, mille poori suurus on 0,45  $\mu\text{m}$ , või tsentrifuugige need 40 000  $\text{m/s}^2$  juures 15 minutit. Kui filtrida on raske, tuleb kasutada tsentrifugimist. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve vähemalt kaks korda, et mõõta täielikku biolagunemist ja (kui seda nõutakse) uuritava kemikaali spetsiifilise analüüsiga esmast biolagunemist.
47. Keemilise hapnikutarbe kasutamine võib põhjustada analüüsiprobleeme väikestel kontsentratsioonidel ja seega soovitatakse seda ainult juhul, kui kasutatakse piisavalt suurt katsekonsentratsiooni (ligikaudu 30 mg/l). Tugevasti adsorbeeruva kemikaali puhul soovitatakse samuti mõõta mudas adsorbeeritud kemikaali, kasutades spetsiifilist uuritava kemikaali analüüsi meetodit.
48. Proovivõtu sagedus oleneb katse eeldatavast kestusest. Soovitatav sagedus on kolm korda nädalas. Kui seadmed töötavad tõhusalt, laske süsteemil pärast uuritava kemikaali lisamist 1–6 nädalat kohaneda, et saavutada kohanemise statsionaarne olek. Platoofaasis (punkt 59), mis kestab tavaliselt kolm nädalat, mõõtkatsetulemuse hindamiseks, eelistatavalt vähemalt 15 kehtivat väärtust. Katse võib lõpetada, kui on jõutud piisava kõrvaldamise määrani (näiteks  $> 90\%$ ) ja saadud kõnealused 15 väärtust, mis väljendavad kolme nädala jooksul igal tööpäeval tehtud analüüse. Katse ei tohiks pärast uuritava kemikaali lisamist üldiselt kesta üle 12 nädala.

▼ **M4**

49. Kui muda nitrifitseerib ja kui uuritakse kemikaali mõjusid nitrifitseerimisele, tuleb katse- ja kontrollseadmete väljavoolu proovides mõõta vähemalt kord nädalas ammooniumi- ja/või nitriti- ja nitraadisaldust.
50. Kõik analüüsid ja eelkõige lämmastikusisalduse määramine tuleks teha võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tihedalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, siis kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist (näiteks 1 liitri kohta 10 ml väävelhappelahuse (400 g/l) lisamisega) või asjakohase mürgise aine lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamise meetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

*Katseadmete ühendamine*

51. Kui kasutatakse ühendamist (3. liide), siis vahetage iga päev sama kogus aktiivmuda (150 ml kuni 1 500 ml 3 liitrit lahust sisaldavate aeratsiooninõude puhul) katseadme ja selle kontrollseadme aeratsiooninõude vahel. Kui uuritav kemikaal adsorbeerub tugevasti muda külge, siis vahetage ainult separaatorite supernatanti. Mõlemal juhul kasutage katsetulemuste arvutamiseks parandustegurit (punkt 55).

**ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

52. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent igal mõõtmise ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

kus

$D_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal  $t$

$C_s$  = uuritava kemikaali põhjustatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve sissevoolu vees, eelistatavalt hinnatud põhilahuse järgi (mg/l)

$E$  = katse väljavoolus ajal  $t$  mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

$E_0$  = kontrollseadme väljavoolus ajal  $t$  mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

53. Kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr on kasulik teave katse ajal aktiivmuda biolagundava aktiivsuse hindamiseks. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

kus

$D_B$  = kontrollseadme orgaanilises kasvukeskkonnas lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal  $t$

$C_M$  = orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve kontrollseadme sissevoolu vees (mg/l)

▼ **M4**

Soovi korral võite arvutada orgaanilise kasvukeskkonna ja katseseadmes uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsendi järgmise võrrandi abil:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kus

$D_T$  = katse kogu sissevooluvee lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent

$C_T$  = katse kogu sissevooluvee või põhilahuse alusel arvatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve (mg/l)

54. Kui mõõdetakse uuritava kemikaali kõrvaldamist, arvutage see igal hindamisajal spetsiifilise analüüsi meetodiga järgmise võrrandi abil:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kus

$D_{ST}$  = uuritava kemikaali esmase kõrvaldamise protsent ajal t

$S_i$  = uuritava kemikaali mõõdetud või hinnatud kontsentratsioon katse sissevooluvees (mg/l)

$S_e$  = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavooluvees ajal t (mg/l)

55. Kui kasutatakse ühendatud režiimi, siis kompenseerige uuritava kemikaali lahjenemine aeratsiooninõus muda vahetuse tõttu parandusteguri abil (vt 3. liide). Kui kasutati keskmist hüdraulilist retentsiooniaega kuus tundi ja aeratsiooninõus poole aktiivmuda mahu vahetamist, tuleb igapäevaseid määratud kõrvaldamise näitajaid ( $D_t$ , punkt 52) parandada, et leida tegelik uuritava kemikaali kõrvaldamise määr  $D_{tc}$  järgmise võrrandiga:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

#### **Katsetulemuste esitamine**

56. Koostage kõrvaldamisprotsendi  $D_t$  (või  $D_{tc}$ ) ja  $D_{st}$  (kui see on leitud) ajast sõltuvuse graafik (vt 2. liide). Uuritava kemikaali (kui niisuguse või lahustunud orgaanilise süsinikuna) kõrvaldamise kõvera kuju alusel võib teha järeldusi kõrvaldamisprotsessi kohta.

#### *Adsorptsioon*

57. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse algusest peale, siis kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt aktiivmuda tahketesse osakestesse adsorbeerimise teel. Seda on võimalik tõendada adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega spetsiifilise analüüsi abil. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suureks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suures koguses kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritav uuritav kemikaal suudab siiski mingil viisil põhjustada mikroobipopulatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

▼ **M4***Ootefaas*

58. Nagu ka staatilistes sõelumiskatsetes, nii vajavad uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagundamise toimumist sageli ootefaasi. Ootefaasis toimub lagundavate bakterite aklimatiseerumine või kohanemine ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks peetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

*Platoofaas*

59. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. Platoofaas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 15 kehtivat näitajat.

*Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr*

60. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja ( $D_t$ ) väärtustest platoofaasis keskvääratus. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskvääratus 95 % usaldusvahemik.

*Orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamine*

61. Koostage kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamisprotsendi ajast sõltuvuse graafik ( $D_B$ ). Märkige keskmine kõrvaldamise määr samal viisil kui uuritava kemikaali puhul (punkt 60).

*Biolagundamise tunnused*

62. Kui uuritav kemikaal ei adsorbeeru märkimisväärselt aktiivmudasse ja kõrvaldamist näitaval kõveral on ootefaasiga, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamist näitava kõvera tavapärane kuju (punktid 58, 59), siis võib kindel olla, et mõõdetud kõrvaldamise on põhjustanud biolagundamine. Kui on toimunud suures koguses esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavaid kemikaale või teha täiendavad staatilised biolagundamise katsed täpselt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F (6)) või katse, milles mõõdetakse süsinikdioksiidi tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C (6)) või ISO *Headspace*-meetod (18), kasutades simulatsioonikatsest eelnevalt kokku puutunud inokulumi. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada kui lähtekemikaali.

*Katsetulemuste kehtivus*

63. Inokulumi tavapärase biolagundamise käitumise kohta on saadud teavet, kui on määratud orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määr (punkt 53) kontrollseadmes. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr kontrollseadme(te)s on kahe nädala möödudes > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.

**▼ M4**

64. Kui on kasutatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr ( $D_t$ , punkt 52) olema > 90 %.
65. Kui katse tehakse nitrititseeerivates tingimustes, peaks väljavoolude keskmine kontsentratsioon olema < 1 mg/l ammoniaaklämmastikku ja < 2 mg/l nitritlämmastikku.
66. Kui need kriteeriumid (punktid 63–65) ei ole täidetud, siis korrake katset muust allikast pärit inokulumiga, katsetage võrdluskemikaali ja vaadake läbi kõigi katsete tegemise käik.

**Katseprotokoll**

67. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav kemikaal:*

- tunnusandmed;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused.

*Katsetingimused:*

- katsesüsteemi tüüp, mis tahes muudatused lahustumatu või lenduva kemikaali katsetamiseks;
- orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;
- tööstusliku reovee osakaal reovees ja selle laad, kui see on teada;
- inokulum, laad ja proovivõtukoht (-kohad), kontsentratsioon ja kõik eeltötlused;
- uuritava kemikaali põhilahus: lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamise viis; kasutatud katsekonsentratsioon; kui see on väljaspool vahemikku 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; kõik muudatused;
- keskmine muda kasutamise aeg ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg; muda kõrvaldamise meetod; muda pundumise, kao jne vältimise meetodid;
- kasutatud analüüsimeetodid;
- katsetemperatuur;
- muda pundumisomadused, muda mahuindeks (*sludge volume index*, SVI), muda kontsentratsioon aktiivmudas (*mixed liquor suspended solids*, MLSS);
- kõik kõrvalekalded tavalisest katse käigust ja kõik asjaolud, mis võivad olla mõjutanud tulemusi.

*Katsetulemused:*

- kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, hapniku kontsentratsioon, hõljuvaine, N-kemikaalid (kui see on asjakohane));
- kõik  $D_t$  (või  $D_{ic}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$  arvatud väärtused tabelite kujul ja kõrvaldamist näitavad kõverad;
- teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali ja kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määra kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;
- tulemuste arutelu.

▼ **M4***KIRJANDUS*

- 1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
- 2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.
- 3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- 4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.
- 5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
- 6) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.
- 7) Käesoleva lisa peatükk C.12 „Biodegradatsioon – modifitseeritud SCAS test”.
- 8) Käesoleva lisa peatükk C.19 „Adsorptsiooniteguri ( $K_{OC}$ ) kindlaksmääramine mullas ja reoveesettes kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil”.
- 9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.
- 10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.
- 11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- 12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.
- 13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.
- 14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.
- 15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.
- 16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.
- 17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98, ISBN 011 751661 9.
- 18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.



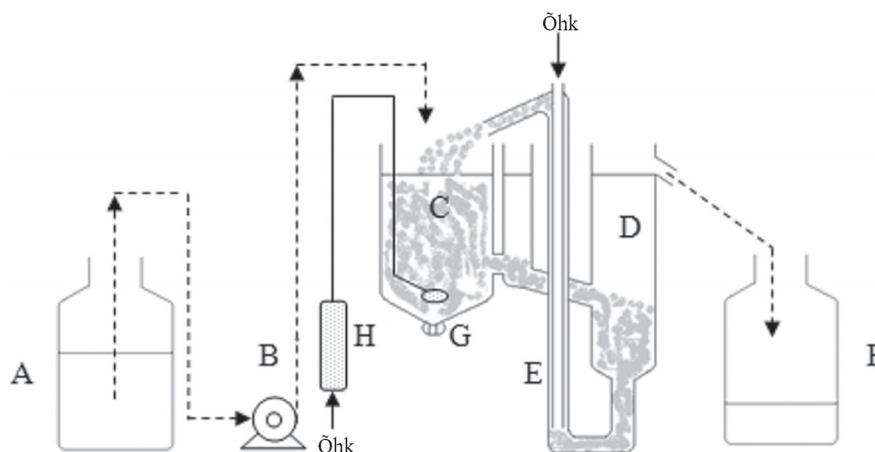
## ▼M4

1. liide

Joonis 1

## Seade biolagundatavuse hindamiseks

Husmanni seade

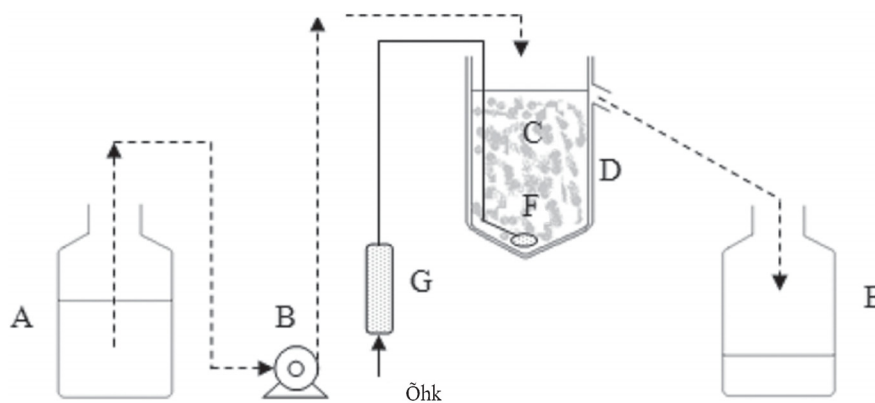


- |                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| A. Hoiunõu                      | E. Suruõhupump    |
| B. Doseerimispump               | F. Kogumisnõu     |
| C. Aeratsioonikamber (maht 3 l) | G. Aeraator       |
| D. Settimisnõu                  | H. Õhuvoolumõõtur |

Joonis 2

## Seade biolagundatavuse hindamiseks

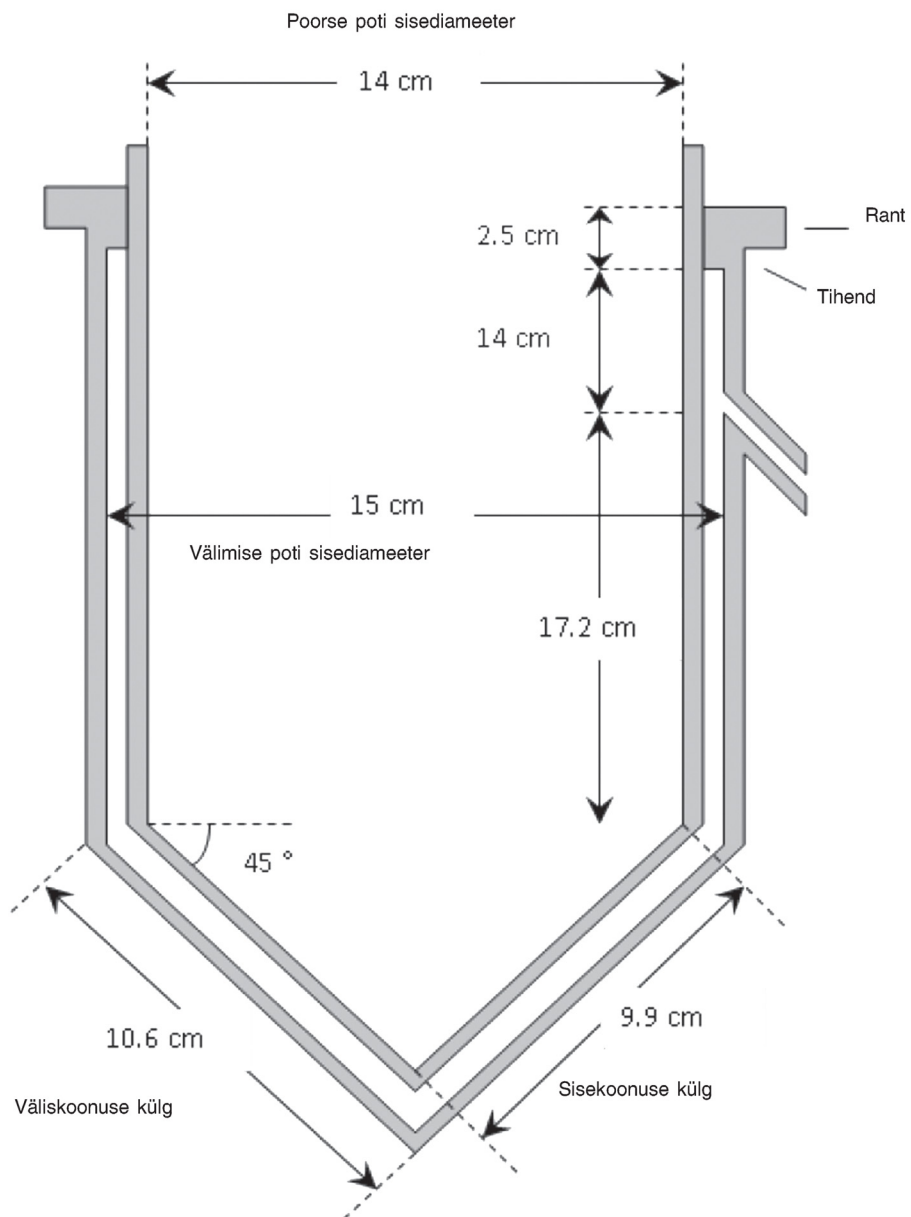
Poorne pott



- |                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| A. Hoiunõu                      | E. Kogumisnõu     |
| B. Doseerimispump               | F. Difusiooninõu  |
| C. Poorne aeratsiooninõu        | G. Õhuvoolumõõtur |
| D. Mitteläbilaskev välimine nõu |                   |

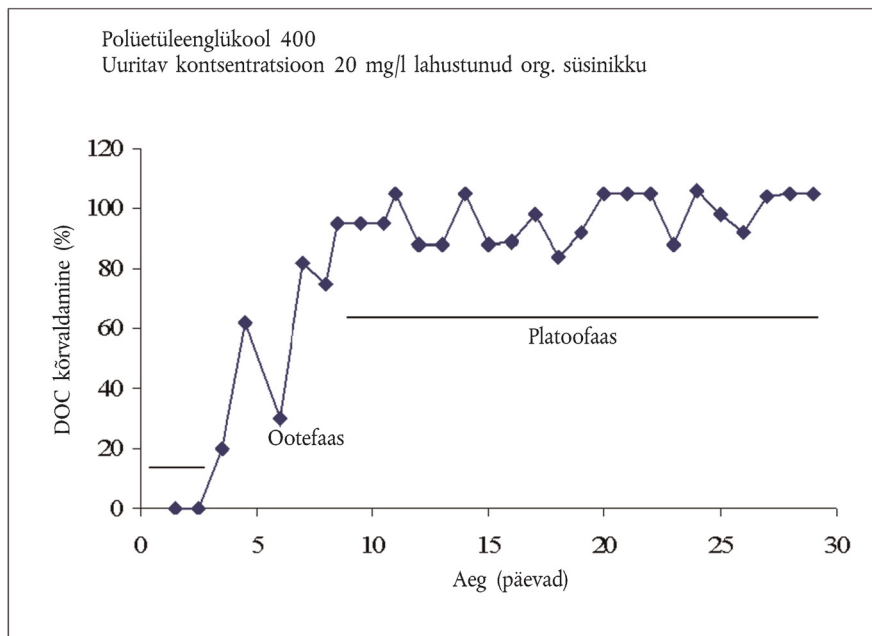
▼ **M4**

Joonis 3

**Kolmeliitrise poorse poti aeratsiooninõu andmed**

▼ **M4**

## 2. liide

**Kõrvaldamiskõvera näide**

▼ **M4**

## 3. liide

[TEADMISEKS]

## KATSESEADMETE ÜHENDAMINE

Et proovida võrdsustada reovett ja katsekemikaali käitleva katseseadme ning ainult reovett käitleva kontrollseadme mudade mikroobipopulatsioone, võeti kasutusele mudade igapäevane vahetamine teineteisega (1). See tegevus nimetati ühendamiseks ja selle meetodi kohta kasutatakse nimetust ühendatud seadmed. Ühendamist kasutati esialgu Husmanni aktiivmuda seadmetes, kuid seda on tehtud ka poorse poti seadmetega (2, 3). Ühendamata ja ühendatud seadmete vahel ei leitud Husmanni seadmete ega ka poorse poti seadmete kasutamisel tulemustes märkimisväärseid erinevusi, seega ei anna seadmete ühendamiseks kulutatud aeg ja energia eeliseid.

Mudavahetused võivad jätta olulise kõrvaldamise mulje, kuna osa katsekemikaalist kantakse üle ning katsekemikaali kontsentratsioonid katse- ja kontrollseadmete väljavooludes muutuvad peaaegu võrdseks. Seega tuleb kasutada parandustegureid, mis olenevad vahetatud osa suurusest ja keskmisest hüdraulilisest retentsiooniaegast. Arvutuste täpsemad kirjeldused on avaldatud (1).

Lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määra parandatud väärtused saab arvutada järgmise üldvalemi alusel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

kus

$D_{tc}$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise parandatud protsent

$D_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määratud protsent

$a$  = aktiivmuda seadmete mahust vahetatud osa

$r$  = keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (h)

Kui vahetatakse näiteks pool aeratsiooninõu mahust ( $a = 0,5$ ) ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg on kuus tundi, on parandusteguri võrrand järgmine:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

## KIRJANDUS

- 1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.
- 2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- 3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼ **M4**

## 4. liide

## AKTIIVMUDA INHIBITSIOONI HINDAMINE

**Protsessi inhibeerimine uuritava kemikaali poolt**

1. Kemikaali (või reovett) ei pruugita simulatsioonikatses käigus lagundada või kõrvaldada ning see võib isegi inhibeerida muda mikroorganisme. Muud kemikaale biolagundatakse väikesel kontsentratsioonil, kuid neil on suuremal kontsentratsioonil inhibeeriv mõju (hormees). Inhibeeriv mõju võib olla leitud juba varasemal etapil või selle võib kindlaks teha mürgisuse katsega, kasutades simulatsioonikatses kasutatavaga samalaadset või identset inokulumi (1). Kõnealused meetodid on hapniku tarbimise inhibitsioon (käesoleva lisa peatükk C.11 (2) ja ISO 8192 (3)) või muda organismide kasvu inhibitsioon (ISO 15522 (4)).
2. Simulatsioonikatses ilmneb inhibitsioon katsenõust ja kontrollnõust saadud väljavoolus lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe erinevusena, mis on suurem kui uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaaniline süsinik. Teisiti öelduna väheneb töötlemise käigus orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (ja biokeemilise hapnikutarbe, keemilise hapnikutarbe ja/või  $\text{NH}_4^+$ ) kõrvaldamise protsent uuritava kemikaali olemasolu tõttu. Sellisel juhul tuleks katset korrata, vähendades uuritava kemikaali kontsentratsiooni, kuni jõutakse tasemeni, mille juures inhibitsiooni ei teki, ja kui võib-olla vähendada kontsentratsiooni veel, hakatakse uuritavat kemikaali biolagundama. Kui uuritaval kemikaalil (või reoveel) on siiski protsessile kõigil katsetatud kontsentratsioonidel kahjulik mõju, näitab see seda, et kõnealust kemikaali on keeruline kui mitte võimatu bioloogiliselt töödelda, kuid otstarbekas võib olla korrata katset muust allikast pärit aktiivmudaga ja/või lastes mudal järkjärgulisemalt aklimatiseeruda.
3. Vastupidisel juhul, kui uuritav kemikaal simulatsioonikatses esimesel katsel biokõrvaldatakse, tuleks selle kontsentratsiooni suurendada, kui on vaja teada, kas kemikaalil võiks olla inhibeeriv mõju.
4. Inhibitsiooni astmete määramisel tuleks meeles pidada, et aktiivmuda populatsioon võib muutuda ja seega võivad mikroorganismid aja jooksul hakata inhibeerivat kemikaali taluma.
5. Inhibitsiooni määra arvutamine:

katse- ja kontrollseadmete biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne üldist kõrvaldamise protsenti  $R_o$  saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$R_o = 100 (I - E)/I\%$$

kus:

I = katse- ja kontrollnõu biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne kontsentratsioon (mg/l) sissevoolus,

E = vastavad kontsentratsioonid (mg/l) väljavoolus.

I ja E tuleb katseseadmetes uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaanilise süsiniku arvestamiseks parandada, muidu annavad inhibitsiooniprotsendi arvutused vale tulemuse.

**▼M4**

Uuritavast kemikaalist tingitud inhibitsiooni määra saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$\% \text{ inhibitsiooniprotsent} = 100 (R_c - R_t) / R_c$$

kus:

$R_c$  = kontrollnõudes kõrvaldamise protsent

$R_t$  = katsenõudes kõrvaldamise protsent

*KIRJANDUS*

- 1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- 2) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Biodegradatsioon – aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse”.
- 3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- 4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼ **M4**

## 5. liide

**Vees halvasti lahustuvad uuritavad kemikaalid – lenduvad kemikaalid****Vees halvasti lahustuvad kemikaalid**

Vees halvasti lahustuvate ja mittelahustuvate kemikaalide kasutamise kohta reovee puhastamist simuleerivates katsetes näib olevat avaldatud vähe töid (1, 2, 3).

Ei ole ühtegi uuritava kemikaali hajutamise meetodit, mis oleks kohaldatav kõigile mittelahustuvatele kemikaalidele. Näib, et kaks neljast standardis ISO 10634 (4) kirjeldatud meetodist on sobivad simulatsioonikatsetes uuritavate kemikaalide hajutamise proovimiseks; need on emulgaatorite ja/või ultrahelienergia kasutamine. Tuleks määrata niiviisi saadava dispersiooni püsivus vähemalt 24 tunni jooksul. Asjakohaselt stabiliseeritud dispersioone, mida hoitakse pidevalt segatavas mahutis (punkt 38), tuleks seejärel doseerida aeratsiooninõusse eraldi olmereoveest (või sünteetilisest reoveest).

Kui dispersioon on stabiilne, siis tuleb uurida, kuidas uuritavat kemikaali saab hajutatud kujul määrata. Lahustunud orgaaniline süsinik tõenäoliselt selleks ei sobi, seega tuleks uuritava kemikaali jaoks leida spetsiifiline analüüsimeetod, mida võiks kasutada väljavoolude, väljavoolu tahkete osakeste ja aktiivmuda puhul. Aktiivmuda protsessi simuleerimisel uuritava kemikaaliga toimuvad reaktsioonid tuleks seejärel määrata vedel- ja tahkes faasis. Seega määratakse massibilanss, et otsustada, kas uuritav kemikaal on biolagundatud. See näitaks siiski ainult esmast biolagunemist. Täieliku biolagunemise tõendamist tuleks proovida, kohaldades kiirele biolagundatavusele respiromeetrilist katset (käesoleva lisa peatüki C.4 (5) meetodid C.4-C, C.4-F või C.4-D), kasutades inokulumina simulatsioonikatsetes uuritava kemikaaliga kokku puutunud muda.

**Lenduvad kemikaalid**

Reovee puhastamise simulatsioonide kohaldamine lenduvatele kemikaalidele on nii vaieldav kui ka problemaatiline. Nagu ka vees halvasti lahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, näib olevat avaldatud vähe artikleid, milles kirjeldatakse lenduvate kemikaalide simulatsioonikatseid. Kasutatakse tavalist tüüpi täieliku segamise seadet ja tihendatud aeratsiooni- ja settenõusid, mõõdetakse ja kontrollitakse voolumõõdikute abil õhuvoolu ning juhitakse väljuv gaas läbi separaatorite, et koguda lenduvat orgaanilist ainet. Mõnikord kasutatakse vaakumpumpa, et juhtida väljuv gaas läbi külmseparaatori või läbipuhumis-separaatori, mis sisaldab gaaskromatograafiliste analüüsise jaoks Tenaxit ja silikageeli. Separaatoris leiduva uuritava kemikaali saab määrata analüütiliselt.

Katse tehakse kahes osas. Seadmeid käitatakse kõigepealt ilma mudata, aga sünteetilise reoveega ja uuritava kemikaaliga, mida pumbatakse aeratsiooninõusse. Kogutakse sissevoolu, väljavoolu ja väljutatud gaasi proovid ning paari päeva jooksul analüüsitakse uuritava kemikaali olemasolu neis. Kogutud andmete alusel on võimalik arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali protsent ( $R_{vs}$ ).

Seejärel tehakse (mudaga) tavaline bioloogiline katse väljapuhumise uuringuga identsetes tingimustes. Samuti tehakse lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe mõõtmised, et kontrollida seadmete tõhusat toimimist. Katse esimese osa jooksul tehakse aeg-ajalt analüüse, et määrata uuritav kemikaal sissevoolu, väljavoolu ja väljuvas gaasis; pärast aklimatiseerumist tehakse analüüse sagedamini. Statsionaarse oleku andmete põhjal võib arvutada uuritava kemikaali kõigi protsesside (füüsikaline ja bioloogiline) käigus vedelfaasist kõrvaldamise protsendi ( $R_T$ ) ning samuti süsteemist väljapuhutud osa ( $R_v$ ).

▼ **M4**

Arvutus

- a) Mittebioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsendi ( $R_{VP}$ ) järgmise võrrandi alusel:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kus

$R_{VP}$  = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel (%);

$S_{VP}$  = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal, väljendatuna vedelfaasi võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

$S_{IP}$  = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

- b) Bioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsendi ( $R_V$ ) järgmise võrrandi alusel:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kus

$R_V$  = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel bioloogilises katses (%);

$S_V$  = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal bioloogilises katses, väljendatuna sissevooluvedeliku võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

$S_I$  = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

- c) Bioloogilises katses võib kõikides protsessides kõrvaldatud uuritava kemikaali protsendi ( $R_T$ ) leida järgmise võrrandi alusel:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kus

$S_E$  = uuritava kemikaali kontsentratsioon (vedelas) väljavoolus (mg/l).

- d) Seega on võimalik arvutada liolagundamise ja adsorptsiooni teel kõrvaldatud protsenti ( $R_{BA}$ ) järgmisest võrrandist:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Tuleks teha eraldi katsed, et teha kindlaks, kas uuritavat kemikaali adsorbeeritakse; kui see on nii, siis võib teha täiendava paranduse.

- e) Bioloogilisest ( $R_V$ ) ja mittebioloogilisest ( $R_{VP}$ ) katsesüsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali osakaalu võrdlemine näitab üldist mõju, mis bioloogilisel töötlemisel on uuritava kemikaali heitele atmosfääri.

*Näide:* benseen

Muda retentsiooniaeg = neli päeva

Sünteesilise reovee retentsiooniaeg = kaheksa tundi

$S_{IP}$  =  $S_I$  = 150 mg/l

$S_{VP}$  = 150 mg/l ( $S_{EP}$  = 0)

$S_V$  = 22,5 mg/l

$S_E$  = 50 µg/l



**▼M4**

Seetõttu

$R_{VP} = 100 \%$ ,  $R_V = 15 \%$

$R_T = 100 \%$  ja  $R_{BA} = 85 \%$ .

Eeldati, et benseen ei adsorbeerunud mudale.

*KIRJANDUS*

- 1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.
- 2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- 3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- 4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- 5) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.

▼ **M4**

## 6. liide

**Muda retentsioonija mõju kemikaalide töödeldavusele**

## SISSEJUHATUS

1. Peamises tekstiosas kirjeldatud meetod kavandati selleks, et teha kindlaks, kas uuritavaid kemikaale (üldjuhul neid, mis on teadaolevalt iseeneslikult, aga mitte kohe biolagundatavad) on võimalik biolagundada reoveepuhastite piiratud tingimustes. Tulemused väljendatakse kõrvaldamise protsendina ja biolagundamise protsendina. Aktiivmuda seadmete käitamise tingimused ja sissevoolu valik võimaldavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni puhul väljavoolus üpris suuri erinevusi. Katsed tehakse ainult ühel muda tahkete osakeste nominaalsel kontsentratsioonil või ühe nominaalse muda retentsioonijaga ning kirjeldatud muda kõrvaldamise režiimid võivad põhjustada muda retentsioonija väärtuse märkimisväärset erinemist katse vältel nii eri päevadel kui ka ühe päeva jooksul.
2. Selle variandi (1, 2) puhul kontrollitakse muda retentsiooniga palju kitsamates piirides iga 24-tunnise ajavahemiku vältel (täpselt nagu suure ulatuse puhul), mille tulemusel saadakse püsivam kontsentratsioon väljavooludes. Soovitatakse kasutada olmereovett, kuna see annab kõrvaldamise püsivama ja suurema osakaalu. Samuti uuritakse mitme muda retentsioonija väärtuse mõju ning üksikasjalikumas uuringus võidakse määrata väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus temperatuurist.
3. Seni ei ole ühist arusaama selle kohta, millised kineetilised mudelid kirjeldavad kemikaali lagunemist reovee puhastamisel teatavatel tingimustel. Kogutud andmete kirjeldamiseks valiti bakterite kasvu ja substraadi kasutamise Monod' mudel (1, 2), kuna meetodit oli kavas kasutada ainult suurtes kogustes toodetavate kemikaalide puhul, mille kontsentratsioon reovees on üle 1 mg/l. Lihtsustatud mudeli ja tehtud eelduste õigsust kontrolliti erineva esmase biolagundatavusega alkoholetoksülaatide seeria abil (2, 3).

*Märkus.* Selles meetodi variandis on lähedaselt järgitud suurt osa käesoleva katsemeetodi C.10-A tekstist ning allpool on esitatud ainud need üksikasjad, mis on erinevad.

## KATSE PÕHIMÕTE

4. Aktiivmuda poorse poti seadmeid, mis on projekteeritud selleks, et võimaldada (peaaegu) pidevat vedela segu kõrvaldamist ja muda retentsioonija (SRT või  $\theta_s$ ) väga täpselt reguleerimist, kasutatakse ühendamata režiimis mitme muda retentsioonijaga ning soovi korral mitmel temperatuuril. Retentsiooniaeg on tavaliselt vahemikus 2–10 päeva ja temperatuur on 5–20 °C. Reovett (eelistatavalt olmereovett) ja uuritava kemikaali lahust doseeritakse seadmetesse eraldi sellise kiirusega, et saavutada nõutav reovee retentsiooniaeg (3–6 tundi) ja uuritava kemikaali nõutav kontsentratsioon sissevoolus. Kontrollseadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata, käitatakse samal ajal võrdlusandmete saamiseks.
5. Võib kasutada muud tüüpi seadmeid, kuid tuleks olla väga hoolikas, et tagada muda retentsioonija hea reguleerimine. Näiteks settenõuga puhasti kasutamisel võib olla vaja võtta arvesse puhasti väljavoolu kaudu toimuvat tahkete osakeste kadu. Lisaks tuleks võtta erilisi ettevaatusabinõusid, et vältida vigu, mida põhjustab muda koguse varieerumine settenõus.

**▼ M4**

6. Seadmeid käitatakse iga valitud tingimuste komplektiga ja pärast tasakaaluoleku saavutamist määratakse uuritava kemikaali väljavoolude keskmised statsionaarse oleku kontsentratsioonid ning soovi korral lahustunud orgaanilise süsiniku näitajad ligikaudu kolmenädalase ajavahemiku vältel. Lisaks uuritava kemikaali ja, soovi korral, lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsendi hindamisele tuleb graafiliselt esitada väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus puhasti kasutustingimustest. Selle alusel saab arvutada esialgsed kineetilised konstandid ja ennustada tingimusi, milles võib töödelda uuritavat kemikaali.

**ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

7. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 12 ja 13.

**KÜNNISVÄÄRTUSED**

8. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 14 ja 15.

**VÕRDLUSALUSENA KASUTATAV UURITAV KEMIKAAL**

9. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 16.

**KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS**

10. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 17 ja 18.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

11. Sobiv seade on muudetud poorse poti süsteem (liide 6.1). See koosneb sisemisest nõust (või vooderdisest), mis on valmistatud poorsest polüpropüleenist; vooderdise paksus on 3,2 mm ja poori suurus ligikaudu 90 µm. Nende omavaheline ühendus põkk-keevitatakse. (Nii saadakse töökindlam seade kui käesoleva peatüki C.10-A punktis 21 kirjeldatud seade). Vooderdis on paigutatud vett mitte läbi laskvasse polüetüleenist välisnõusse, mis koosneb kahest osast: ringikujuline alus, millesse on puuritud augud, et paigaldada kaks õhuvoolikut muda kõrvaldamise voolik, ning ülemine silinder, mis kruvitakse põhja külge ja millele on paigaldatud väljund, et tagada poorse poti teadaolev maht (3 liitrit). Üks õhuvoolikutest on varustatud õhuvoolu hajutava otsikuga (difuusorkiviga); teine on avatud otsaga ja asetatud potis kivi suhtes täisnurga all. Kõnealune süsteem tekitab keerise, mis on vajalik selleks, et poti sisu oleks täielikult segatud, ning tagab samuti lahustunud hapniku kontsentratsiooni üle 2 mg/l.
12. Vajalik arv seadmeid hoitakse reguleeritud temperatuuril vahemikus 5–20 °C (±1 °C) kas veevannis või püsiva temperatuuriga ruumis. Pumbad on vajalikud, et doseerida aeratsiooninõudesse uuritava kemikaali lahust ja settinud reovett nõutava kiirusega (vastavalt 0–1,0 ml/min ja 0–25 ml/min) ning kolmas pump on vajalik selleks, et kõrvaldada reomuda aeratsiooninõudest. Vajalik väga väike reomuda voolukiirus saavutatakse pumbaga, mis on seatud suuremale kiirusele ja mis lülitatakse aeg-ajalt sisse taimeriga lüliti abil, näiteks lülitatakse sisse 10 sekundiks minutis, pumpamiskiirus on 3 ml/min, mis annab kõrvaldamise kiiruse 0,5 ml/min.

*Filtrimiseseade või tsentrifuug*

13. Kohaldatakse peatüki C10-A punkti 23.

*Analüüsideadmed*

14. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 24.

*Vesi*

**▼ M4**

15. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 25 ja 26.

*Orgaaniline kasvukeskkond*

16. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 27.

*Sünteesiline reovesi*

17. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 28.

*Olmereovesi*

18. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 29.

*Aktiivmuda*

19. Kohaldatakse peatüki C10-A punkti 30.

*Uuritava kemikaali põhilahus*

20. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 31 ja 32.

**KATSE KÄIK***Inokulumi valmistamine*

21. Kohaldatakse ainult peatüki C.10-A punkti 34; kasutage aktiivmuda (ligikaudu 2,5 g/l).

*Katseseadmete arv*

22. Lihtsa katse jaoks, s.o kõrvaldamise protsendi mõõtmiseks, on vajalik ainult üks muda retentsiooniaeg, kuid ligikaudsete kineetiliste konstantide arvutamiseks vajalike andmete saamiseks on vaja 4 või 5 muda retentsiooniaja väärtust. Tavaliselt valitakse väärtused vahemikus 2–10 päeva. Praktilistel kaalutlustel on kasulik teha katse samal ajal 4 või 5 muda retentsioonijaga ühel temperatuuril; pikendatud uuringute puhul kasutatakse muudel temperatuuridel vahemikus 5–20 °C samu muda retentsiooniaja väärtusi või erinevat väärtuste vahemikku. Esmase biolagunemise (peamine kasutus) korral on ühe tingimuste komplekti jaoks vaja tavaliselt ainult ühte seadet. Täieliku biolagunemise korral on siiski iga tingimuste komplekti jaoks vaja kontrollseadet, millesse lisatakse reovett, kuid mitte uuritavat kemikaali. Kui arvatakse, et uuritavat kemikaali esineb kasutatavas reovees, oleks vaja kasutada esmase biolagunemise hindamisel kontrollseadmeid ja teha arvutustes vajalikud parandused.

*Orgaanilise kasvukeskkonna ja uuritava kemikaali doseerimine*

23. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 36–39, kuid pange tähele, et uuritava kemikaali lahust doseeritakse eraldi ja kasutatakse erinevaid muda kõrvaldamise määrasid. Samuti tuleb sagedasti jälgida (näiteks kaks korda päevas) sissevoolu, väljavoolu ja muda kõrvaldamise voolukiiruseid ning vajaduse korral neid kohandada, et erinevus soovitud oleks  $\pm 10$  % piires. Kui olmevee kasutamisel tekivad analüüsimeetoditega seotud probleemid, siis tehke katse sünteetilise reoveega, aga tuleb tagada, et erinevad kasvukeskkonnad annavad võrreldavaid kineetilisi andmeid.

*Aktiivmuda seadmete käsitsemine*

24. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 40–43, kuid reguleerige muda retentsiooniega ainult muda „pideva” kõrvaldamise abil.

*Proovide võtmine ja analüüsimine*

25. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 44–50, selle erinevusega, et tuleb määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon ja soovi korral lahustunud orgaaniline süsinik; keemilist hapnikutarvet ei tohiks kasutada.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

26. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 52–54.

**Katsetulemuste esitamine**

27. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 56–62.

**Kineetiliste konstantide arvutamine**

28. Esmase biolagundamise protsendi esitamise asemel on realistlikum esitada uuritava kemikaali keskmine stacionaarse oleku kontsentratsioon välja-voolus ja kirjeldada, kuidas see sõltub puhasti erinevatest käitamise tingimustest. Seda on võimalik teha liites 6.2 esitatud võrrandi 6 abil, millest võib leida  $K_S$ ,  $\mu_m$  ja  $\theta_{SC}$  väärtused (muda kriitiline retentsiooniaeg).

(Selle asemel võib leida  $K_S$  ja  $\mu_m$  ligikaudsed väärtused, kasutades lihtsat arvutiprogrammi, millega võrrandi 2 (liide 6.2) järgi arvatud teoreetilist kõverat sobitatakse saadud eksperimentaalsete väärtustega. Kuigi ühtki lahendust ei saa pidada ainsaks õigeks lahenduseks, on võimalik saada  $K_S$  ja  $\mu_m$  mõistlikud ligikaudsed väärtused.)

**Tulemuste hajuvus**

29. On teada, et iga üksiku kemikaali jaoks saadud kineetiliste parameetrite väärtused hajuvad. Arvatakse, et muda kasvatamise tingimused ning samuti katses valdavalt esinenud tingimused (nagu punktis 5 ja muudes katsetes) mõjutavad saadud väärtusi oluliselt. Ühte sellise muutlikkuse taku on arutanud Grady *et al.* (4), kes on soovitanud kasutada kineetilise eksperimendi käigus kultuuri saavutatava võimaliku füsioloogilise oleku kahe äärmusliku seisundi jaoks mõisteid „tegelikult esinev” (*extant*) ja „olemuslik” (*intrinsic*). Kui oleku muutumist katse jooksul ei lubata, väljendavad kineetilise parameetri väärtused selle keskkonna tingimusi, kust mikroorganismid hangiti; neid väärtusi nimetatakse tegelikult või parajasti esinevaks. Teise äärmuse korral, kui katsetingimused võimaldavad valgusühendite süsteemi täielikku väljaarenemist ja seega maksimaalset võimalikku kasvukiirust, nimetatakse saadud kineetilisi parameetreid olemuslikuks ning need olenevad ainult substraadi laadist ja kultuuris sisalduvate bakterite tüüpidest. Juhinduda võib sellest, et tegelikult esinevad väärtused saadakse siis, kui substraadi kontsentratsiooni ja kompetentsete mikroorganismide suhe ( $S_0 / X_0$ ) hoitakse madal, näiteks 0,025, ning olemuslikud näitajad esinevad siis, kui suhe on kõrge, näiteks vähemalt 20. Mõlemal juhul peaks  $S_0$  olema asjakohase poolküllastatuse konstandiga  $K_S$  võrdne või seda ületama.
30. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogia ja -keemia ühingu õpikojas (5). Neist avaldatud ja kavandatavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevasi katsemeetodeid paremini kavandada.

**KIRJANDUS**

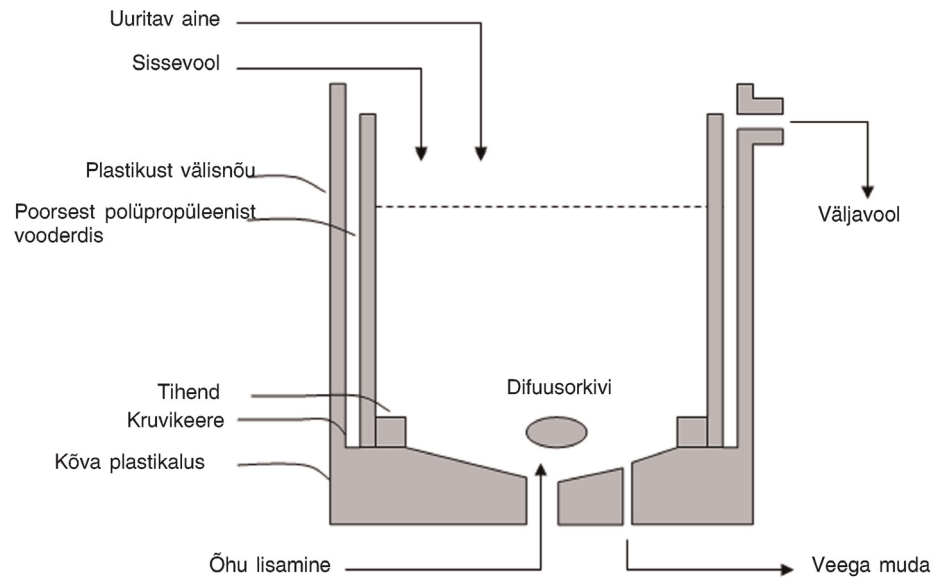
- 1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.
- 2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.
- 3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼ **M4**

- 4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.*, 30 (3): 742–748.
- 5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼ **M4**

Liide 6.1

**Muda retentsioonaja reguleerimisega poorne pott**

▼ **M4**

## Liide 6.2

**Kineetiliste konstantide arvutamine**

1. Kui eeldada Monod' kineetika kehtivust ning võtta arvesse aktiivsete tahkete osakeste ja substraadi massibilanssi aktiivmuda süsteemis (1), on võimalik leida järgmised statsionaarse oleku näitajad:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

või

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2],$$

kus

$S_1$  = substraadi kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

$K_s$  = poolküllastatuse konstant, kontsentratsioon, mille juures  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)

$\mu$  = kasvu erikiirus ( $d^{-1}$ )

$\mu_m$  =  $\mu_m$  ( $d^{-1}$ ) maksimumväärtus

$K_d$  = aktiivsete tahkete osakeste kadumise erikiirus ( $d^{-1}$ )

$\theta_s$  = muda keskmine retentsiooniaeg, SRT (d)

Selle võrrandi uurimisel võib teha järgmised järeldused:

- i) väljavoolu kontsentratsioon ei sõltu sissevoolu kontsentratsioonist ( $S_0$ ); seega muutub biolagundamise protsent sissevoolu kontsentratsiooni  $S_0$  muutumisel;
- ii) ainus juhitav puhasti parameeter, mis mõjutab  $S_1$  väärtust, on muda retentsiooniaeg  $\theta_s$ ;
- iii) sissevoolu kindla kontsentratsiooni  $S_0$  puhul on olemas kriitiline muda retentsiooniaeg, mis vastab järgmistele tingimustele:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3],$$

kus

$\theta_{SC}$  = kriitiline muda retentsiooniaeg, millest väiksema väärtuse puhul uhutakse kompetentsed mikroorganismid puhastist välja;

- iv) kuna võrrandi 2 muud parameetrid on seotud kasvu kineetikaga, mõjutab temperatuur tõenäoliselt substraadi sisaldust väljavoolus ja muda kriitilist vanust, s.o teatava töötlemismäära saavutamiseks vajalik muda retentsiooniaeg suureneb temperatuuri vähendamisega.
2. Poorse poti süsteemi tahkete ainete massibilansi alusel ja eeldades, et tahkete osakeste kontsentratsioon puhasti väljavoolus  $X_2$  on väike aeratsiooninõu kontsentratsiooniga  $X_1$  võrreldes, on muda retentsiooniaeg

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$



▼ M4

ja,

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kus

$V$  = aeratsiooninõu maht (l)

$X_1$  = tahkete osakeste kontsentratsioon aeratsiooninõus (mg/l)

$X_2$  = tahkete osakeste kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

$Q_0$  = sissevoolu voolukiirus (l/d)

$Q_1$  = reomuda voolukiirus (l/d)

Seega on muda retentsiooniaega võimalik reguleerida mis tahes eelnevalt valitud väärtusele reomuda voolukiiruse  $Q_1$  reguleerimisega.

Järeldused

3. Katse peamine eesmärk on seega võimaldada prognoosida kontsentratsiooni väljavoolus ja sellest tulenevalt uuritava kemikaali taset suublates.
4. Kui koostada väljavoolukontsentratsiooni  $S_1$  retentsiooniajast  $\theta_s$  sõltuvuse graafik, on mõnikord võimalik hinnata muda kriitilist retentsiooniaega  $\theta_{SC}$ , vt kõver 3 joonisel 1. Kui see ei ole võimalik, võib arvutada  $\theta_{SC}$  koos  $\mu_m$  ja  $K_S$  ligikaudsete väärtustega, kui koostada  $S_1$  sõltuvus  $S_1 \cdot \theta_s$ -st.

Võrrandi 1 teisendamise saame:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_S}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Kui  $K_d$  on väike, siis  $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$  ja võrrandist 5 saame:

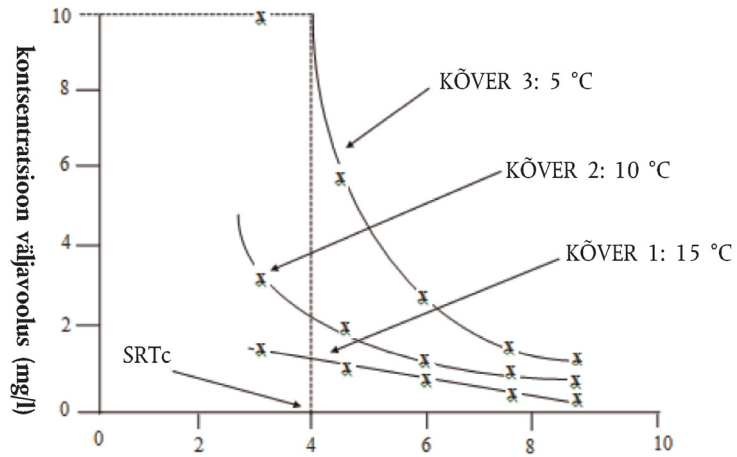
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_S}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Seega peaks graafik olema sirge joon (vt joonis 2) tõusuga  $1/\mu_m$  ja algõiguga  $K_S/\mu_m$ ; sellest tuleneb ka, et  $\theta_s \sim 1/\mu_m$ .

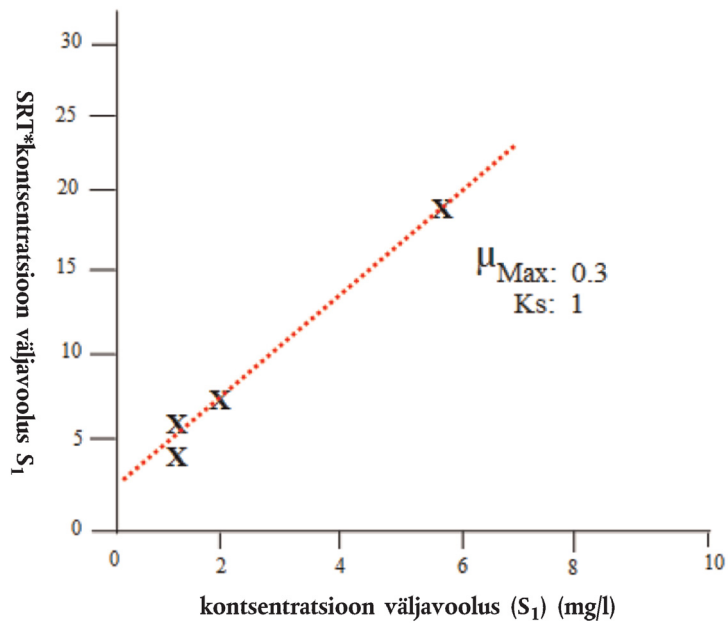
▼ M4

Joonis 1

Kolm temperatuuri; viis muda retentsiooniaega



Joonis 2

Muda retentsiooniaja regressioonijoon  $S_1$  vs.  $S_1$  T = 5 °C juures

Terminid:

kontsentratsioon väljavoolus

kõver

▼ **M4**

## 7. liide

KATSE VÄIKESE KONTSENTRATSIOONI ( $\mu\text{g/l}$ ) VAHEMIKUS

1. Paljud kemikaalid esinevad veekeskkonnas (isegi reovees) tavaliselt väga väheses kontsentratsioonis ( $\mu\text{g/l}$ ). Sellises kontsentratsioonis ei ole need tõenäoliselt peamised kasvu põhjustavad substraadid; on tõenäoline, et neid lagundatakse kasvu mittepõhjustavate teiseste substraatidena koos mitmesuguste looduslike orgaaniliste ainetega. Seega ei vasta selliste kemikaalide lagunemine 6. liites esitatud mudelile. Võib kasutada mitmeid mudeleid ja reoveepuhastites peamiselt esinevates tingimustes võib samal ajal olla kasutatav rohkem kui üks mudel. Selle asjaolu täpsustamiseks tuleb teha palju rohkem uurimistööd.
2. Seni võib järgida põhitekstis (peatükk C.10-A) kirjeldatud meetodit, aga ainult esmase biolagundatavuse puhul, kasutades sobivalt väikseid kontsentratsioone ( $< 100 \mu\text{g/l}$ ) ja valideeritud analüüsimeetodit. Kui võetakse arvesse ka abiootilisi protsesse (adsorptsioon, lendumine jne), võib arvutada biolagundatavuse protsendi (vt käesoleva katsemeetodi punkt 54). Näitena võib kasutada Nyholmi ja tema kolleegide uuringut (1, 2), milles uuritavat kemikaali lisati neljatunnise tsükliga täitmise ja tühjendamise süsteemi (*fill and draw system*). Nad teatasid pseudo-esimese järgu kineetilised konstandid viie kemikaali jaoks, mis lisati sünteetilisse reovette kontsentratsioonil 5–100  $\mu\text{g/l}$ . (Täieliku biolagundatavuse jaoks võib kasutada  $^{14}\text{C}$  märgistusega uuritavaid kemikaale.) Selle kirjeldamine jääb käesolevast katsemeetodist välja, kuna seni puuduvad kinnitatud meetodid, kuigi ISO 14592 (3) jaoks välja pakutud meetod sisaldab suuniseid  $^{14}\text{C}$  märgistusega kemikaalide kasutamise kohta.

**Poolpidev aktiivmudatest**

3. Hiljem pakuti välja lihtsam kahest etapist koosnev katse (4, 5, 6); poolpideva aktiivmudatesti (SCAS testi) meetodile järgnevad lühiajalised kineetilised katsed poolpideva aktiivmudatesti seadmetest võetud proovidega. Poolpideva aktiivmudatesti süsteemi käitatakse muda kõrvaldamise teadaoleva määraga (erinevalt algsest katsemeetodist C.12) ja sinna lisatakse muudetud OECD sünteetilist reovett või olmereovett. Sünteetilist reovett muudeti (pH muutumise ja muda halva settivuse tõttu) ning lisati puhverdamiseks fosfaati, pärmiekstrakti, raud(III)kloriidi ja mikroelementide soolasisid; selle keemiline hapnikutarve suurendati ligikaudu väärtuseni 750 mg/l peptooni ja lihaekstrakti kontsentratsiooni suurendamisega. Seadmeid käitati 24-tunnise tsükliga: aeratsioon 23 tunni vältel, muda kõrvaldamine, settimine, supernatandi (väljavoolu) kõrvaldamine, millele järgnes sünteetilise reovee lisamine ja uuritava kemikaali lisamine kuni kontsentratsioonini 100  $\mu\text{g/l}$  (s.o ligikaudu samal kontsentratsioonil, mida kasutati kiirkatsetes). Kord nädalas vahetati 10 % mudakogusest värske muda vastu, et säilitada tasakaalustatud mikroobipopulatsiooni.
4. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõdetakse alguses ja aeratsiooni lõpus ning katset jätkatakse, kuni saavutatakse uuritava kemikaali konstantse kiirusega kõrvaldamine; selleks võib kuluda üks nädal kuni mitu kuud.

**Kiirkatse**

5. Uuritava kemikaali lagunemise pseudo-esimest järku kiiruskonstandi määramiseks teadaoleva, kuid erineva päritolu ja varasema kasutusega aktiivmudas kasutatakse kiirkatset (näiteks kaheksa tundi). Aklimatiseerumiskatse ajal (punktid 3 ja 4) võetakse poolpideva aktiivmudatesti reaktoritest muda proovid (aeratsiooni ajavahemiku lõpus, kui orgaanilise substraadi kontsentratsioon on väike). Võrdluseks võib võtta ka muda paralleelsest poolpideva aktiivmudatesti seadmest, mis ei ole uuritava kemikaaliga kokku puutunud.

**▼ M4**

Muda segusid lisatud uuritava kemikaaliga (kaks või enam kontsentratsiooni vahemikus 1–50 µg/l) aereeritakse ilma sünteetilist reovett või muud orgaanilist substraati lisamata. Lahusesse alles jäänud uuritav kemikaal määratakse korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga tund, olenevalt kemikaali lagundatavusest, kuni 24 tunni jooksul. Enne sobiva analüüsimeetodi kasutamist proovid tsentrifuugitakse.

**Arvutused**

6. Poolpideva aktiivmudatesti seadmetega saadud andmeid kasutatakse uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi arvutamiseks (punkt 54). Samuti saab arvutada keskmise kiiruskonstandi  $K_1$  (mis on hõljuvaine kontsentratsiooni järgi normaliseeritud) järgmisest võrrandist:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

kus

$t$  = aeratsiooniaeg (23 h)

$C_e$  = kontsentratsioon aeratsiooniaja lõpus (µg/l)

$C_i$  = kontsentratsioon aeratsiooni alguses (µg/l)

$SS$  = aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon (g/l)

7. Kiirkatses koostatakse uuritava kemikaali allesoleva kontsentratsiooni log% ajast sõltuvuse graafik ning graafiku alguse (10–50 % lagunemist) tõus on võrdväärne pseudo-esimest järku kiiruskonstandiga  $K_1$ . Konstant normeeritakse muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga: tõus jagatakse läbi muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga. Teatatud tulemus peab samuti sisaldama andmeid uuritava kemikaali ja hõljuvaine lähtekontsentratsioonide, muda retentsiooniaja, muda koguse ja päritolu kohta ning uuritava kemikaaliga eelneva kokkupuute kohta (kui see on toimunud).

**Tulemuste hajuvus**

8. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogia ja -keemia ühingu õpikojas (7). Neist avaldatud ja kavandatavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevasi katsemeetodeid paremini kavandada.

**KIRJANDUS**

- 1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.
- 2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.
- 3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

**▼ M4**

- 4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and  $\mu\text{g/l}$  range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851–864.
- 5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low ( $\mu\text{g/l}$  range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711–735.
- 6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- 7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6<sup>th</sup> Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼ **M4****C.10-B: biokiled**

## SISSEJUHATUS

1. Simulatsioonikatseid kasutatakse enamasti selliste kemikaalide puhul, mis kiire biolagundatavuse sõelumiskatse (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F (9)) kohaselt ei ole kiiresti biolagundatavad, kuid mis on siiski iseeneslikult biolagunevad. Erandkorras kasutatakse simulatsioonikatset ka iga kemikaali puhul, mille kohta on vaja rohkem teavet, eelkõige masstootmises olevate kemikaalide puhul, ja tavaliselt kasutatakse aktiivmuda katset (C.10-A). Mõnel juhul vajatakse siiski konkreetset teavet kemikaali käitumise kohta biokiledega seotud reovee puhastamise meetodite puhul, eelkõige nõrgfiltrite, pöörlevate bioloogiliste kontaktseadmete ja keevkihttehnoloogiate puhul. Selle vajaduse täitmiseks on välja töötatud mitmesugused vahendid.
2. Gerike *et al.* (1) kasutasid suuri pooltööstuslikke nõrgfiltreid ühendatud režiimis. Need filtrid võtsid palju ruumi ja vajasis suhteliselt palju reovett või sünteetilist reovett. Truesdale *et al.* (2) kirjeldasid väiksemaid filtreid (läbimõõduga 6 jalga × 6 tolli), millesse lisati pindaktiivseid aineid mitte sisaldavat naturaalselt reovett, kuid nende jaoks oli siiski vaja suhteliselt suuri reoveekoguseid. Valmis (küpse) biokile loomiseks kulus 14 nädalat ning pärast pindaktiivse uuritava aine esmakordset lisamist kulus veel 4–8 nädalat, enne kui biokile oli aklimatiseerunud.
3. Baumann *et al.* (3) töötasid välja palju väiksema filtri, milles biokilet toetava inertse kasvukeskkonnana kasutati eelnevalt aktiivmudas immutatud nn polüesterfliisi. Uuritavat kemikaali kasutati ainsa süsinikuallikana ja biolagundatavust hinnati sissevoolus ja väljavoolus lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmise teel ning väljunud gaasis CO<sub>2</sub> koguse hindamise alusel.
4. Hoopis erinevat lähenemisviisi kasutasid Gloyna *et al.* (4), kes leiutasid pöörleva torureaktori. Pöörleva toru sisepinnal kasvatati teadaoleval pindalal biokile, lastes läbi horisontaalsuuna suhtes väikese nurga all oleva toru ülemise osa kaudu lisatavat sissevoolu. Reaktorit on kasutatud pindaktiivsete ainete biolagundatavuse uurimiseks (5) ning samuti biokile optimaalse paksuse ja läbi kile difusiooni uurimiseks (6). Viimati nimetatud autorid arendasid reaktorit edasi, muu hulgas täiustades seda väljuvas gaasis CO<sub>2</sub> määramise võimaldamiseks.
5. Pöörleva torureaktori kinnitas analüütikute alaline komitee (Ühendkuningriik) kui standardmeetodi, millega hinnatakse kemikaalide biolagundatavust (7) ning reovete puhastatavust ja mürgisust (8). Siin kirjeldatud meetodi eelised on lihtsus, kompaktsus, korratavus ja orgaanilise kasvukeskkonna suhteliselt väikse koguse kasutamine.

## KATSE PÕHIMÕTE

6. Kaldu oleva aeglaselt pöörleva toru sisepinnale lisatakse sünteetilist või olmereovett ja uuritavat kemikaali kas seguna või eraldi. Sisepinnale tekib mikroorganismide kiht, mis on samaladne biofiltrites esinevaga. Reaktori kasutamise tingimused valitakse sellised, et tagada orgaanilise aine piisav kõrvaldamine ja vajaduse korral ammooniumi oksüdeerumine.

▼ **M4**

7. Väljavool torust kogutakse ja kas seatakse ja/või filtritakse enne lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või uuritava kemikaali analüüsimist spetsiifilise meetodi abil. Samal ajal ja samadel tingimustel käitatakse võrdluseks kontrollkatse seadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata. Katse- ja kontrollseadmete väljavoolus ilmnev lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalidest ja selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritava kemikaali kontsentratsiooniga (väljendatud lahustunud orgaanilise süsinikuna), et arvutada uuritava kemikaali kõrvaldamine.
8. Biolagunemist on bioadsorptsioonist üldiselt võimalik eristada nii, et uuritakse hoolikalt kõrvaldamismäära ajast sõltuvuse graafikut. Tavaliselt saab seda kinnitada kiire biolagundatavuse katsega (hapniku sidumine või süsinikdioksiidi tekkimine), kasutades aklimatiseeritud inokulumi, mis on võetud katse lõpus nendest reaktoritest, kuhu on lisatud uuritavat kemikaali.

## ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Tulemuste õigeks tõlgendamiseks peaksid olema teada uuritava kemikaali puhtus, vees lahustuvus ning lenduvuse ja adsorptsiooniga seotud omadused.
10. Lenduvaid ja halvasti lahustuvaid kemikaale ei ole tavaliselt võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt peatüki C.10-A 5. liide). Samuti peaks olema teada keemiline struktuur või vähemalt empiiriline valem, et arvutada teoreetilised väärtused ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, nagu teoreetiline hapnikutarve, lahustunud orgaaniline süsinik.
11. Sobiva katsekonsentratsiooni valimisel võivad abiks olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt peatüki C.10-A 4. liide); väikeste biolagundamise väärtuste õigeks tõlgendamiseks on need hädavajalikud.

## KÜNNISVÄÄRTUSED

12. Algul nõuti pindaktiivse kemikaali turule lubamiseks vähemalt 80 % esmast biolagundatavust. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib kohaldada kõnealust simulatsiooni (kinnitavat) katset ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalidest kõrvaldatakse. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki vastuvõetavuse/vastuvõetamatuse taseme küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalidest põhjustatud ohu hindamiseks. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatest kemikaalidest rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem kui 90 % puhul on see > 80 %.

## VÕRDLUSKEMIKAALID

13. Katse nõuetekohaseks tegemiseks on kasulik teha aeg-ajalt katseid võrdluskemikaalidega, mille käitumine on teada. Kõnealused kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape ja 1-naftoehape.

## KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

14. Ühendkuningriigi labor leidis, et katsete suhteline standardhälve ühes laboris oli 3,5 % ja katsete vahel 5 % (7).

▼ **M4****MEETODI KIRJELDUS****Seadmed***Pöörlevad torureaktorid*

15. Seade (vt 8. liite joonised 1 ja 2) koosneb akrüülitorude komplektist, milles iga toru pikkus on 30,5 cm ja siseläbimõõt 5 cm; torud asuvad kummiümbrisega ratastel, mis paiknevad metallist tugiraamis. Igal torul on ligikaudu 0,5 cm võrra välja ulatuv äärik, et toru püsiks ratastel. Sisepind on muudetud jämeda traatvillaga karedamaks ning ülemises (sissevoolu) otsas 0,5 cm võrra välja ulatuv sisemine äärik, mis hoiab vedelikku torus. Torud on rõhtasendi suhtes ligikaudu ühekraadise nurga all, et saavutada uuritava keskkonna läbi puhta toru suunamisel vajalik kokkupuuteaeg. Kummiümbrisega rattaid pööratakse aeglase reguleeritava kiirusega mootori abil. Torude temperatuuri reguleeritakse sellega, et seade asub püsiva temperatuuriga ruumis.
16. Kui iga torureaktor pannakse mõnevõrra suuremasse korgiga torusse ja tagatakse ühenduste õhutihedus, on võimalik koguda väljuv gaasiline CO<sub>2</sub> hili-semaks määramiseks leeliselahusesse (6).
17. Iga toru jaoks hoitakse 20 l nõus (A) (vt joonis 2) 24-tunnist orgaanilise kasvukeskkonna varu, vajaduse korral koos lisatud uuritava kemikaaliga. Vajaduse korral võib eraldi doseerida uuritava kemikaali lahust. Iga sellise nõu põhja lähedal on väljalase, mis on sobiva (näiteks silikoonkummist) toru ja peristaltilise pumba (B) kaudu ühendatud klaasist või akrüülist pealevoolutoruga, mis ulatub 2–4 cm võrra kalduoleva toru ülemise (pealevoolu-)otsa (C) sisse. Väljavoolul lastakse kallutatud toru alumisest otsast tilkuda, et koguda see teise nõusse (D). Väljavool seatakse või filtreeritakse enne analüüsi tegemist.

*Filtrimisseade-tsentrifuug*

18. Proovide filtrimiseks mõeldud seade, milles on sobiva poorsuurusega (ava nominaalläbimõõt 0,45 µm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljauhutav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s<sup>2</sup>.
19. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:
  - lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;
  - konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist (kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, gaaskromatograafia jne);
  - pH, temperatuur, happelisus ja leeliselisus;
  - ammoonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

*Vesi*

20. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.
21. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.



▼ **M4***Orgaaniline kasvukeskkond*

22. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud, et ainult olmereovee kasutamisel saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent (aktiivmuda seadmetes) ning sellest saab biolagundada isegi mõnd sellist kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatav. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni (või keemilist hapnikutarvet) tuleb mõõta igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis. On vaja teada orgaanilise kasvukeskkonna happelisust või leeliselisust. Kui kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on väike, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumvesinikfosfaat), et hoida katse ajal reaktoris pH väärtus ligikaudu  $7,5 \pm 0,5$ . Lisatava puhvri kogus ja lisamise aeg tuleb otsustada igal juhul eraldi.

*Sünteetiline reovesi*

23. Ühes liitris kraanivees lahustatakse 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti; 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati ( $K_2HPO_4$ ), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriidihüdraati ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ). See OECD sünteetiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentratsiooni võib valmistada destilleeritud veega ja hoida kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Vajaduse korral lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid midagi paremat pole soovitatud, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

*Olmereovesi*

24. Kasutage värskelt settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda esmase settimise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C, kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal olulisel määral vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partiis viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

*Määrdeaine*

25. Peristaltilise pumba rullikute määrimiseks võib kasutada glütserooli või oliiviõli: mõlemad on sobivad silikoonkummist torudega kasutamiseks.

*Uuritava kemikaali põhilahused*

26. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga põhilahus (näiteks 1–5 g/l) deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalses osas. Lahustumatu kemikaali kohta vt peatüki C.10-A 5. liide. Seda meetodit ei saa torureaktoreid muutmata (punkt 16) kasutada lenduva kemikaali puhul. Määrake põhilahuses lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrae mõõtmisi iga uue partii korral. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, siis kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust vees.

▼ **M4**

Võrrelge lahustunud orgaanilist süsinikku või uuritava kemikaali kontsentratsiooni, mis on mõõdetud põhilahuses spetsiifilise analüüsimeetodi abil, nimi-väärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada > 90 %). Veenduge (eelkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul tuleb proovid tsentrifugeerida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodi abil.

27. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahust väikse koguse anorgaanilise happe või alusega, et pH oleks  $7 \pm 0,5$ , kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

**KATSE KÄIK***Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine*

28. Hoolitsege, et kõik sissevoolu- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõust väljuv ja väljavoolunõusse sisenev toru on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe.
29. Valmistage värske sünteetiline reovesi (punkt 23) iga päev kas tahketest lähteainetest või kontsentreeritud põhilahusest, lahjendades seda vajaliku koguse kraaniveega. Mõõtke nõutav kogus silindriga välja ja viige see puhtasse sissevoolunõusse. Vajaduse korral lisage sünteetilisse reovette enne lahjendamist ka vajalik kogus uuritava kemikaali või võrdluskemikaali põhilahust. Kui nii on mugavam või saab sellega vältida uuritava kemikaali kadusid, siis valmistage eraldi mahutis uuritava kemikaali lahjendatud lahus ja sisestage see eraldi teise doseerimispumba abil kaldega torusse.
30. Teise võimalusena (ja eelistatavalt) kasutage settinud olmereovett (punkt 24), mis kogutakse võimaluse korral iga päev uuesti.

*Pöörlevate torureaktorite käitamine*

31. Ühe uuritava kemikaali hindamiseks vajatakse kahte identset torureaktorit ja need seatakse üles püsiva temperatuuriga ruumis, tavaliselt  $22 \pm 2$  °C.
32. Reguleerige peristaltilisi pumpasid, et need pumpaksid orgaanilist kasvukeskkonda (ilma uuritava kemikaalita;  $250 \pm 25$  ml/h) kaldega torudesse, mida pööratakse kiirusel  $18 \pm 2$  pööret minutis. Lisage pumba torudele katse alguses ja katse vältel regulaarselt määrdeainet (punkt 25), et tagada korralik toimimine ja pikendada torude kasutusiga.
33. Reguleerige torude kalle rõhtasendi suhtes nii, et sissevoolulahus viibiks puhtas torus  $125 \pm 12,5$  s. Hinnake viibimisaeg sissevoolu mittebioloogilise markeri (näiteks NaCl, inertse värvaine) lisamise teel: keskmiseks viibimisaeg arvatakse väljavoolus tippkontsentratsioonini jõudmiseks vajalikku aega (kui on tekkinud maksimaalne kile, võib viibeag suurendada kuni ligikaudu 30 minutini).
34. Selliste määrade, kiiruste ja aegade juures on täheldatud piisavat lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamist (> 80 %) ning nitrifitseeritud väljavoolu tekkimist. Kui kõrvaldamine ei ole piisav või kui tuleb simuleerida konkreetse puhasti tulemusi, tuleks voolukiirust muuta. Viimati nimetatud juhul reguleerige orgaanilise kasvukeskkonna doseerimise kiirust, kuni reaktori töö tulemuslikkus vastab puhasti töö tulemuslikkusele.

▼ **M4***Inokulatsioon*

35. Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib mikroorganismide kasvu algatamiseks piisata õhukaudsest inokulatsioonist, vastasel juhul aga lisage sisestusse kolme päeva jooksul 1 ml/l settinud reovett.

*Mõõtmised*

36. Kontrollige korrapäraste ajavahemike järel, et doosimäärad ja pöörlemiskiirused oleksid vajalikes piirides. Samuti mõõtke väljavoolu pH-d, eelkõige siis, kui eeldatakse nitrititseeerimist.

*Proovide võtmine ja analüüsimine*

37. Proovide võtmise meetod, skeem ja sagedus valitakse katse eesmärgi järgi. Näiteks võib sissevoolust ja väljavoolust võtta hetkeproove (*snap/grab*) või koguda proov pikema aja, näiteks kolme kuni kuue tunni vältel. Esimesel ajavahemikul, mil uuritavat kemikaali veel sees ei ole, võtke proove kaks korda nädalas. Filtrige proovid läbi membraanide või tsentrifuugige neid kiirusel ligikaudu 40 000 m/s<sup>2</sup> umbes 15 minutit (punkt 18). Enne läbi membraanide filtrimist võib olla vajalik lasta proovidel settida ja/või neid jämefiltriga filtrida. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) vähemalt kaks korda ning vajaduse korral ka biokeemiline hapnikutarve, ammonium ja nitrit/nitraat.
38. Kõik analüüsid tuleks teha pärast proovide kogumist ja ettevalmistamist võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tihedalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist või sobiva mürgise kemikaali lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamismeetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

*Sissetöötamisperiood*

39. Sellel ajavahemikul kasvab pinna biokile optimaalse paksuseni, milleks kulub tavaliselt ligikaudu kaks nädalat ja milleks ei tohiks kuluda üle kuue nädala. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine (punkt 44) (või keemiline hapnikutarve) suureneb ja jõuab tasakaaluoleku väärtuseni. Kui torudes on jõutud sarnaste platooväärtusteni, valitakse üks toru ülejäänud katse vältel kontrollseadmena kasutamiseks ning sel ajal peaks torude tõhusus püsivaks jääma.

*Uuritava kemikaali lisamine*

40. Sellel etapil lisage vajaliku kontsentratsiooniga (tavaliselt 10–20 mg C/l) uuritavat kemikaali teise reaktorisse. Kontrollseadmesse lisatakse jätkuvalt ainult orgaanilist kasvukeskkonda.

*Aklimatiseerumise ajavahemik*

41. Jätkake lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) analüüside tegemist kaks korda nädalas ja esmase biolagundatavuse hindamiseks mõõtke ka uuritava kemikaali kontsentratsiooni spetsiifilise analüüsimeetodi abil. Laske süsteemil pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist üks kuni kuus nädalat (või eritingimustes pikemalt) aklimatiseeruda. Kui kõrvaldamise protsent (punktid 43–45) jõuab maksimumväärtuseni, mõõtke keskmise kõrvaldamisprotsendi hindamiseks platoofaasist ligikaudu kolme nädala vältel 12–15 kehtivat väärtust. Katse loetakse lõpetatuks, kui jõutakse piisavalt suure kõrvaldamise määraneni. Pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist ei peaks katse kestus tavaliselt ületama 12 nädalat.

**▼M4***Kile irdumine*

42. Torust liigse kile suures koguses äkiline irdumine (*sloughing*) toimub suhteliselt korrapärase ajavahemiku järel. Selleks et kile irdumine ei mõjutaks tulemuste võrreldavust, peaks katse kestma vähemalt kaks täielikku kasvamis- ja irdumise tsüklit.

## ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

**Tulemuste töötlemine**

43. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent igal etteantud ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

kus

$D_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent ajal  $t$ ;

$C_s$  = uuritavast kemikaalst tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kontsentratsioon sissevoolus, mida hinnatakse eelistatavalt põhilahuse kontsentratsiooni ja selle lisatud koguse alusel (mg/l);

$E$  = katse väljavoolus ajal  $t$  mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l);

$E_o$  = kontrollseadme väljavoolus ajal  $t$  mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l).

Kui katsetatakse ka võrdluskemikaali, tehakse sama arvutus ka võrdluskemikaaliga.

**Kontrollreaktori tõhusus**

44. Kontrollreaktori poolt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr ( $D_B$ ) on kasulik teave, mis aitab hinnata katse ajal biokile biolagundamise aktiivsust. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m)\%$$

kus

$C_m$  = lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) kontrollseadme sissevoolu orgaanilises kasvukeskkonnas (mg/l).

45. Arvutage spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kõrvaldamine ( $D_{ST}$ ) (kui seda mõõdetakse) igal hindamisajal järgmise võrrandi abil:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i)\%$$

kus

$S_i$  = uuritava kemikaali mõõdetud või, eelistatavalt, hinnatud kontsentratsioon katse sissevoolus (mg/l);

$S_e$  = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavoolus ajal  $t$  (mg/l).

**▼ M4**

Kui analüüsimetod annab muutmata reovees positiivse näitaja ( $S_e$ , mg/l), siis arvutage kõrvaldamise protsent ( $D_{SC}$ ) järgmise võrrandi alusel:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\%$$

**Katsetulemuste esitamine**

46. Koostage kõrvaldamise protsendi  $D_t$  ja  $D_{ST}$  (või  $D_{SC}$ ) (kui see on leitud) graafiline sõltuvus ajast (vt peatüki C.10-A 2. liide). Võtke platoofaasis määratud 12–15  $D_T$  (ja  $D_{ST}$ , kui see on määratud) väärtustest uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi keskmine (väljendatud lähima täisarvuna) ja leidke standardhälve. Kõrvaldamise kõvera kujust saab teha järeldusi kõrvaldamises osalevate protsesside kohta.

**Adsorptsioon**

47. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse alguses, kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt biokilele adsorbeerimise teel. Seda võib olla võimalik tõendada irdunud kilest tahketele osakestele adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suuremahuliseks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suur kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritud uuritav kemikaal suudab aga põhjustada mikroobide populatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

**Ootefaas**

48. Nagu ka staatiliste sõelumiskatsete korral, nii vajavad mitmed uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagunemise toimumist ootefaasi. Ootefaasis toimub kompetentsete bakterite aklimatiseerumine (või kohanemine) ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks loetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

**Platoofaas**

49. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. See faas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 12–15 kehtivat näitajat.

**Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr**

50. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja  $D_t$  (ja  $D_{st}$ , kui see on leitud) väärtuste alusel keskväärts platoofaasis. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskväärtsuse 95 % usaldusvahemik. Arvutage samal viisil orgaanilise kasvukeskkonna keskmine kõrvaldamise määr ( $D_B$ ) kontrollnõus.

▼ **M4****Biolagundamise tunnused**

51. Kui uuritav kemikaal biokile külge märkimisväärselt ei adsorbeeru ja kõrvaldamise kõveral on ootefaasi, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamise kõvera tavapärane kuju (punktid 48, 49), võib olla kindel, et mõõdetud kõrvaldamine on põhjustatud biolagundamisest. Kui on toimunud suuremahuline esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavat kemikaali kile proovidel või teha täiendavad biolagundamise staatilised (sõelumis)katsed selgelt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F) (9) või katse, millega mõõdetakse CO<sub>2</sub> tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C või *Headspace*-meetod) (10), kasutades inokulumina asjaomase reaktori eelnevalt kokkupuutunud biokilet.
52. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene nimetatutest on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada ja neid tuleks uurida.

**Katsetulemuste kehtivus**

53. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr (D<sub>B</sub>) kontrollseadmetes on kahe nädala möödumisel > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.
54. Kui on katsetatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr olema > 90 % ja paralleelide erinevus ei tohiks olla suurem kui 5 %. Kui need kaks kriteeriumi ei ole täidetud, tuleb katse käik läbi vaadata ja/või hankida olmereovesi muust allikast.
55. Samuti ei tohiks uuritavat kemikaali töötlevate paralleelseadmete (kui neid kasutatakse) biolagundamise näitajate erinevus olla suurem kui 5 %. Kui see kriteerium ei ole täidetud, aga kõrvaldamise määr on suur, siis jätkake analüüsi veel kolme nädala vältel. Kui kõrvaldamise määr on väike, kontrollige uuritava kemikaali inhibeerivat mõju, kui see ei ole teada, ja korrake katset uuritava kemikaali väiksemal kontsentratsioonil, kui see on teostatav.

**Katseprotokoll**

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav kemikaal:*

- tunnused;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused.

*Katsetingimused:*

- katsesüsteemi mis tahes muudatused, eelkõige lahustumatute või lenduvate ainetega katsete tegemisel;
- orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;
- tööstuslike jäätmete osakaal reovees ja nende laad, kui neid kasutatakse ja need on teada;
- inokulatsioonimeetod;

▼ **M4**

- uuritava kemikaali põhilahus – lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamisviis; kasutatav(ad) katsekontsentratsioon(id), kui lahustunud orgaaniline süsinik jääb vahemikust 10–20 mg/l väljapoole, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; mis tahes muutused kontsentratsioonis;
- keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (ilma kasvuta); toru pöörlemiskiirus; ligikaudne kaldenurk, kui võimalik;
- andmed kile irdumise kohta; aeg ja intensiivsus;
- katsetemperatuur ja -vahemik;
- kasutatud analüüsimeetodid.

*Katsetulemused:*

- kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, N-kemikaalid (kui see on asjakohane);
- kõik arvatud  $D_t$  (või  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_s$  näitajad tabelite kujul ja kõrvaldamise kõverad;
- teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali, võrdluskemikaali (kui seda katses kasutati) ja orgaanilise kasvukeskkonna (kontrollseadmes) kõrvaldamise kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;
- tulemuste arutelu.

*KIRJANDUS*

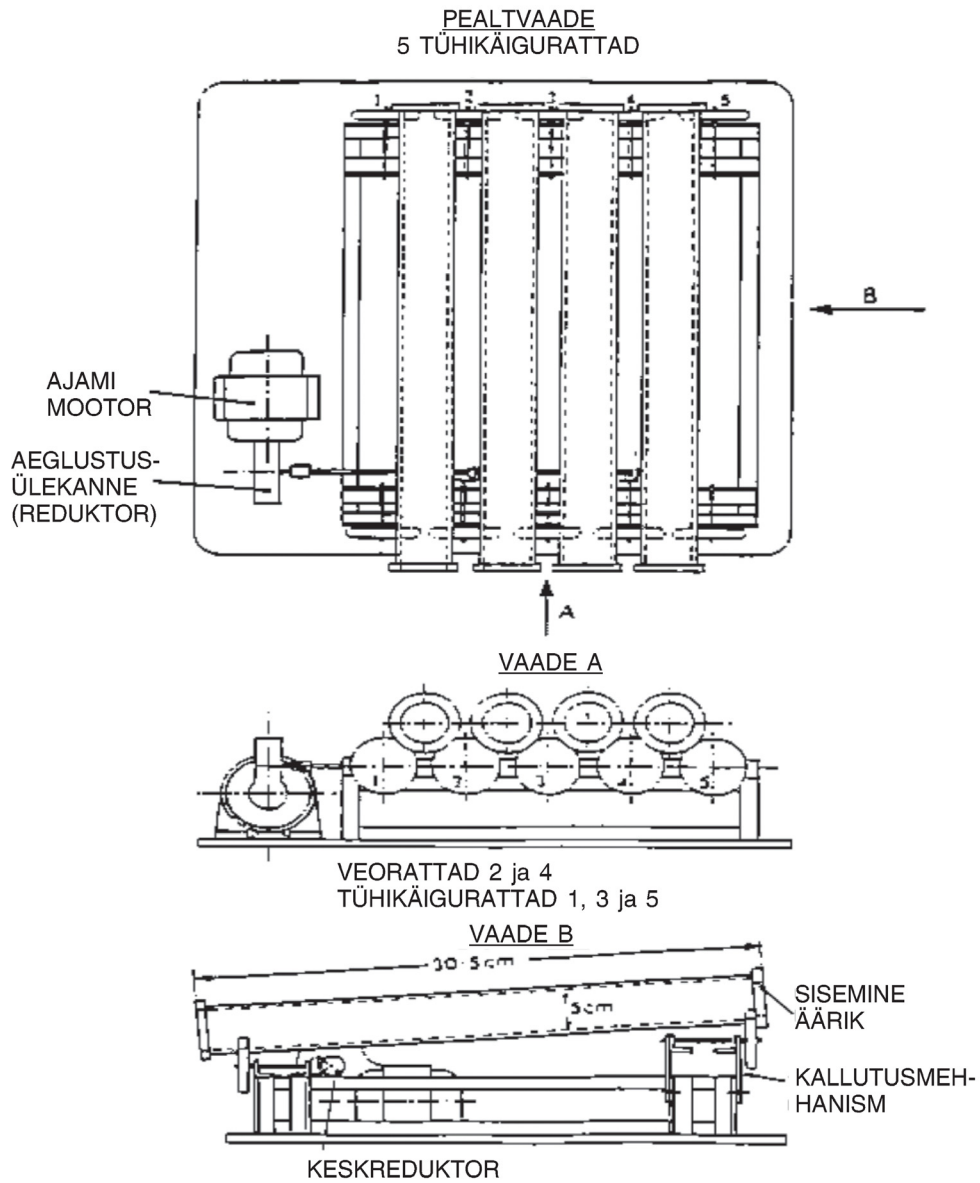
- 1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753–758.
- 2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441–444.
- 3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214–220.
- 4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- 5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92–94.
- 6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865–881.
- 7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- 8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- 9) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”, meetodid C.4-A kuni C.4-F.
- 10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼M4

8. liide

Joonis 1

## Pöörlevad torud



Sõnastik

Pealtvaade

Vaade A/B

Veorattad

Tühikäigurattad

Ajami mootor

Aeglustusülekanne (reduktor)

Sisemine äärik

Kallutusmehhanism

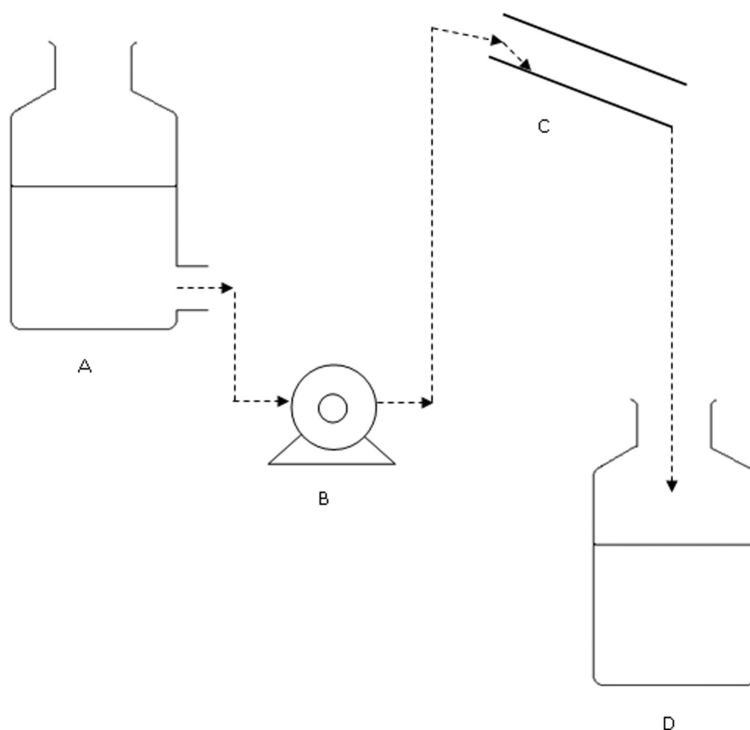
Keskreduktor



▼ M4

Joonis 2

## Vooskeem



- A. Söötenõu
- B. Peristaltiline pump
- C. Pöörlev toru
- D. Väljavoolu kogumise nõu

*MÕISTED*

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Kemikaalid: „tuleb silmas pidada, et mõistet „kemikaal“ kasutatakse ÜRO keskkonna- ja arengukonverentsi lepingutes ja edasistes dokumentides laia mõistena, mis hõlmab aineid, tooteid, segusid, valmistisi või mis tahes muid mõisteid, mida võib olemasolevates süsteemides hõlmatuse märkimiseks kasutada”.

▼ **M6****C.11. AKTIIVMUDA MIKROORGANISMIDE HINGAMISE (SÜSINIKU JA AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE) PÄRSSIMISE KATSE**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 209 (2010). Selle meetodiga tehakse kindlaks kemikaali mõju aktiivmuda organismidele (eelkõige bakterid), mõõtes nende hingamise (süsiniku ja/või ammooniumi oksüdeerimise) kiirust kindlaksmääratud tingimustes uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel. Katsemeetod põhineb Värvainetootjate Ökoloogia- ja Toksikoloogiaühingu (ETAD) metoodikal (1, 2), varasemal OECD katsejuhendil nr 209 (3) ja muudetud standardil ISO 8192 (4). Katse eesmärk on hinnata kiirsõelumismeetodi abil kemikaali mõju reoveepuhastites bioloogilises (aeroobses) etapis kasutatava aktiivmuda organismidele. Katse tulemusi võib kasutada ka uuritava kemikaali selliste kontsentratsioonide kindlakstegemiseks, mille puhul hingamine ei pärssu ja mis sobivad kasutamiseks biolagunduvuse katsetes (nt käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F, peatükid C.9, C.10, C.12 ja C.29 ning OECD katsejuhend nr 302C). Sel juhul võib katse läbi viia sõelkatse, mis sarnaneb kontsentratsioonivahemiku leidmise katse või piirsalduskatsega (vt punkt 39) ja milles vaadeldakse üksnes üldist hingamist. Kõnealusesse teabesse tuleks siiski suhtuda ettevaatlikult kohese biolagunduvuse katsete puhul (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F ja peatükk C.29), kus inokulumis sisaldus on oluliselt väiksem kui käesoleva katsemeetodi puhul. Seega ei tähenda pärssiva mõju puudumine käesoleva meetodi kohases hingamiskatses automaatselt seda, et pärssiv mõju puudub ka käesoleva lisa peatüki C.4 meetodite C.4-A kuni C.4-F ja peatüki C.29 kohaselt tehtava kohese biolagunduvuse katse tingimustes.
2. Näib, et hingamise pärssimise katset on pärast käesoleva meetodi avaldamist üldjuhul kasutatud edukalt, kuid mõnel juhul on teatatud kahtlastest tulemustest (2, 4, 5). Kontsentratsiooni ja hingamise vahelise sõltuvuse kõverad on mõnikord kahefaasilised, asjaomased graafikud on moonutatud ja EC<sub>50</sub> väärtused on eeldatust väiksemad (5). Uuringutest on selgunud, et sellised tulemused saadakse juhul, kui katses kasutatud aktiivmuda olulisel määral nitrifitseerib ja uuritava kemikaali mõju ammooniumi oksüdeerimisele on suurem kui üldisele heterotroofsele oksüdeerimisele. Seepärast võib selliste kahtlaste tulemuste tõlgendamiseks teha lisakatseid, kus kasutatakse spetsiifilist nitrifitseerimise inhibiitorit. Kui mõõta hapniku sidumise kiirust sellise inhibiitori, nt *N*-allüütiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel, on võimalik arvutada hapniku sidumise kiirus eraldi üldise hingamise, heterotroofse oksüdeerimise ja nitrifitseerimise puhul (4, 7, 8). Seega saab kindlaks teha uuritava kemikaali pärssiva mõju kahes kõnealusel protsessis ja arvutada tavapärasel viisil EC<sub>50</sub> väärtused nii orgaanilise süsiniku oksüdeerimise (heterotroofne oksüdeerimine) kui ka ammooniumi oksüdeerimise (nitrifitseerimine) puhul. Tuleks silmas pidada, et mõnel üksikul juhul võib *N*-allüütiokarbamiidi inhibeeriv toime osaliselt või täielikult kaduda uuritava kemikaaliga või söötmelisandite, nt Cu<sup>++</sup>-ioonidega kompleksi moodustamise tõttu (6). Cu<sup>++</sup>-ioonid on *Nitrosomonas*'e puhul vajalikud, kuid on suuremas kontsentratsioonis mürgised.
3. On tekkinud tungiv vajadus kasutada reovee aeroobsel töötlemisel nitrifitseerimist, mis on vajalik etapp reoveest lämmastikuühendite kõrvaldamisel denitrifitseerimise teel gaasiliste lõppsaadustena; see vajadus ilmneb eelkõige Euroopa riikides, kuna EL on praeguseks kehtestanud veekogudesse juhitava puhastatud heitvee lämmastikusisalduse väiksemad piirmäärad<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Nõukogu direktiiv 91/271/EMÜ, 21. mai 1991, asulareovee puhastamise kohta (ELT L 135, 30.5.1991, lk 40).

▼ **M6**

4. Enamikul juhtudel piisab meetodist, millega saab hinnata kemikaali mõju üksnes orgaanilise süsiniku oksüdeerimise protsessidele. Mõnel juhul on tulemuste tõlgendamiseks ja toime mõistmiseks siiski vaja uurida kemikaali mõju üksnes nitrifitseerimisele või eraldi nii nitrifitseerimisele kui ka orgaanilise süsiniku oksüdeerimisele.

## KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

5. Hingamise kiirust kunstliku reoveega kokku puutuvates aktiivmuda proovides mõõdetakse hapnikuelektroodi sisaldavas suletud kambris kolme tunni pikkuse kokkupuuteaja järel. Tegelikus olukorras esinevaid kokkupuutetingimusi arvesse võttes võib olla asjakohane kokkupuuteaega pikendada. Kui uuritav kemikaal laguneb kiiresti, näiteks abiootilise hüdrolyüüsi teel, või kui selle kontsentratsiooni nõuetekohane hoidmine ei ole kemikaali lenduvuse tõttu võimalik, võib lisaks kasutada lühemat kokkupuuteaega – nt 30 minutit. Aktiivmuda iga partii tundlikkust tuleks kokkupuute päeval kontrollida sobiva võrdluskemikaaliga. Meetodit kasutatakse tavaliselt uuritava kemikaali  $EC_x$  (nt  $EC_{50}$ ) ja/või täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) määramiseks.
6. Orgaanilist süsinikku oksüdeerivate mikroorganismide ja ammooniumi oksüdeerivate mikroorganismide hapnikusidumise pärssimist võib väljendada eraldi, kui mõõta hapniku sidumise kiirust spetsiifilise inhibiitori *N*-allüül-tiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel; nimetatud inhibiitor pärsib ammooniumi oksüdeerimist nitritiks esimese etapi nitrifitseerivate bakterite toimel. Sellisel juhul arvutatakse hapniku sidumise kiiruse vähenemise määr protsentides, võrreldes hapniku sidumise kiirust uuritava kemikaali juuresolekul sama näitaja keskväertusega vastavates uuritava kemikaalita kontrollproovides nii spetsiifilise inhibiitori *N*-allüül-tiokarbamiidi juuresolekul kui ka selle puudumisel.
7. Abiootilistest protsessidest tuleneva hapniku sidumise määramiseks võib teha kindlaks kõnealuse näitaja väärtuse uuritava kemikaali, kunstliku reovee ja vee segudes, mis ei sisalda aktiivmuda.

## TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Tulemuste õigeks tõlgendamiseks on vaja teada uuritava kemikaali identifitseerimisandmeid (soovitavalt CASi number), nimetust (IUPAC), puhtust, vees lahustuvust, aururõhku, lenduvust ja adsorbeerumisega seotud omadusi. Tavaliselt ei ole lenduvaid kemikaale võimalik nõuetekohaselt katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt punkt 21).

## KATSEMEETODI KASUTATAVUS

9. Katsemeetodit võib kasutada vees lahustuvate, raskesti lahustuvate ja lenduvate kemikaalide puhul. Alati ei pruugi siiski olla võimalik määrata piiratud lahustuvusega kemikaalide  $EC_{50}$  väärtusi ning lenduvate kemikaalide puhul saadakse nõuetekohased tulemused üksnes juhul, kui suurem osa uuritavast kemikaalidest (hinnanguliselt > 80 %) jääb kokkupuuteperioodi(de) lõpuks reaktsioonisegusse. Kui uuritava kemikaali püsivuse või lenduvuse suhtes on kahtlusi, tuleks  $EC_x$  väärtuse täpsustamise võimaldamiseks esitada täiendavad toetavad analüüsandmed.

▼ **M6****VÖRDLUSKEMIKAALID**

10. Võrdluskemikaalidega kontrollimist tuleks teha korrapäraselt, et tagada katsemetodi ja katsetingimuste usaldusväärsus ning kontrollida aktiivmuda iga partiid, mida kasutatakse kokkupuute päeval mikroobide inokulumina. Pärssiva võrdluskemikaalina soovitatakse kasutada 3,5-diklorofenooli, mis on tuntud hingamise pärssija ja mida kasutatakse paljudes pärssiva mõju või mürgisuse tuvastamise katsetes (4). Samuti võib üldist hingamist pärssiva võrdluskemikaalina kasutada vask(II)sulfaatpentahüdraati (9). Nitriifitseerimist pärssiva võrdluskemikaalina võib kasutada *N*-metüülaniliini.

**NÕUETEKOHASUSE KRITERIUMID JA REPRODUTSEERITAVUS**

11. Hapniku sidumise kiirus kontrollproovides (ilma uuritava kemikaali või võrdluskemikaalita) ei tohiks olla väiksem kui 20 mg hapnikku aktiivmuda (hõljuvaine kuivmassi) grammi kohta tunnis. Väiksema kiiruse korral tuleks katset korrata pestud aktiivmuda või muust allikast pärit mudaga. Paralleelsetes kontrollproovides mõõdetud hapniku sidumise kiiruse variatsioonikordaja ei tohiks lõpliku katse lõpus olla suurem kui 30 %.
12. Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (ISO) korraldatud 2004. aasta rahvusvahelises võrdlusuuringus (4), kus kasutati olmereoveest pärit aktiivmuda, leiti 3,5-diklorofenooli EC<sub>50</sub> jäävat üldise hingamise puhul vahemikku 2–25 mg/l, heterotroofse hingamise puhul vahemikku 5–40 mg/l ja nitriifitseerimist põhjustava hingamise puhul vahemikku 0,1–10 mg/l. Kui 3,5-diklorofenooli EC<sub>50</sub> ei ole asjaomases eeldatavas vahemikus, tuleks katset korrata muust allikast pärit aktiivmudaga. Vask(II)sulfaatpentahüdraadi EC<sub>50</sub> peaks üldise hingamise puhul jääma vahemikku 53–155 mg/l (9).

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Katsenõud ja seadmed**

13. Lisaks tavapärastele laboriseadmetele tuleks kasutada järgmist:
- katsenõud, näiteks keeduklaasid mahuga 1 000 ml, kuhu saab lisada 500 ml reaktsioonisegu (vt joonis 1, nr 5);
  - ühendustega kamber lahustunud hapniku sisalduse mõõtmiseks; sobiv hapnikuelektrood; suletud kamber proovi jaoks ilma vabaruumita ning salvestusseade (vt 2. liites joonis 1, nr 7, 8 ja 9); alternatiivina võib kasutada BHT pudelit, millel on hapnikuelektroodi kasutamist võimaldav sobiv kork pudelisuu õhukindlaks sulgemiseks (vt 3. liites joonis 2). Et hoida ära väljasurutava vedeliku kadu hapnikuelektroodi sisestamisel, on soovitatav sisestada läbi korgi esmalt lehter või klaastoru või kasutada väljakaarduva suuga nõusid. Mõlemal juhul tuleks kasutada magnetsegistit või mõnda muud segamismeetodit, nt segistiga andurit;
  - magnetsegistid ja inertse materjaliga kaetud segamispulgad mõõtekambris ja/või katsenõudes kasutamiseks;
  - aereerimisseade: vajaduse korral tuleks suruõhk juhtida tolmu ja õli kõrvaldamiseks läbi sobiva filtri ja õhu niisutamiseks läbi vett sisaldavate pesupudelite. Nõude sisu aereerimiseks tuleks kasutada Pasteuri pipette

**▼ M6**

või muid aereerimisseadmeid, mis ei adsorbeeri kemikaale. Muda hapnikutarbe rahuldamiseks ja raskuste vältimiseks töötamisel selliste kemikaalidega, mis tekitavad palju vahtu, kaovad oma lenduvuse tõttu või on õhu barboteerimisel põhineva aereerimise puhul raskesti hajutatavad, võib kasutada orbitaalloksutit, mis töötab pöörlemiskiirusel 150–250 p/min ja võimaldab kasutada kolbe mahuga näiteks 2 000 ml. Katsesüsteem hõlmab tavaliselt mitut pidevalt aereeritavat keeduklaasi, millega alustatakse katset järgemööda (nt intervalliga umbes 10–15 minutit) ja mida seejärel järgemööda analüüsitakse. Võib kasutada ka valideeritud seadmeid, mis võimaldavad üheaegselt segusid aereerida ja neis hapnikutarbimise kiirust mõõta;

e) pH-meeter;

f) üldotstarbeline lauatsentrifuug muda jaoks, kiirendusega vähemalt 10 000 m/s<sup>2</sup>.

**Reaktiivid**

14. Katses tuleks kõikjal kasutada analüütilise puhtusastmega reaktiive.

**Vesi**

15. Tuleks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, mis sisaldab vähem kui 1mg/l lahustunud hapnikku, välja arvatud juhul, kui on ette nähtud kasutada kloorivaba kraanivett.

**Kunstlik reovesi**

16. Söötme valmistamiseks tuleks kasutada koostisainete järgmisi koguseid:

— peptoon	16 g;
— lihaekstrakt (või sellega võrreldav köögiviljaekstrakt)	11 g;
— karbamiid	3 g;
— naatriumkloriid (NaCl)	0,7 g;
— kaltsiumkloriidihüdraat (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0,4 g;
— magneesiumsulfaatheptahüdraat (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0,2 g;
— veevaba dikaaliumvesinikfosfaat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,8 g;
— lahuse ruumala viiakse destilleeritud või deioniseeritud veega 1 liitrini.	

17. Lahuse pH peaks olema 7,5 ± 0,5. Kui valmistatud lahust ei kasutata kohe, tuleks seda säilitada valguse eest kaitstult temperatuuril 0–4 °C mitte kauem kui üks nädal või tingimustes, mille juures lahuse koostis ei muutu. Tuleks silmas pidada, et kõnealune kunstlik reovesi on 100 korda kontsentreeritum kui reovesi, mida kirjeldatakse OECD 11. juuni 1976. aasta tehnilises aruandes „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents” („Kavandatav meetod sünteetilistes detergentides kasutatavate pindaktiivsete ainete biolagunduvuse määramiseks”), ning peale selle on sinna lisatud dikaaliumvesinikfosfaati.

**▼ M6**

18. Söötmelise koostisained võivad enne säilitamist ka eraldi steriliseerida, samuti võivad peptooni ja lihaekstrakti lisada vahetult enne katse algust. Söödet tuleks enne kasutamist korralikult segada ja vajaduse korral tuleks pH reguleerida tasemele  $7,5 \pm 0,5$ .

**Uuritav kemikaal**

19. Vees hästi lahustuva uuritava aine sisaldus põhilahuses ei tohiks ületada aine vees lahustuvuse piirkontsentratsiooni (sademe esinemine ei ole vastuvõetav). Vees raskesti lahustuv aine, adsorbeeruv aine ja selline segu, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, tuleks vajalik kogus kaaluda otse katsenõusse. Sellises olukorras võib olla võimalik kasutada põhilahuseid, kui lahustunud uuritava kemikaali sisaldus katsenõus määratakse analüüsi teel enne aktiivmuda lisamist. Lahustunud uuritava kemikaali sisalduse analüütiline määramine katsenõus on vajalik ka juhul, kui valmistatakse vesiekstraktid. Tuleks hoiduda orgaaniliste lahustite ja disperseerivate ainete või emulgaatorite kasutamisest lahustuvuse suurendamiseks. Põhilahuste töötlemine ultraheliga ja suspensioonide eelsegamine näiteks õõ läbi on võimalik juhul, kui on olemas piisav teave uuritava kemikaali püsivuse kohta sellistes tingimustes.
20. Uuritav kemikaal võib mõjutada pH-d katsesüsteemis. pH tuleks enne katse alustamist määrata uuritavat kemikaali sisaldavas segus eelkatse abil, millega tehakse kindlaks, kas pH-d on vaja enne põhikatset reguleerida, ning põhikatset päeval tuleks pH-d uuesti kontrollida. Vajaduse korral tuleks uuritava kemikaali lahused/suspensioonid enne inokulumi lisamist neutraliseerida. Kuna neutraliseerimine võib aga muuta kemikaali keemilisi omadusi, võib olenevalt uuringu eesmärgist teha lisakatset, et hinnata uuritava kemikaali mõju mudale olukorras, kus pH-d ei reguleerita.
21. Lenduva kemikaali mürgine mõju võib kemikaali kao tõttu kokkupuuteperioodi vältel muutuda, eriti katsetes, kus läbi süsteemi barboteeritakse õhku. Sellise aine puhul tuleks olla ettevaatlik ja analüüsida asjaomast ainet sisaldavaid kontrollseguid aine sisalduse suhtes ning muuta aereerimistingimusi.

**Võrdluskemikaal**

22. Kui võrdluskemikaalina kasutatakse 3,5-diklorofenooli, tuleks valmistada 1 000 ml vesilahust, mis sisaldab 1,00 g 3,5-diklorofenooli (15). Lahustumise kiirendamiseks tuleks kasutada sooja vett ja/või ultraheliga töötlemist ning lasta lahusel enne selle ruumala vajalikule tasemele viimist toatemperatuurini jahtuda. Seejuures tuleks tagada, et võrdluskemikaali struktuur lahustamise käigus ei muutu. Lahuse pH-d tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida see NaOH või H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abil tasemele 7–8.
23. Kui võrdluskemikaalina kasutatakse vask(II)sulfaatpentahüdraati, kasutatakse kontsentratsioone 58 mg/l, 100 mg/l ja 180 mg/l (jada tegur 1,8). Aine kaalutud kogus (lõppruumala 500 ml puhul 29, 50 või 90 mg) lisatakse otse katsenõusse. Seejärel lahustatakse see 234 ml autoklaavitud kraanivees. Vask(II)sulfaatpentahüdraat on hästi lahustuv. Katse alustamisel lisatakse 16 ml kunstlikku reovett ja 250 ml aktiivmuda.

▼ **M6****Nitritseerimist spetsiifiliselt pärssiv aine**

24. Tuleks valmistada *N*-allüütiokarbamiidi põhilahus kontsentratsiooniga 2,32 g/l. Selle põhilahuse lisamisel koguses 2,5 ml inkubeerimissegusse lõppruumalaga 500 ml saadakse *N*-allüütiokarbamiidi lõppsisalduseks 11,6 mg/l ( $10^{-4}$  mol/l); see on olemasolevate andmete kohaselt piisav (4), et täielikult pärssida nitritseerimine nitritseerivas aktiivmudas, mille hõljuvaine sisaldus on 1,5 g/l.

**Abiootilised kontrollproovid**

25. Teatud harvaesinevates tingimustes võib tugeva redutseerija omadustega uuritav kemikaal tekitada mõõdetava abiootilise hapnikutarbimise. Sellisel juhul on vaja kasutada abiootilisi kontrollproove, et eristada uuritava kemikaali abiootilist hapnikusidumist mikroobide hingamisest. Abiootilised kontrollproovid võib valmistada nii, et katsesegust jäetakse välja inokulum. Inokulumita abiootilisi kontrollproove võib kasutada ka toetavate analüütiliste mõõtmiste tegemisel, et määrata katse kokkupuuteetapis saavutatav kontsentratsioon, näiteks kui kasutatakse vees raskesti lahustuvate kemikaalide põhilahuseid ja asjaomaste koostisainete lahustuvus vees on erinev. Erijuhul võib olla vajalik kasutada abiootilise kontrollproovi valmistamisel inokulumi, mis on steriliseeritud näiteks autoklaavimise teel või steriliseerivate mürkainetega. Mõni kemikaal võib vabastada või siduda hapnikku ka üksnes piisavalt suure reaktsioonipinna korral, ehkki tavaliselt võib selleks olla vaja palju kõrgemat temperatuuri või rõhku. Seda silmas pidades tuleks pöörata erilist tähelepanu peroksiühenditele. Steriliseeritud inokulumi puhul on tegemist suure reaktsioonipinnaga.

**Inokulum**

26. Üldotstarbel kasutatavat aktiivmuda tuleks koguda tõhusalt käitatava, peamiselt olmereovett töötleva reoveepuhasti aereerimisbasseini väljalaskekohast või selle koha lähedalt. Olenevalt katse eesmärgist võib kasutada ka muud tüüpi või muust allikast pärit sobivat aktiivmuda, näiteks laboris kasvatatud muda, kui selle hõljuvaine sisaldus viiakse sobivasse kontsentratsioonivaheks 2–4 g/l. Eri puhastitest pärit mudal on tõenäoliselt siiski erinevad omadused ja tundlikkus.
27. Muda võib kasutada sellisel kujul, nagu see on kogutud, kuid sellel tuleks suurte osakeste kõrvaldamiseks lasta lühikest aega, näiteks 5–15 minutit settida ja väiksemaid osakesi sisaldav ülemine kiht dekanteerida või kõrvaldada suured osakesed sõelumise teel (nt sõelaga, mille ava pindala on  $1 \text{ mm}^2$ ). Teise võimalusena võib muda homogeniseerida segisti abil umbes 15 sekundi vältel või kauem, kuid tuleb hoolikalt jälgida, et ei esineks kauakestva homogeniseerimise puhul tekkida võivaid nihkejõude ega temperatuurimuutust.
28. Sageli on vaja muda pesta, näiteks kui endogeenne hingamiskiirus on väike. Esmalt tuleks muda niikaua tsentrifugida, kuni supernatant selgineb ja reovee tahked osakesed sademesse kogunevad, näiteks 10 minutit kiirendusel umbes  $10\,000 \text{ m/s}^2$ . Vedel supernatant tuleks eemaldada ja muda tuleks kloorivabas kraanivees uuesti suspendeerida loksutamise teel ning seejärel tuleks pesuvesi pärast uuesti tsentrifugimist eemaldada. Vajaduse korral tuleks pesemist ja tsentrifugimist korrata. Tuleks määrata taassuspendeeritud muda kuivmass teadaolevas ruumalas ning seejärel tuleks muda vedeliku eemaldamise teel kontsentreerida või kloorivaba kraaniveega veelgi lahjendada, et saavutada muda tahkete osakeste nõutav kontsentratsioon 3 g/l. Aktiivmuda tuleks katsetemperatuuril pidevalt aereerida (nt kiirusel 2

**▼ M6**

l/min) ja võimaluse korral tuleks see kogumise päeval ära kasutada. Kui see ei ole võimalik, tuleks mudale kahe järgneva päeva jooksul lisada kummalgi päeval kunstlikku reovett (50 ml kunstlikku reovett aktiivmuda liitri kohta). Seejärel kasutatakse muda katses ja katsetulemused loetakse nõuetekohaseks, kui hindamistulemustest selgub, et endogeense heterotroofse ja nitritifitseerimist põhjustava hingamise kiirus mudas ei ole oluliselt muutunud.

29. Inkubeerimisel võib tekitada probleeme vahutamine, kui vahu pinnal olevad tahked mudaosakesed aereerimisnõust koos vahuga välja kantakse. Mõnikord võib vahutamist põhjustada ka lihtsalt kunstliku reovee juuresolek, kuid vahutamine on ootuspärane sellise kemikaali puhul, mis on pindaktiivne aine või sisaldab sellist ainet. Muda tahkete osakeste kadu katsesegust toob kaasa hingamiskiiruse kunstliku vähenemise, mida võidakse ekslikult tõlgendada hingamise pärssimise tulemusena. Peale selle kaasneb pindaktiivse aine lahuse aereerimisega aine kontsentreerumine vahukihti ning vahu kadu katsesüsteemist põhjustab kokkupuutekontsentratsiooni vähenemist. Vahutamist on võimalik vähendada lihtsate mehaaniliste võtetega (nt aeg-ajalt käsitsi klaaspulgaga segades) või sellise vahutamistavastase silikoonemulsiooni lisamisega, mis ei sisalda pindaktiivset ainet, ja/või loksutamisel põhineva aereerimismeetodi kasutamisega. Kui vahutamine on seotud kunstliku reovee juuresolekuga, tuleks reovee koostist muuta ja lisada sellesse vahutamistavastast ainet näiteks koguses 50 µl reovee liitri kohta. Kui vahutamist põhjustab uuritav kemikaal, tuleks määrata vahutamise vähendamiseks vajalik kogus kemikaali suurimal katses kasutataval kontsentratsioonil ning lisada sama kogus igasse aereerimisnõusse, sealhulgas nõudesse, kus vahutamist ei esine (nt uuritava kemikaalita kontrollnõud ja võrdluskemikaaliga nõud). Vahutamistavastase aine kasutamisel ei tohiks see aine reageerida inokulumi ega uuritava kemikaaliga.

**KATSE KÄIK**

30. Võib teha kindlaks kemikaali pärssiva mõju hapniku sidumisele kolmel eri viisil: üldisele, üksnes heterotroofsele ja nitritifitseerimisega seotud sidumisele. Tavaliselt piisab üldist hapnikusidumist pärssiva mõju kindlakstegemisest. Orgaanilise süsiniku oksüdeerimisega seotud heterotroofse hapnikusidumise ja ammoniumi oksüdeerimisega seotud hapnikusidumise mõju on vaja määrata juhul, kui asjaomase kemikaali puhul on nõutav kahe nimetatud näitaja eraldi kindlakstegemine või kui soovitakse selgitada, miks üldise hapnikusidumise pärssumise ja kemikaali kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse kõver on ebatüüpilise kujuga.

**Katsetingimused**

31. Katse tuleks teha temperatuuril  $20 \pm 2$  °C.

**Katsesegud**

32. Tuleks valmistada vett, kunstlikku reovett ja uuritavat kemikaali sisaldavad katsesegud ( $F_T$ ), milles uuritava kemikaali nominaalne sisaldus on erinev (vt koostisainete koguste näited tabelis 1). pH tuleks vajaduse korral reguleerida tasemele  $7,5 \pm 0,5$ , segusid tuleks veega lahjendada ja lisada inokulum, et saada nõudes võrdse lõppruumalaga lahused, ning seejärel alustada aereerimist.

**Võrdlussegud**

33. Võrdlussegud ( $F_R$ ) tuleks valmistada samal viisil kui katsesegud, lisades uuritava kemikaali asemel võrdluskemikaali, nt 3,5-diklorofenooli.



**▼ M6****Kemikaalita kontrollproovid**

34. Katsetes, kus katsenõudega alustatakse katset järgemööda teatava intervalliga, tuleks kemikaalita kontrollproovid ( $F_B$ ) valmistada kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus. Katsetes, kus kasutatakse hapnikutarbimise üheaegset mõõtmist võimaldavaid seadmeid, tuleks iga üheaegselt analüüsitava partii puhul kasutada vähemalt kahte kemikaalita kontrollproovi. Kemikaalita kontrollproovid sisaldavad muude segudega samas koguses aktiivmuda ja kunstlikku reovett, kuid ei sisalda uuritavat ega võrdluskemikaali. Proovid tuleks lahjendada veega sama ruumalani kui katse- ja võrdlussegud.

**Abiootilised kontrollproovid**

35. Vajaduse korral, näiteks kui on teada või kahtlustatakse, et uuritav kemikaal on tugeva redutseerija omadustega, tuleks abiootilise hapnikutarbimise mõõtmiseks valmistada segu  $F_A$ . See segu peaks sisaldama katsesebuga samas koguses uuritavat kemikaali ja kunstlikku reovett ning olema sama ruumalaga, kuid mitte sisaldama aktiivmuda.

**Katse üldine käik ja mõõtmised**

36. Katse- ja võrdlussegusid ning kemikaalita ja abiootilisi kontrollproove inkubeeritakse katsetemperatuuril sondaereerimise tingimustes (0,5–1 l/min), et hoida lahustunud hapniku sisaldust tasemel, mis vastab vähemalt 60–70 protsendile küllastuskontsentratsioonist, ja tagada mudahelveste püsimine suspensioonis. Mudahelveste suspensioonis hoidmiseks on vaja kultuure ka segada. Inkubeerimise algushetkeks loetakse hetke, mil aktiivmuda inokulum puutub esmakordselt kokku lõppsegu muude koostisainetega. Inkubeerimise lõppedes – tavaliselt on ettenähtud kokkupuuteaeg kolm tundi – võetakse lahustest proovid, et mõõta lahustunud hapniku sisalduse vähenemist selleks otstarbeks ette nähtud kambris (3. liide, joonis 2) või täielikult täidetud BHT pudelis. Inkubeerimise alustamise viis sõltub ka hapnikutarbimise kiiruse mõõtmiseks kasutatava seadme läbilaskevõimest. Kui kasutatakse näiteks ühte hapnikuandurit, tehakse mõõtmised üksteise järel. Sellisel juhul tuleks valmistada erinevad katseks vajalikud kunstliku reoveega segud, kuid jätta välja inokulum; vajalik kogus muda tuleks lisada igasse katseseeria nõusse eraldi. Seejärel tuleks alustada üksikhaaval inkubeerimist sobiva intervalliga, näiteks iga 10–15 minuti järel. Teisel juhul võib mõõtesüsteem koosneda mitmest andurist, mis võimaldavad teha üheaegselt mitu mõõtmist; sel juhul võib lisada inokulumi asjaomaste rühmade nõudesse üheaegselt.
37. Aktiivmuda hõljuvaine nominaalne sisaldus kõigis katse- ja võrdlussegudes ning kemikaalita segudes (kuid mitte abiootilistes kontrollsegudes) on 1,5 g/l. Hapnikutarbimist tuleks mõõta kolme tunni pikkuse kokkupuuteperioodi järel. Vajaduse korral tuleks mõõtmised teha lisaks ka 30 minuti pikkuse kokkupuuteperioodi järel, nagu on kirjeldatud eespool punktis 5.

**Muda nitrifitseerimisvõime**

38. Et kindlaks teha, kas ja millise kiirusega on muda võimeline nitrifitseerima, tuleks valmistada kemikaalita kontrollsegud ( $F_B$ ) ja täiendada kontrollsegud ( $F_N$ ), mis sisaldavad lisaks *N*-allüülütkarbamiidi kontsentratsioon 11,6 mg/l.

▼ **M6**

Segusid tuleks aereerida ja inkubeerida temperatuuril  $20 \pm 2$  °C kolm tundi. Seejärel tuleks mõõta hapniku sidumise kiirus ja arvutada nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiirus.

**Katsete kavandamine***Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse*

39. Vajaduse korral tehakse eelkatse, et leida uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemik, mida saaks kasutada lõplikus katses hapnikutarbimist pärssiva mõju kindlakstegemiseks. Kui uuritav kemikaal ei pärsi eelkatses hapnikutarbimist, võib see tähendada, et lõpliku katse tegemine ei ole vajalik, kuid sel juhul peaks eelkatse hõlmama suurima kasutatud kontsentratsiooni puhul (tavaliselt 1 000 mg/l, kuid see oleneb andmenõuetest) kolme paralleelproovi.

Tabel 1.

**Eelkatses kasutatavate segude näited.**

Reaktiiv	Algkontsentratsioon				
Uuritava kemikaali põhilahus	10 g/l				
Kunstliku söötme põhilahus	Vt punkt 16				
Aktiivmuda põhispensioon	Hõljuvaine sisaldus 3 g/l				
Segude koostisained	Katsenõudesse lisatavad kogused <sup>(*)</sup>				
	F <sub>T1</sub>	F <sub>T2</sub>	F <sub>T3-5</sub>	F <sub>B1-2</sub>	F <sub>A</sub>
Uuritava kemikaali põhilahus (ml) (punktid 19–21)	0,5	5	50	0	50
Kunstliku reovee põhilahus (ml) (punkt 16)	16	16	16	16	16
Aktiivmuda suspensioon (ml) (punktid 26–29)	250	250	250	250	0
Vesi (punkt 15)	233,5	229	184	234	434
Segude lõppruumala	500	500	500	500	500
Kontsentratsioonid segudes					
Uuritav suspensioon (mg/l) Aktiivmuda	10	100	1 000	0	1 000
(hõljuvaine) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

<sup>(\*)</sup> Võrdluskemikaali puhul tuleks toimida samamoodi, et valmistada lahused nõudesse F<sub>R1-3</sub>.

40. Katses kasutatakse uuritavat kemikaali vähemalt kolmes kontsentratsioonis, näiteks 10, 100 ja 1 000 mg/l, samuti kemikaalita kontrollproove ja vajaduse korral ka vähemalt kolme abiootilist kontrollproovi, mis sisaldavad uuritavat kemikaali suurimas kasutatavas kontsentratsioonis (vt näide tabelis 1). Eelitatavalt ei tohiks kemikaal avaldada väikseimal kontsentratsioonil mingit

▼ **M6**

mõju hapnikutarbimisele. Tuleks arvutada hapniku sidumise ja vajaduse korral ka nitrifitseerimise kiirus ning seejärel pärssumise määr protsentides. Olenevalt katse eesmärgist on võimalik määrata ka üksnes mürgisus piirkontsentratsioonil (nt 1 000 mg/l). Kui sel kontsentratsioonil ei täheldata statistiliselt olulist mürgist mõju, ei ole edasine testimine suuremal ega väiksemal kontsentratsioonil vajalik. Tuleks silmas pidada, et vees raskesti lahustuva aine, adsorbeeruva aine ja sellise segu puhul, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, tuleks vajalik kogus kaaluda otse katse nõusse. Sellisel juhul tuleks lisada uuritava aine põhilahuse jaoks jäetud ruumala ulatuses lahendusvett.

*Lõplik katse*

## Üldise hapnikusidumise pärssumine

41. Katses tuleks kasutada eelkatse põhjal kindlaks määratud kontsentratsiooni vahemikku. Et leida nii NOEC kui ka  $EC_x$  (nt  $EC_{50}$ ), on enamikul juhtudel soovitatav kasutada kuut kontrollproovi ning viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, sealjuures iga kontsentratsiooni puhul viit paralleelproovi. Kui eelkatses ei tuvastatud hapniku sidumist, ei ole abiootilist kontrollproovi vaja uuesti kasutada, kuid hapniku märkimisväärse sidumise korral tuleks kasutada abiootilisi kontrollproove uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil. Muda tundlikkuse kontrollimiseks tuleks kasutada võrdluskemikaali 3,5-diklorofenooli. Kuna on teada, et muda tundlikkus on muutuv, tuleks kontrollida tundlikkust iga katseseria puhul. Kõikidel juhtudel võetakse katsenõudest 3 tunni pärast ja vajaduse korral ka 30 minuti pärast proovid, et mõõta hapniku sidumise kiirust hapnikuelektroodiga kambri. Kogutud andmete põhjal arvutatakse hingamise erikiirus kontroll- ja katsesegudes ning seejärel leitakse allpool esitatud võrrandi 7 abil pärssumise määr protsentides.

## Heterotroofsele hingamisele ja nitrifitseerimisele avalduva pärssiva mõju eristamine

42. Spetsiifiliselt nitrifitseerimist pärssiva inhibiitori *N*-allüülitiokarbamiidi kasutamine võimaldab vahetult hinnata uuritava kemikaali pärssivat mõju heterotroofsele oksüdeerimisele ning kui lahutada üldise hapnikusidumise kiirusest (*N*-allüülitiokarbamiidi puudumisel) hapnikusidumise kiirus *N*-allüülitiokarbamiidi juuresolekul, saab kindlaks teha ka mõju nitrifitseerimise kiirusele. Vastavalt katseplaanile tuleks valmistada kaks rühma reaktsioonisegusid, et määrata kooskõlas punktis 41 kirjeldatuga  $EC_x$  või NOEC, kuid lisaks tuleks ühe rühma igasse segusse lisada *N*-allüülitiokarbamiidi, et saavutada inhibiitori lõppkontsentratsioon 11,6 mg/l, mille puhul on tõendatud nitrifitseerimise täielik pärssumine mudas, mille hõljuvaine sisaldus on kuni 3 000 mg/l (4). Hapniku sidumise kiirust tuleks mõõta kokkupuuteperioodi lõpus; see vahetult mõõdetav väärtus iseloomustab üksnes heterotroofset hingamist ning selle näitaja ja üldise hingamise kiiruse erinevus väljendab nitrifitseerimise kiirust. Seejärel arvutatakse pärssumise määrad.

**Mõõtmised**

43. Pärast kokkupuuteperioodi lõppu tuleks esimesest aereerimisnõust võetud proov viia hapnikuelektroodiga kambri (2. liide, joonis 1) ja viivitamata mõõta lahustunud hapniku sisaldus proovis. Kui mõõtesüsteem on mitme elektroodiga, võib mõõtmisi teha üheaegselt. On oluline segada proovi kaetud magneti abil samal kiirusel, mida kasutatakse elektroodi kalibrimiseks, et tagada anduri reageerimine muutuvale hapnikusisaldusele minimaalse viivitusega ja võimaldada teha mõõtenõus korrapäraseid ja reprodutseeritavaid mõõtmisi. Mõnele hapnikuelektroodile lisatud segistisüsteem on

**▼M6**

tavaliselt selleks piisav. Kambrit tuleks mõõtmiste vahel veega loputada. Teise võimalusena võib võetud prooviga täita BHT pudeli (3. liide, joonis 2), mis on varustatud magnetsegistiga. Seejärel tuleks paigaldada pudeli-suule koonusüleminek hapnikuanduriga ning panna magnetsegisti tööle. Mõlemal juhul tuleks pidevalt mõõta lahustunud hapniku sisaldust ja salvestada andmeid teatava perioodi vältel, tavaliselt 5–10 minuti jooksul või kuni hapnikusisaldus langeb alla 2 mg/l. Elektrood tuleks eemaldada, sega tuleks viia tagasi aereerimisnõusse ning aereerimist ja segamist tuleks jätkata, kui on vaja teha veel mõõtmisi pikema kokkupuuteperioodi järele.

**Uuritava kemikaali sisalduse kontrollimine**

44. Mõnel juhul võib olla vaja mõõta uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus. Tuleks silmas pidada, et kui kasutatakse:

— vees raskesti lahustuva aine põhilahust,

— sellise segu põhilahust, mille koostisained on erineva vees lahustuvusega, või

— vees hästi lahustuva aine põhilahust, milles aine sisaldus on lähedal vees lahustuvuse piirkontsentratsioonile,

ei ole lahustunud fraktsiooni osakaal teada ja seega ei ole teada ka katsenõusse viidava uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon. Kokkupuute iseloomustamiseks on vaja analüütiliselt hinnata uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus. Hindamise lihtsustamiseks tuleks analüüs teha enne inokulumi lisamist. Kuna katsenõusse viiakse üksnes lahustunud fraktsioon, võib mõõdetav kontsentratsioon olla väga väike.

45. Aeganõudva ja kuluka analüüsi asemel soovitatakse lihtsalt kaaluda uuritava kemikaali kogus otse katsenõusse ja lähtuda järgnevates arvutustes kaalutud kogusele vastavast nominaalsest algsisaldusest. Uuritava kemikaali lahustunud, lahustumata ja adsorbeerunud fraktsiooni eristamine ei ole vajalik, sest kõik need fraktsioonid esinevad ka reoveepuhastis valitsevates reaalsetes tingimustes ning nende osakaal võib sõltuvalt reovee koostisest varieeruda. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on hinnata realistlikult kontsentratsiooni, mille juures pärssiv mõju puudub, ning sellega ei saa üksikasjalikult uurida, millised fraktsioonid aktiivmuda organisme pärssivad. Adsorbeeruvad ained tuleks samuti kaaluda otse katsenõusse ja nõu peaks olema adsorbeerimisest tuleneva kao minimeerimiseks silaanitud.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Hapniku sidumise kiiruse arvutamine**

46. Hapniku sidumise kiirus tuleks arvutada lähtuvalt mõõdetud väärtuste keskmisest, kasutades näiteks hapnikusisalduse ajas muutumise kõvera lineaarset osa ja piirdudes arvutustes hapnikusisalduse väärtuste vahemikuga 2,0–7,0 mg/l, kuna neist väärtustest suurem või väiksem sisaldus võib juba ise mõjutada hapnikutarbimise kiirust. Kummalegi poole nimetatud vahemikku jäävate kontsentratsioonivahemike kasutamine on mõnikord siiski vältimatut

▼ **M6**

ja vajalik, näiteks juhul, kui hingamine on tugevalt pärsitud ja seega väga aeglane või kui mõne konkreetse aktiivmuda hingamine on väga kiire. See on vastuvõetav juhul, kui sidumiskõvera asjaomased pikendatud lõigud on sirged ja nende tõus ei muutu hapnikusalduse vahemiku 2,0–7,0 mg/l piires väljumisel. Mis tahes kõver lõik graafikul osutab mõõtesüsteemi stabiliseerumisele või hapniku sidumise kiiruse muutumisele ning sellist lõiku ei tohiks hingamiskiiruse arvutamisel kasutada. Hapniku sidumise kiirust tuleks väljendada milligrammides liitri kohta tunnis (mg/lh) või milligrammides kuiva muda grammi kohta tunnis (mg/gh). Hapnikutarbimise kiiruse  $R$  (mg/lh) võib arvutada või interpoleerida hapnikusalduse vähenemise graafiku lineaarse osa põhjal vastavalt võrrandile 1:

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

kus

$Q_1$  on hapnikusaldus lineaarse faasi valitud lõigu alguspunktis (mg/l),

$Q_2$  on hapnikusaldus lineaarse faasi valitud lõigu lõpp-punktis (mg/l) ja

$\Delta_t$  on kahe kõnealuse mõõtmise vaheline ajavahemik (min).

47. Hingamise erikiirust ( $R_s$ ) väljendatakse tarbitud hapniku kogusena muda kuivmassi grammi kohta tunnis (mg/gh) vastavalt võrrandile 2:

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

kus  $SS$  on hõljuvaine sisaldus katsesegus (g/l).

48. Hapnikutarbimise kiiruse  $R$  eri indeksid, mida võib kasutada koos, on järgmised:

$S$  erikiirus,

$T$  üldine hingamiskiirus,

$N$  nitrifitseerimisega seotud hingamise kiirus,

$H$  heterotroofse hingamise kiirus,

$A$  abiootiliste protsessidega seotud hapnikutarbimise kiirus,

$B$  hapnikutarbimise kiirus kemikaalita kontrollproovides (keskmine).

**Nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiiruse arvutamine**

49. Üldise hingamiskiiruse ( $R_T$ ), nitrifitseerimisega seotud hingamise kiiruse ( $R_N$ ) ja heterotroofse hingamise kiiruse ( $R_H$ ) seost väljendab võrrand 3:

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

kus

$R_N$  on nitrifitseerimisest tuleneva hapnikusidumise kiirus (mg/lh),

$R_T$  on mõõdetud hapnikusidumise kiirus kemikaalita kontrollproovis, kuhu ei ole lisatud  $N$ -allüütiokarbamiidi ( $F_B$ ) (mg/lh) ja

$R_H$  on mõõdetud hapnikusidumise kiirus kemikaalita kontrollproovis, kuhu on lisatud  $N$ -allüütiokarbamiidi ( $F_N$ ) (mg/lh).

▼ **M6**

50. See seos kehtib kemikaalita kontrollproovide ( $R_{NB}$ ,  $R_{TB}$ ,  $R_{HB}$ ), abiootiliste kontrollproovide ( $R_{NA}$ ,  $R_{TA}$ ,  $R_{HA}$ ) ja uuritava kemikaaliga proovide ( $R_{NS}$ ,  $R_{TS}$ ,  $R_{HS}$ ) (mg/gh) puhul. Hingamise erikiirus arvutatakse järgmiselt:

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

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

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

51. Kui  $R_N$  osakaal on eelkatses piisavalt väike (nt  $< 5\%$   $R_T$  väärtusest kemikaalita kontrollproovides), võib lähtuda eeldusest, et heterotroofne hapnikusidumine on võrdne üldise hapnikusidumisega ja nitrititseeerimist ei toimu. Kui katsetega soovitakse hinnata mõju heterotroofsetele ja nitrititseeerivatele mikroorganismidele, tuleks kasutada mõnest muust allikast pärit aktiivmuda. Lõplik katse tehakse juhul, kui uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel täheldatakse hapnikusidumise kiiruse vähenemist.

**Hapnikutarbimise pärssumise protsendilise määra arvutamine**

52. Üldise hapnikutarbimise pärssumise protsentuaalne määr  $I_T$  uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil leitakse vastavalt võrrandile 7:

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

53. Heterotroofse hapnikusidumise pärssumise protsentuaalne määr  $I_H$  uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil leitakse samal viisil vastavalt võrrandile 8:

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

54. Nitrititseeerimisest tuleneva hapnikusidumise pärssumise määr  $I_N$  igal kontsentratsioonil leitakse vastavalt võrrandile 9:

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

55. Tuleks koostada graafik, mis väljendab hapnikusidumise pärssumise protsentuaalse määra sõltuvust uuritava kemikaali sisaldusest (pärssumiskõver; vt 4. liide, joonis 3). Pärssumiskõver koostatakse iga kolmetunnise ja vajaduse korral ka 30 minuti pikkuse aereerimisperioodi kohta. Tuleks arvutada või graafiku põhjal interpoleerida uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures hapnikusidumine väheneb 50 % võrra ( $EC_{50}$ ). Sobivate andmete olemasolu korral võib arvutada või interpoleerida  $EC_{50}$  usalduspiirid usaldusnivool 95 %, kõvera tõusu ning pärssimisvahemiku algust (nt  $EC_{10}$  või  $EC_{20}$ ) ja lõppu (nt  $EC_{80}$  või  $EC_{90}$ ) tähistavad asjakohased väärtused.
56. Tuleks silmas pidada, et sageli täheldatavat tulemuste varieeruvust arvestades võib paljudel juhtudel piisata tulemuste täiendavast väljendamisest suurusjärgu põhiselt, näiteks järgmiselt:

$EC_{50} < 1$  mg/l;

$EC_{50}$  1–10 mg/l;

$EC_{50}$  10–100 mg/l;

$EC_{50} > 100$  mg/l.

**Tulemuste tõlgendamine**

$EC_x$

▼ **M6**

57.  $EC_x$  väärtused ning nende alumised ja ülemised usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt probitanalüüs, logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearmani-Kärberi meetod või lihtne interpoleerimine (11)).  $EC_x$  leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskvaartusest  $x$  % moodustav väärtus.  $EC_{50}$  või mõne muu  $EC_x$  arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste väärtuste ( $x$ ) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

*NOEC hindamine*

58. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks NOEC, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidenäna). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid kooskõlas OECD dokumendiga „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunised”) (11). Uuritava kemikaali pärssiva mõju hindamiseks kontrollrühmaga võrreldes kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (väiksemamahulist) kontrollimist  $p$  väärtusel  $\leq 0,05$ .

**Katseprotokoll**

59. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, puhtus;
- uuritava kemikaali füüsikalise-keemilised omadused (nt  $\log K_{ow}$ , lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H) ja võimalik teave kemikaali käitumise, nt aktiivmudale adsorbeerumise kohta).

*Katsesüsteem:*

- päritolu, reoveepuhasti käitamistingimused, puhastisse sissevoolu allikas ning aktiivmuda kontsentratsioon, eeltöötlus ja säilitamine.

*Katsetingimused:*

- katsetemperatuur, pH katse ajal ja kokkupuuteperioodi(de) kestus.

*Tulemused:*

- hapnikutarbimise erikiirus kontrollproovides (milligrammi  $O_2$  muda grammi kohta tunnis);
- kõik mõõteandmed, pärssumiskõver(ad) ja  $EC_{50}$  arvutamise meetod;
- $EC_{50}$  ja võimaluse korral selle usalduspiirid usaldusnivool 95 %, samuti võimaluse korral  $EC_{20}$  ja  $EC_{80}$ ; kui  $EC_{50}$  ei ole võimalik kindlaks teha, siis NOEC ja kasutatud statistilised meetodid;
- andmed hingamise üldise pärssumise ning vajaduse korral heterotroofse ja nitrititseeerimisega seotud hingamise pärssumise kohta;
- abiootiline hapnikusidumine füüsikalise-keemiliste omaduste hindamiseks ette nähtud kontrollproovides (kui neid kasutatakse);
- võrdluskemikaali nimetus ja selle kemikaaliga saadud tulemused;
- kõik tulemusi mõjutada võivate asjaoludega seotud tähelepanekud ja kõrvalekalded standardmeetodist.

**KIRJANDUS**

- (1) Brown, D., Hitz, H. R., ja Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10: 245–261.

**▼M6**

- (2) King, E. F., ja Painter, H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxic. Assess.* 1: 27–39.
- (3) OECD (1984). Activated sludge, Respiration inhibition test. Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals. OECD, Pariis.
- (4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2007). ISO 8192: Water Quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183, Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon.
- (6) Painter, H. A., ja 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. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 471–483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxic. Assess.* 1: 515–524.
- (8) Robra, B. (1976). *Wasser/Abwasser* 117: 80.
- (9) Fiebig, S., ja Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresen. Environ. Bull.* 13: 1556–1557.
- (10) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (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 an aqueous medium.
- (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18. OECD, Pariis.



**▼ M6***1. liide***Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

**Kemikaal** – aine või segu.

**EC<sub>x</sub> (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %)** – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC<sub>50</sub> on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

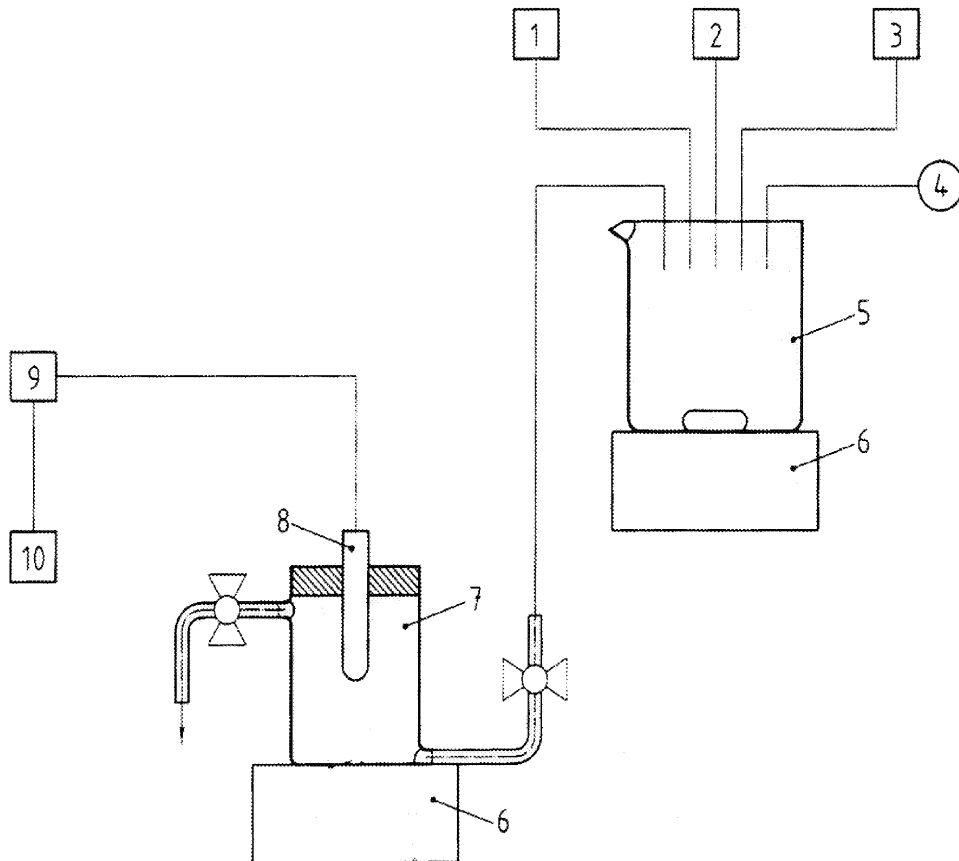
**NOEC (tähtsamat toimet mitteavaldav kontsentratsioon)** – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M6**

2. liide

Joonis 1. Mõõtesüsteemi näide.

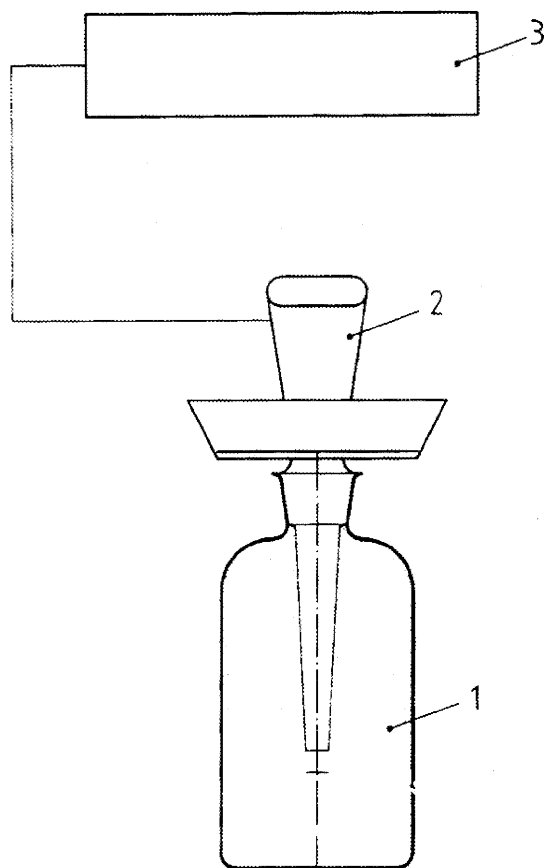
*Selgitus:*

- |                      |                                      |
|----------------------|--------------------------------------|
| 1 – aktiivmuda       | 6 – magnetsegisti                    |
| 2 – kunstlik sööde   | 7 – hapnikusisalduse mõõtmise kamber |
| 3 – uuritav kemikaal | 8 – hapnikuelektrood                 |
| 4 – õhk              | 9 – hapnikusisalduse mõõtmise seade  |
| 5 – segamisinõu      | 10 – salvestusseade                  |

▼ **M6**

3. liide

Joonis 2. BHT pudelil põhineva mõõtesüsteemi näide.



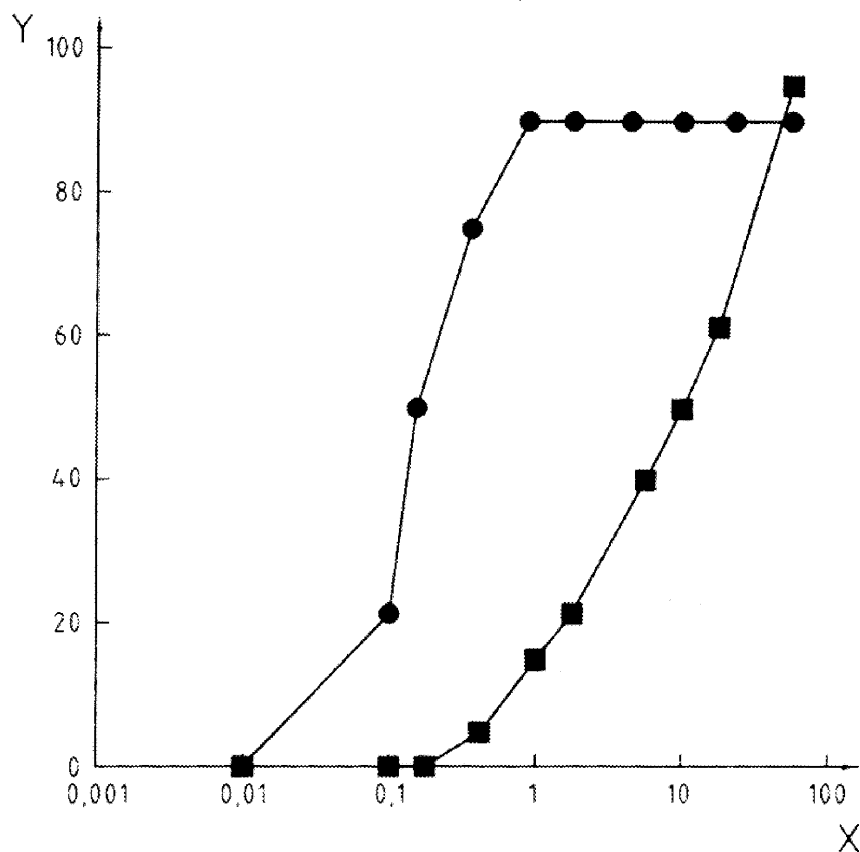
*Selgitus:*

- 1 – katsenõu
- 2 – hapnikuelektrood
- 3 – hapnikusalduse mõõtmise seade

▼ **M6**

## 4. liide

Joonis 3. Pärssumiskõverate näide.



*Selgitus:*

X – 3,5-diklorofenooli sisaldus (mg/l)

Y – pärssumine (%)

■ – heterotroofse hingamise pärssumine nitritifitseeriva muda kasutamisel

● – nitritifitseerimise pärssumine nitritifitseeriva muda kasutamisel.

**▼B****C.12. BIODEGRADATSIOON**

## MODIFITSEERITUD SCAS TEST

1. **MEETOD**

## 1.1. SISSEJUHATUS

Meetodi eesmärk on hinnata veeslahustuvate, mittelenduvate orgaaniliste ainete võimalikku lõpp-biodegraderumist kokkupuutel suhteliselt suurte mikroorganismide kontsentratsioonidega pika aja jooksul. Mikroorganismide elusolek säilitatakse selles perioodis, toites aktiivmuda iga päev setitatud reovee lisamisega. (Nädalavahe-tuse vajaduste katmiseks võib reovett säilitada temperatuuril 4 °C. Teise võimalusena võib kasutada OECD kunstlikku reovett.)

Võimalik on füüsikalise-keemiline adsorptsioon suspendeeritud kuiva-inele, mida tuleks tulemuste interpreteerimisel arvestada (vt 3.2).

Seoses vedela faasi pika viibeaja perioodiga (36 tundi) ja vahepealse toitainete lisamisega ei jäljenda test neid tingimusi, mis tekivad reoveepuhastis. Erinevate uuritavate ainete saadud tulemused viitavad sellele, et testi biodegradatsioonivõime on suur.

Testis tekitatud tingimused on äärmiselt soodsad uuritavat ühendit degradeerivate mikroorganismide valikuks ja/või adaptatsiooniks. (Protseduuri võib samuti kasutada aklimatiseeritud inokulaadi tekitamiseks, mida kasutada teistes testides.)

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine lõpliku biodegradatsiooni hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni määramist. LOS-määramine pärast hapestamist ja puhastamist on eelistatum meetod kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonide erinevuse ( $C_{\text{üld}} - C_{\text{anorgaaniline}}$ ) arvutamine.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võib anda võimaluse aine esmase degradatsiooni hindamiseks (lähteühendi keemilise struktuuri kadumine).

Meetod on kasutatav ainult nende uuritavate orgaaniliste ainete puhul, mis testis kasutatud kontsentratsiooni juures

— on veeslahustuvad (vähemalt 20 mg lahustunud orgaanilist süsinikku/l);

— omavad tühist küllastatud aururõhu väärtust;

— ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega;

— ei adsorbeeru oluliselt testistüsteemi;

— ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Määrata tuleb orgaanilise süsiniku sisaldus uuritavas materjalis.

**▼B**

Uuringutulemuste tõlgendamisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat teavet. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralsed.

Informatsioon aine toksilisuse kohta mikroorganismidesse võib olla kasulik väikeste tulemuste interpreteerimisel ja katseks sobiva kontsentratsiooni valimisel.

## 1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

$C_T$  = uuritava ühendi kontsentratsioon orgaanilise süsiniku juuresolekul või seotatud reoveele lisamisel aeratsiooniperioodi alguses (mg/l),

$C_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud uuringu supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l),

$C_c$  = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud kontrolli supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l).

Selle meetodi puhul defineeritakse biodegradatsiooni orgaanilise süsiniku kadumisena. Biodegradatsiooni saab väljendada järgmiselt.

1. Iga päev lisatud ainekogusest eemaldatud  $D_{da}$  protsent:

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

kus

$D_{da}$  = degradatsioon/päevas lisamine.

2. Tiga päeva alguses olemasolevast ainekogusest eemaldatud  $D_{ssd}$  protsent:

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

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

kus

$D_{ssd}$  = degradatsioon/aine päeva alguses;

indeksid  $i$  ja  $(i+1)$  viitavad mõõtmispäevale.

Valem 2a on soovitatav, kui väljavoolu LOS erineb päevast päeva, mille juures aga valem 2b võib kasutada, kui väljavoolu LOS püsib päevast päeva suhteliselt konstantsena.

**▼B**

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Osadel juhtudel võib uue aine uurimisel olla kasu võrdlusainete kasutamisest. Siinjuures ei tooda aga ära spetsiifilisi võrdlusaineid.

Andmed ringtestides hinnatud ühendite kohta on äratoodud (vt liide 1) peamiselt nii, et meetodi kalibreerimist võib teha pidevalt ja teistsuguse meetodi kasutamisel on võimalik tulemusi omavahel võrrelda.

## 1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda asetatakse (SCAS) seadmeosasse. Lisatakse uuritav ühend ja seotatud olmereovesi ning segu aereeritakse 23 tundi. Seejärel aereerimine peatatakse, lastakse mudal settida ja vedelik valatakse ära.

Aeratsioonikambrisse jäänud muda segatakse järgmise uuritava ühendi alikvoodi ja reoveega ning tsükli korratakse.

Biodegradatsioon tehakse kindlaks lahustunud orgaanilise süsiniku sisalduse põhjal supernatantvedelikus. Saadud tulemust võrreldakse näitajaga, mis on saadud ainult seotatud reoveest võetud kontrollist.

Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsimeetodit, saab mõõta biodegradatsioonist tingitud eellasmolekuli kontsentratsiooni muutusi (primaarne biodegradatsioon).

## 1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Selle lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamisel põhineva meetodi korduvteostatavust ei ole veel kinnitatud. (Kui kaalutakse primaarset biodegradatsiooni, saadakse väga täpsed andmed materjalide kohta, mida ulatuslikult degradeeritakse.)

Käesoleva meetodi tundlikkuse määrab suures osas põhilahuse varieeruvus ning vähesemal määral lahustunud orgaanilise süsiniku määramise täpsus ja uuritava ühendi sisaldus vedelikus iga tsükli alguses.

## 1.6. KATSEPROTSEDUURI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

Iga uuritava aine ja kontrolli jaoks ühendatakse piisav arv puhtaid aeratsiooniseadmeid (alternatiivina võib kasutada originaalset 1,5 l SCAS testi seadmeosa) ja õhu sisselaske torusid (joonis 1). Katse-seadmetesse suunatud suruõhk (puhastatud läbi puuvillase filtri) ei tohiks sisaldada orgaanilist süsinikku ja peaks olema eelnevalt küllastatud veega, et vähendada kadusid auramise tõttu.

Vedelikusegu proov, mis sisaldab 1–4 g suspendeeritud tahkeid osakesi/l saadakse peamiselt olmereovee puhastist pärit aktiivmudast. Iga aeratsiooniseadme kohta vajatakse ligikaudu 150 ml vedelikusegu.

**▼B**

Uuritava aine põhilahused valmistatakse destilleeritud vees; tavalisel juhul vajalik kontsentratsioon on 400 mg/l, kuna iga aeratsioonitsükli alguses annab orgaaniline süsinik uuritava ühendi kontsentratsiooniks 20 mg/l süsinikku, kui biodegradatsiooni ei teki.

Suuremad kontsentratsioonid on lubatud, kui toksilisus mikroorganismidele seda võimaldab.

Määratakse põhilahuste orgaanilise süsiniku sisaldus.

**1.6.2. Katsetingimused**

Katse tuleks teha temperatuuril 20–25 °C.

Kasutatakse suuri aeroobsete mikroorganismide kontsentratsioone (1–4 g/l suspendeeritud kuivainet) ja efektiivne viibeaja periood on 36 tundi. Süsinikku sisaldavat materjali reovee söötmes oksüdeeritakse ulatuslikult, tavaliselt kaheksa tundi alates iga aeratsioonitsükli algusest. Seejärel muda respireerib endogeenselt ülejäänud aeratsiooniperioodi, mille käigus ainuke olemasolev substraat on uuritava ühend, kui see ei ole juba täielikult metaboliseeritud. Need omadused kombineerituna igapäevase testi reinokuleerimisega (kui keskkonnana kasutatakse olmereovett), tagavad äärmiselt soodsad tingimused nii aklimatsiooniks kui ka ulatuslikuks biodegradatsiooniks.

**1.6.3. Katse käik**

Peamiselt olmereoveest pärit aktiivmudaga puhastist või laboriseadmeist võetakse vedelikusegu proov ja seda hoitakse aeroobsetes tingimustes kuni laboris kasutamiseni. Iga aeratsiooniseade ja samuti kontrollseade täidetakse 150 ml vedelikuseguga (kui kasutatakse SCAS originaaltesti ühikut, tuleb kogus kümnekordistada) ja alustatakse aereerimist. 23 tunni pärast aeratsioon peatatakse ja mudal lastakse settida 45 minutit. Järjekorras avatakse kõik torude kraanid ja 100 ml supernatantvedeliku osad eemaldatakse. Setitunud olmereovee proov võetakse vahetult enne kasutamist ja 100 ml lisatakse igasse aeratsioonihikusse jäänud muda kogusele. Alustatakse uuesti aereerimist. Selles staadiumis enam uuritavat materjali juurde ei lisata ja seadmeosadesse lisatakse toitelahusena üks kord päevas olmereovett kuni saadakse seismisel läbipaistev supernatandi vedelik. Tavaliselt läheb kuni kaks nädalat, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus supernatantvedelikus läheneks iga aeratsioonitsükli lõpus püsiväärtusele.

Selle perioodi lõpuks üksikud setitunud mudakogused segatakse kokku ja igasse seadmeossa lisatakse 50 ml saadud mudasegu.

Kontrollanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett ja 5 ml vett ning katseanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett koos 5 ml sobivat uuritavat ühendit sisaldava põhilahusega (400 mg/l). Aeratsiooni alustatakse uuesti ja jätkatakse 23 tundi. Mudal lastakse seejärel settida 45 minutit, vedelik valatakse pealt ära ja analüüsitakse sellest lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust.

Eespool kirjeldatud „täida-eemalda” -protseduuri korratakse iga päev kogu katse vältel.



**▼B**

Enne sadestamist võib olla vajalik anumate seinte puhastamine, et hoida ära tahkete osakeste kuhjumist üle vedelikunivoo. Ristkontaminatsiooni vältimiseks kasutatakse iga seadme jaoks eraldi kaabitsat või harja.

Ideaaljuhul tuleks lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust supernatantvedelikus määrata iga päev, kuigi lubatud on ka harvemad analüüsid. Enne analüüsimist filtreeritakse vedelikud läbi pestud 0,45 µm membraanfiltrite või tsentrifugeeritakse. Membraanfiltrid on sobivad, kui on tagatud, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri ainet filtratsiooni etapis. Tsentrifugeerimis asuva proovi temperatuur ei tohi ületada 40 °C.

Vähese või mittemääratava biodegradatsiooniga ühenditega tehtava katse pikkus on kindlaks määramata, kuid kogemuse põhjal peaks see üldiselt olema vähemalt 12 nädalat, kuid mitte kauem kui 26 nädalat.

## 2. ANDMED JA HINDAMINE

Lahustunud orgaanilise süsiniku väärtused katse- ja kontrollanumate supernatantvedelikus kujutatakse graafikul võrdluses ajaga.

Biodegradatsiooni saavutamisel läheneb uuritava aine osas sedastatud tase kontrolli puhul kindlaks tehtud näitajale. Kui kahe taseme vahel leitud erinevus püsib kolme järjestikuse mõõtmise puhul, tehakse veel selline arv edasisi mõõtmisi, et võimaldada andmete statistilist töötlust, ja arvutatakse uuritava ühendi protsentuaalne biodegradatsioon ( $D_{da}$  või  $D_{ssd}$ , vt 1.2).

## 3. ARUANDLUS

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

- kogu teave, mis puudutab kasutatud reovett, seadmetüüpi, uuritava ainega seotud katsetulemusi, võrdlusainet, kui kasutati, ja põhilahust;
- temperatuur;
- eemaldamiskõver koos kirjeldusega, arvutamismeetodiga (vt 1.2);
- kuupäev ja koht, kust võeti aktiivmuda ja reovee proovid, adaptatsiooni seisund, kontsentratsioon jne;
- kõikide uuringuprotseduuride muutuste teaduslik põhjendus;
- allkiri ja kuupäev.

**▼B**

## 3.2. TULEMUSTE TÖLGENDAMINE

Kuna sellisel meetodil uuritud aine ei ole täielikult biolagundatav, eemaldub LOS ainult biodegradatsiooni tõttu normaalsel juhul järkjärgult päevi ja nädalaid, v.a juhtudel, kui aklimatsioon on toimunud äkki (näidatud äkki kadumisenähtena mõne nädala möödumisel).

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalise-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eemaldamine alguses. Edasine käik sõltub sellistest faktoritest nagu adsorptsiooni ulatus ja suspendeeritud kuivaine sisaldus väljavoolu vees. Tavaliselt suureneb erinevus LOS-kontsentratsioonide vahel kontrollis ja proovi supernatantvedelikus järkjärgult algselt madalalt tasemelt ja see erinevus jääb seejärel uuele tasemele ülejäänud eksperimendiks, v.a aklimatisatsiooni korral.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad katsed. Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetiline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitteemaldatavaid LOS-tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitteemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile.

LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vältida ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või  $^{14}\text{C}$ -märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse.  $^{14}\text{C}$  testi ühendi kasutamisel  $^{14}\text{CO}_2$  sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

## 4. VIITED

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

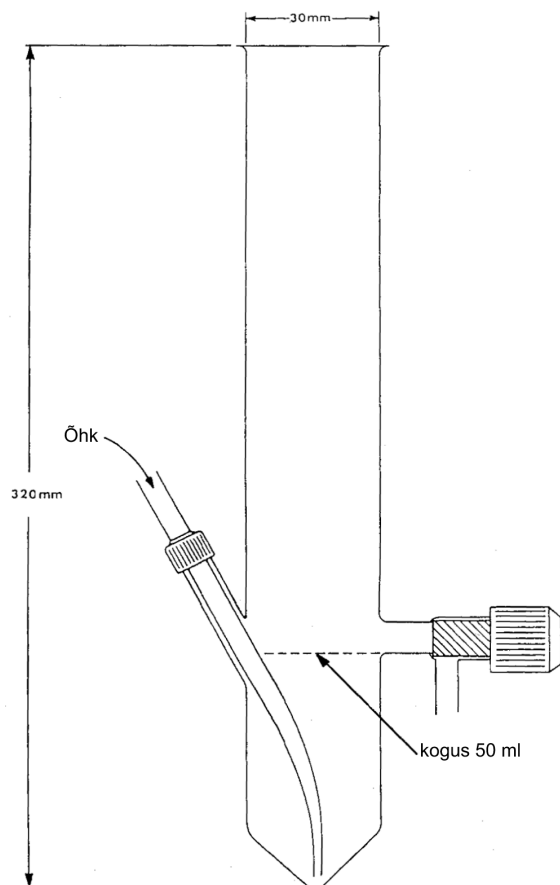
**▼B***1. liide***SCAS test: tulemuste näidised**

Aine	$C_T$ (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Protsentuaalne biodegradatsioon $D_{da}$	Katse kestus (päevades)
4-atsetüülaminobenseensulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenool	16,9	0,8	95,3	40
Dietüleenglükool	16,5	0,2	98,8	40
Aniliin	16,9	1,7	95,9	40
Tsüklopentaantetrakarboksülaat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

2. liide

Uuringuseadme näidis



▼ M7**C.13. BIOAKUMULEERUMINE KALADES: KOKKUPUUDE VEE JA TOIDU KAUDU**

## SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 305 (2012). Katsemeetodi muutmisel on kaks põhieesmärki. Esiteks soovitakse seda täiendada toidu kaudu bioakumuleerumist<sup>(1)</sup> käsitleva meetodiga, mis sobib vees väga vähe lahustuvate ainete võimaliku bioakumuleerumise tuvastamiseks. Teiseks soovitakse välja töötada katsemeetod, mille puhul loomade heaolu huvides kasutatakse võimaluse korral vähem kalu ja mis on kulutõhusam.

Konsolideeritud katsemeetodi C.13 (1) vastuvõtmisele järgnenud aastatel on tehtud katseid paljude ainete ja saadud märkimisväärseid kogemusi nii laborites kui ka reguleerivates asutustes. See on viinud veendumusele, et meetodi keerukust saab konkreetsetele kriteeriumidele vastavuse korral (vt punkt 88) vähendada ning on võimalik kasutada astmelist lähenemisviisi. Samuti ilmneb kogemustest, et sellised bioloogilised tegurid nagu kalade kasv ja lipiidisisaldus võivad tulemustele tugevat mõju avaldada ja neid võib olla vaja arvesse võtta. Peale selle on jõutud arusaamisele, et vees väga raskesti lahustuvate ainete katsete tegemine ei pruugi olla tehniliselt teostatav. Lisaks võib vees väga vähe lahustuvate ainete puhul olla veekaudne kokkupuude veekeskkonnas väiksema tähtsusega kui kokkupuude toidu kaudu. Sellest tulenevalt on välja töötatud katsemeetod, mille puhul kalade kokkupuude toimub toidu kaudu (vt punktid 7–14 ja alates punktist 97). Toidu kaudu kokkupuudet käsitleva katsemeetodi valideerimine (laboritevaheline võrdlusuring) viidi läbi 2010. aastal (51).

Peamised muudatused hõlmavad järgmist.

- Kui on tõenäoline, et biokontsentratsioonitegur (BCF) on katsekontsentratsioonist sõltumatu, võib ainult ühe katsekontsentratsiooni kasutamist katses lugeda piisavaks.
- Teatavatele kriteeriumidele vastavuse korral on võimalik kasutada veekaudse kokkupuute määramiseks minimeeritud katseplaani, mille puhul proovivõtupunktide arv on väiksem.
- Tuleks määrata kalade lipiidisisaldus, et biokontsentratsiooniteguri oleks võimalik väljendada lähtuvalt lipiidisisaldusest 5 %.
- Statsionaarset olekut iseloomustava biokontsentratsiooniteguri hindamise kõrval on pandud suuremat rõhku biokontsentratsiooniteguri kineetika hindamisele (kui see on võimalik).
- Teatava rühma ainete puhul nähakse ette toidukaudse kokkupuute katse juhtudel, mil seda peetakse asjakohasemaks kui veekaudse kokkupuute katset.
- Tuleks määrata kalade mass, et BCF<sub>k</sub>-d oleks võimalik korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes.

Enne mis tahes bioakumuleerumiskatse alustamist peaksid uuritava aine kohta olema teada järgmised andmed:

- a) analüüsimeetodi tundlikkus uuritava aine ja selle võimalike metaboliitide sisalduse määramisel kudedes, samuti vees või toidus (vt punkt 65);
- b) lahustuvus vees (katsemeetod A.6; (2)); see tuleks määrata vastavalt meetodile, mis on asjaomase (hinnangulise) lahustuvusvahemiku jaoks sobiv ja tagab usaldusväärse tulemuse. Hüdrofoobsete ainete puhul kasutatakse üldjuhul kolonnist elueerimisel põhinevat meetodit;

<sup>(1)</sup> Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

▼ **M7**

- c) süsteemi  $n$ -oktanool/vesi iseloomustav jaotuskoeffitsient  $K_{OW}$  <sup>(1)</sup> (katsemeetodid A.8 (4), A.24 (5) ja A.23 (6)) või muu asjakohane teave jaotumisega seotud omaduste kohta (näiteks sorbeerumine lipiididele –  $K_{OC}$ ); see tuleks määrata vastavalt meetodile, mis on  $K_{OW}$  asjaomase (hinnangulise) vahemiku jaoks sobiv ja tagab usaldusväärse tulemuse. Hüdrofoobsete ainete puhul kasutatakse üldjuhul aeglasel segamisel põhinevat meetodit (katsemeetod A.23 (6));
- d) aine püsivus vees (hüdrolüüs – katsemeetod C.7 (7));
- e) aine püsivus toidus (kui konkreetselt on valitud lähenemisviis, mis põhineb toidukaude kokkupuute hindamise meetodil);
- f) fotokeemilist muundumist käsitlevad andmed, mis on katses kasutatavaid kiirgustingimusi silmas pidades asjakohased (8);
- g) pindpinevus (ainete puhul, mille  $\log K_{OW}$ -d ei ole võimalik määrata) (katsemeetod A.5 (9));
- h) aururõhk (katsemeetod A.4 (10));
- i) vajaduse korral kõik andmed aine biotilise ja abiotilise vees lagunemise kohta, näiteks (kuid mitte ainult) kiire biolagundatavuse kohta (katsemeetod C.4, II–VII osa (11), ja katsemeetod C.29 (12));
- j) vajaduse korral teave metaboliitide kohta: struktuur,  $\log K_{OW}$ , teke ja lagundatavus;
- k) happe dissotsiatsioonikonstant ( $pK_a$ ) ainete puhul, mis võivad ioniseeruda. Kui see on katsealuse kalaliigi puhul vastuvõetav, tuleks vajaduse korral katses kasutatava vee pH-d reguleerida, et tagada katses aine esinemine ioniseerimata kujul.

Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse valitud kokkupuuteviisist ja proovivõtukorras sõltumatult korda aine võimaliku kalades bioakumuleerumise hindamiseks. Ehkki kindlasti tuleks eelistada läbivoolurežiimi, on katses lubatud kasutada ka poolstaatilist režiimi, kui nõuetekohasuse kriteeriumid (vt punktid 24 ja 113) on täidetud. Toidukaude kokkupuute hindamisel ei pea kasutama läbivoolusüsteemi, et säilitada uuritava aine sisaldust vees, kuid see hõlbustab lahustunud hapniku sisalduse hoidmist vajalikul tasemel ning aitab tagada vee puhtust ja kõrvaldada näiteks eritiste mõju.

Käesolevas katsemeetodis esitatakse valitud konkreetsest meetodist sõltumatu piisavalt üksikasjalik katse läbiviimise kirjeldus, ent jäetakse samas piisavalt vabadust katseplaani kohandamiseks vastavalt konkreetse labori tingimustele ja konkreetse uuritava aine omadustele. Veekaude kokkupuute katset on kõige asjakohasem kasutada püsivate orgaaniliste ainete puhul, mille  $\log K_{OW}$  väärtus on vahemikus 1,5–6,0 (13), kuid seda võib kasutada ka väga hüdrofoobsete ainete puhul, mille  $\log K_{OW} > 6,0$ , kui on võimalik tõendada, et uuritav aine on teataval kontsentratsioonil vees täielikult lahustunud ja selline kontsentratsioon on püsiv. Kui ei ole võimalik tõendada, et uuritava aine sisaldus vees on püsiv, ei ole veekaude kokkupuute katse asjakohane ning oleks vaja kasutada lähenemisviisi, mis põhineb kalade kokkupuutel ainega toidu kaudu (ehkki toidukaude kokkupuute katse tulemuste tõlgendamine ja kasutamine võib sõltuda konkreetsest õigusraamistikust). Orgaaniliste ainete puhul, mille  $\log K_{OW}$  on kuni umbes 9,0, võib biokontsentratsiooniteguri (BCF, vahel tähistatud ka kui  $K_B$ ) hinnangulise väärtuse leidmiseks kasutada võrrandit, mille on avaldanud Bintein *et al.* (14). Selliste väga

<sup>(1)</sup> Mõnikord kasutatakse tähist  $P_{OW}$ ; selle määramiseks kasutatakse peatükis A.8 (4) kirjeldatud loksutamismeetodit, peatükis A.24 (5) kirjeldatud HPLC-põhist meetodit või peatükis A.23 (6) kirjeldatud aeglasel segamisel põhinevat meetodit. Mõnikord kasutatakse  $\log K_{OW}$  määramiseks generaatorkolonnil põhinevat meetodit. Selle meetodi kasutamist kirjeldavate uuringute arv on piiratud; seda on peamiselt kasutatud klooritud bifenuülide ja dibensodioksiinide puhul (nt Li ja Doucette, 1993) (3). Ainete puhul, mis võivad ioniseeruda, peaks  $\log K_{OW}$  väärtus viitama ioniseerumata vormile.

▼ **M7**

hüdrofoobsete ainete biokontsentratsiooniteguri hinnanguline väärtus võib olla suurem kui laborikatsetes eeldatavalt saadav biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus ( $BCF_{SS}$ ), eriti juhul, kui kõnealuse hinnangulise väärtuse leidmiseks kasutatakse lihtsat lineaarset mudelit. Võimalikku bioakumuleerumist iseloomustavad parameetrid hõlmavad aine omastamise kiiruskonstanti ( $k_1$ ), aine kao kiiruskonstante, sealhulgas puhastumise kiiruskonstanti ( $k_2$ ), biokontsentratsiooniteguri statsionaarses olekus ( $BCF_{SS}$ ), kineetilist biokontsentratsiooniteguri ( $BCF_K$ ) ja toidu kaudu biokuhjumise teguri (BMF) <sup>(1)</sup>.

Uuritava aine radioaktiivne märgistamine võib hõlbustada vee-, toidu- ja kala-proovide analüüsimist ja selle abil võib kindlaks teha, kas metaboliitide tuvastamine ja kvantifitseerimine on vajalik. Kui mõeldakse üksnes radioaktiivsete jääkide üldsisaldust (näiteks põletamise või kudede solubiliseerimise abil), leitakse BCF või BMF lähteaine, kõikide allesjäänud metaboliitide ja assimileerunud süsiniku summaarse sisalduse põhjal. Radioaktiivsete jääkide üldsisaldusel põhinevad BCFi või BMFi väärtused ei pruugi seepärast olla otseselt võrreldavad üksnes lähteaine suhtes spetsiifilise keemilise analüüsi põhjal saadud BCFi või BMFi väärtustega. Radioaktiivse märgistamise uuringutes võib enne analüüsimist kasutada selliseid lahutamismeetodeid nagu õhekihikromatograafia, HPLC <sup>(2)</sup> või gaaskromatograafia, et määrata BCF või BMF lähteaine põhjal. Lahutamismeetodi kasutamise korral tuleks tuvastada ja kvantifitseerida nii lähteaine kui ka asjakohased metaboliidid <sup>(3)</sup> (vt punkt 65), kui BCFi või BMFi arvutamisel soovitakse aluseks võtta mitte radioaktiivselt märgistatud jääkide üldsisaldus, vaid lähteaine sisaldus kalas. Samuti on võimalik ühendada bioakumuleerumise uuring kala metabolismi või aine *in vivo* jaotumise uuringuga ning tuvastada ja analüüsida kudedes esinevaid jääke. Võimaliku metabolismi prognoosimiseks võib kasutada sobivaid vahendeid (nt OECD QSAR-meetodite pakett (15) ja omandiõigusega kaitstud QSAR-programmid).

Selle üle otsustamisel, kas teha veekaudse või toidukaudse kokkupuute katse ja millise katseplaani alusel, tuleks lähtuda punktis 3 kirjeldatud aspektidest ja kaaluda neid asjaomase õigusraamistiku kontekstis. Näiteks tuleks ainete puhul, mille  $\log K_{OW}$  on suur, kuid mille lahustuvus vees on olemasolevate analüüsimismeetodite tundlikkust silmas pidades siiski arvestatav, kaaluda kõigepealt veekaudse kokkupuute katse tegemist. On siiski võimalik, et teave selliste hüdrofoobsete ainete vees lahustuvuse kohta ei ole põhjalik, mistõttu enne konkreetse katsemeetodi kasutamise üle otsuse langetamist tuleks uurida, kas on võimalik valmistada asjaomase aine püsiva, mõõdetava sisaldusega vesilahus (püsiv emulsioon ei ole lubatud), mida saaks kasutada veekaudse kokkupuute katses (16). Ei ole võimalik anda täpseid suuniseid sobiva katsemeetodi valimiseks lähtuvalt vees lahustuvuse ja süsteemis oktaanol/vesi täheldatava jaotuskoeffitsiendi piirkriteeriumidest, kuna eespool kirjeldatud põhjustel võivad muud tegurid (analüüsimismeetod, lagunemine, adsorptsioon jne) avaldada märkimisväärset mõju katsemeetodi kohaldatavusele. Siiski võib öelda, et selliste ainete puhul, mille  $\log K_{OW}$  väärtus on üle 5 ja vees lahustuvus alla  $\sim 0,01$ – $0,1$  mg/l, võib veekaudse kokkupuute hindamine muutuda üha raskemaks.

Tuleks kaaluda ka muid tegureid, mis võivad mõjutada katsemeetodi valikut, sealhulgas aine võimalikku adsorbeerumist katsenõudele ja -seadmetele, selle püsivust vesilahuses, võrrelduna püsivusega kalasöödas (17, 18), jne.

Teave selliste praktiliste aspektide kohta võib olla kättesaadav muudest veekaudset kokkupuudet käsitlevatest lõpuleviidud uuringutest. Täiendavat teavet bioakumuleerumise uuringute teostamisega seotud aspektide hindamise kohta võib leida kirjandusest (nt viide 19).

Ainete puhul, mille lahustuvus või kontsentratsiooni püsivus vees ja sellise kontsentratsiooni mõõtmine ei sea mingeid piiranguid veekaudse kokkupuute meetodi kasutamisele, tuleb aine võimaliku biokontsentreerumise hindamisel eelistada seda meetodit. Igal juhul tuleks veenduda, et veekaudsel kokkupuutel kasutatav(ad) kontsentratsioon(id) on aine katsekeskkonnas lahustuvuse vahemikus.

<sup>(1)</sup> Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

<sup>(2)</sup> HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia.

<sup>(3)</sup> Mõnes õigusraamistikus võib metaboliitide analüüsimine olla kohustuslik, kui on täidetud teatavad tingimused (vt punkt 65).

▼ **M7**

Lahustunud uuritava aine püsiva sisalduse tagamiseks võib kasutada eri meetodeid, mis põhinevad näiteks põhilahuste kasutamisel või passiivsel doseerimissüsteemil (nt kolonnist elueerimise meetod), tingimusel, et on võimalik tõendada, et sealjuures säilitatakse püsiv kontsentratsioon ja punktis 27 esitatud soovitude kohane katsekeskkond ei muutu.

Väga hüdrofoobsete ainete puhul ( $\log K_{OW} > 5$  ja lahustuvus alla  $\sim 0,01\text{--}0,1$  mg/l) võib veekaudse kokkupuute hindamine muutuda üha raskemaks. Sellega seotud piirangud võivad tuleneda asjaolust, et aine sisaldust vees ei ole võimalik hoida piisavalt püsivana (nt kokkupuutekatstes kasutatavate nõude klaaspinnale sorbeerumise või kiire kalades omastamise tõttu), või sellest, et vesilahuses kasutatavad kontsentratsioonid on nii väikesed, et on võrreldavad analüütilise määmispiiriga või jäävad sellest allapoole<sup>(1)</sup>. Selliste väga hüdrofoobsete ainete puhul soovitatakse kasutada toidukaudse kokkupuute meetodit, kui see on kooskõlas asjaomase õigusraamistikuga ja riskihindamise aluseks olevate vajadustega.

Pindaktiivsete ainete puhul tuleks kaaluda, kas veekaudse biokontsentreerumise katse on aine omadustest lähtuvalt teostatav; toidukaudse kokkupuute katse on selliste ainete puhul tõenäoliselt asjakohasem. Pindaktiivsed ained vähendavad pindpinevust kahe vedeliku piirpinnal. Tänu nende amfiifilsusele (st nad sisaldavad nii hüdrofiilset kui ka hüdrofoobset osa) kogunevad need ained piirpinnale, näiteks vee ja õhu või vee ja toidu piirpinnale või klaasseinale, see aga takistab nende sisalduse määramist vees.

Toidukaudse kokkupuute katse võimaldab hoiduda mõnest kokkupuutega seotud probleemist keerukate segude puhul, mille koostisainete lahustuvus vees on erinev, kuna võrreldaval tasemel kokkupuute saavutamise kõikide segu koostisainetega on sellises katses tõenäolisem kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt viide 20).

Tuleks märkida, et toidukaudse kokkupuute puhul leitakse biokontsentratsiooni-teguri (BCF) asemel biokuhjumistegur (BMF)<sup>(2)</sup>. On välja töötatud lähenemisviisid kineetilise biokontsentratsiooniteguri ( $BCF_K$ ) hinnangulise väärtuse leidmiseks toidukaudse kokkupuute katse saadud andmete põhjal (nagu on kirjeldatud 8. liites), kuid selliste lähenemisviiside kasutamisel tuleks olla ettevaatlik. Kõnealuste lähenemisviiside puhul lähtutakse üldjuhul esimest järku reaktsiooni kineetikast ja need on kohaldatavad üksnes teatud kindlatesse rühmadesse kuuluvate ühendite puhul. On ebatõenäoline, et selliseid lähenemisviise on võimalik kohaldada pindaktiivsete ainete puhul (vt punkt 12).

Veekaudse kokkupuute määramisel tuleks loomade arvu ja/või ressursside vähendamiseks ette nähtud minimeeritud katseplaani, mille puhul proovivõtupunktide arv on väiksem (vt alates punktist 83), kohaldada üksnes juhul, kui on põhjust eeldada, et asjaomase aine omastamine ja sellest puhastumine toimub ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale (st üldjuhul on tegu ioniseerumata orgaaniliste ainetega; vt punkt 88).

### C.13 – I: VEEKAUDSEL KOKKUPUUTEL BOKONTSENTREERUMISE KATSE KALADEGA

#### KATSE PÕHIMÕTE

Katse hõlmab kahte etappi: kokkupuutumise (omastamise) etapp ja kokkupuutejärgne (puhastumise) etapp. Omastamisetapis viiakse rühm ühe liigi kalu kokkupuutesse uuritava ainega, mis esineb aine omadustest sõltuvalt ühel või mitmel valitud kontsentratsioonil (vt punkt 49). Seejärel viiakse kalad puhastamisetapiks keskkonda, mis ei sisalda uuritavat ainet. Puhastumisetapp on alati vajalik, välja arvatud juhul, kui omastamisetapis omastatakse ainet tühises koguses. Uuritava

<sup>(1)</sup> Üldjuhul peaks omastamisetapis mõõdetav aine sisaldus vees olema vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem kui määramispiir, et katse puhastamisetapis oleks võimalik teha mõõtmisi mitme organismist kõrvaldamise poolväärtusaja vältel.

<sup>(2)</sup> Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.



▼ M7

aine kontsentratsiooni kalas või kala pinnal (või kala teatavates kudedes) jälgitakse katse kummagi etapi kestel. Peale ainega kokkupuutuva rühma kasutatakse kontrollrühma, milles kalu hoitakse identsetes tingimustes, kuid ilma uuritava aineta, et oleks võimalik võrrelda biokontsentreerumise katses täheldatud võimalikku ebasoodsat mõju vastava kontrollrühma näitajatega ja teha kindlaks uuritava aine taustsisaldus<sup>(1)</sup>.

Veekaudse kokkupuute katses on omastamisetapi kestus tavaliselt 28 päeva. Seda kestust võib vajaduse korral pikendada (vt punkt 18) või ka lühendada, kui on tõendatud, et statsionaarne olek saavutatakse varem (mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites). Omastamisetapi kestust ja statsionaarse oleku saavutamiseks vajalikku aega saab hinnata 5. liites esitatud võrrandite abil. Seejärel algab puhastumisetapp, mille vältel kalad ei puutu enam kokku uuritava ainega; selleks viiakse kalad üle puhtasse nõusse, mis sisaldab sama katselahust, kuid ilma uuritava aineta. Võimaluse korral arvutatakse biokontsentratsioonitegur, soovitatavalt nii kalades mõõdetud kontsentratsiooni ( $C_f$ ) ja vees mõõdetud kontsentratsiooni ( $C_w$ ) suhtarvuna statsionaarses olekus ( $BCF_{SS}$ ; mõiste määratlus on esitatud 1. liites) kui ka kineetilise biokontsentratsioonitegurina ( $BCF_K$ ; mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi ( $k_1$ ) ja puhastumise kiiruskonstandi ( $k_2$ ) suhet ning mille puhul eeldatakse esimest järku reaktsiooni kineetikat<sup>(2)</sup>.

Kui 28 päeva jooksul ei saavutata statsionaarset olekut, võib arvutada  $BCF_i$  kineetilise lähenemisviisi abil (vt punkt 38) või pikendada omastamisetappi. Kui statsionaarse oleku saavutamiseks vajalik omastamisetapp on ebamõistlikult pikk (vt punktid 37 ja 38 ning 5. liide), tuleks eelistada kineetilist lähenemisviisi. Teise võimalusena tuleks väga hüdfoobsete ainete puhul kaaluda toidukaudse kokkupuute katse tegemist<sup>(3)</sup>, kui see on kooskõlas asjaomase õigusraamistikuga.

Omastamise kiiruskonstant, puhastumise (kao) kiiruskonstant (või keerulisemate mudelite puhul konstandid), biokontsentratsioonitegur (statsionaarses olekus ja/või kineetiline) ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse mudelist, mis kirjeldab kõige paremini uuritava aine mõõdetud kontsentratsioone kalades ja vees (vt 5. liide).

Kalade kehamassi suurenemine katse vältel põhjustab uuritava aine sisalduse vähenemise kasvavates kalades (nn kasvust tingitud lahjenemine), mistõttu kineetilise  $BCF_i$  väärtust alahinnatakse juhul, kui seda ei korrigeerita kasvu suhtes (vt punktid 72 ja 73).

$BCF$  põhineb aine üldsisaldusel kalades (st kalade summaarsel märgmassil). Eriotstarbel võib siiski kasutada ka kindlaksmääratud kudesid või organeid (näiteks lihaskude, maks), kui kalad on piisavalt suured, või jagada kala söödavaks (filee) ja mitesöödavaks (sisikond) osaks. Kuna paljude orgaaniliste ainete biokontsentreerumise määra ja hüdfoobsuse vahel on selge seos, on vastav seos ka uuritavate kalade lipiidisisalduse ja selliste ainete täheldatava biokontsentreerumise vahel. Seega tuleks kõnealuste väga lipofiilsete ainete ( $\log K_{OW} > 3$ ) tehtavates katsetes sellest asjaolust tuleneva tulemuste varieeruvuse vähendamiseks kasutada biokontsentreerumise väljendamiseks peale katses otseselt saadud

<sup>(1)</sup> Enamiku uuritavate ainete puhul ei tohiks aine ideaaljuhul olla kontrollrühma vees tuvastatav. Taustsisaldus peaks olema asjakohane üksnes looduslikult esinevate materjalide (nt mõned metallid) ja keskkonnas laialdaselt levinud ainete puhul.

<sup>(2)</sup> Kui on selge, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga, tuleks kasutusele võtta keerukamad mudelid (vt viited 5. liites) ja küsida nõu biostatistikult.

<sup>(3)</sup> Aine omastamist võib piirata väike kokkupuutekontsentratsioon, mis tuleneb vähesest vees lahustuvusest biokontsentreerumise katses, samas kui toidukaudse kokkupuute katses on võimalik saavutada oluliselt suurem kokkupuutekontsentratsioon.

▼ **M7**

väärtuse ka normaliseeritud väärtust, mille aluseks on võetud kala lipiidisisaldus 5 % (terve kala märgmassist). See on vajalik selleks, et eri ainete ja/või katsealuste liikidega saadud tulemusi oleks võimalik omavahel võrrelda. Valitud lipiidisisaldus 5 % on laialdaselt kasutusel, kuna see väljendab käesolevas katsemetodis tavapäraselt kasutatavate kalade keskmist lipiidisisaldust (21).

**TEAVE UURITAVA AINE KOHTA**

Peale sissejuhatuses punktis 3 kirjeldatud uuritava aine omaduste hõlmab nõutav teave ka aine mürgisust katses kasutatavale kalaliigile, soovitatavalt asümptootilist (st ajast sõltumatut) LC<sub>50</sub>, ja/või kaladega tehtud pikaajaliste katsete põhjal hinnatud mürgisust (nt katsemetodid C.47 (22), C.15 (23) ja C.14 (24)).

Uuritava aine kvantitatiivse sisalduse määramiseks katselahustes ja bioloogilises materjalis peaks olema kättesaadav teadaoleva mõõtetäpsusega, kordustäpsusega ja tundlikkusega asjakohane meetod koos üksikasjaliku kirjeldusega proovi ettevalmistamise ja säilitamise kohta. Samuti peaks olema teada uuritava aine analüütiline määramispiir vees ja kalakudedes. Radioaktiivselt märgistatud uuritava aine kasutamise korral peaks see olema võimalikult puhas (soovitatavalt puhtusega > 98 %) ja peaks olema teada lisanditega seotud radioaktiivsuse protsentuaalne osakaal.

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused:

veetemperatuuri varieeruvus on väiksem kui  $\pm 2$  °C, kuna suured kõrvalekalded võivad mõjutada omastamise ja puhastumise puhul olulisi bioloogilisi parameetreid ning põhjustada loomadele stressi;

lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % küllastuskontsentratsioonist;

uuritava aine kontsentratsiooni hoitakse omastamisetapi vältel kambrites vahemikus  $\pm 20$  % mõõtmistulemuste keskväärtest;

uuritava aine sisaldus on väiksem kui selle lahustuvus vees; seejuures võetakse arvesse katses kasutatava vee võimalikku mõju tegelikule lahustuvusele <sup>(1)</sup>

suremus või kahjuliku mõju või haiguse osakaal kontroll- ja katserühma kalade hulgas on katse lõpus väiksem kui 10 %; kui katset pikendatakse mitme nädala või kuu võrra, peaks suremus või kahjuliku mõju osakaal kummaski kalade rühmas olema väiksem kui 5 % kuus ja kokku maksimaalselt 30 %. Oluline erinevus katserühma(de)st ja kontrollrühmast analüüsimiseks võetud kalade kasvukiiruses võib viidata uuritava aine mürgisele toimele.

**VÕRDLUSAINED**

Teadaoleva biokontsenteerumise määraga ja aeglaselt metaboliseeruvate võrdlusainete kasutamine hõlbustab katsemetodi kontrollimist, kui see on nõutav (näiteks kui laboris ei ole sellist katset varem läbi viidud või kui katsetingimused on muutunud).

<sup>(1)</sup> Mitut koostisosa sisaldava aine, UVCB või segu puhul tuleks sobivate kokkupuutekontsentratsioonide kindlaksmääramisel lähtuda iga asjakohase koostisosa lahustuvusest vees.

▼ **M7****MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

Tuleks jälgida, et katseadmete mis tahes osade puhul ei kasutata materjale, mis võivad lahustuda, sorbeerida või leostuda ning avaldada kaladele kahjulikku mõju. Võib kasutada keemiliselt inertset materjalist standardseid riskülikukujulisi või silindrikujulisi mahuteid, mille mahutavus on kooskõlas biomassisaldusega (vt punkt 43). Pehmeid plasttorusid tuleks kasutada võimalikult vähe. Kasutada tuleks polütetrafluoroetüleenist, roostevabast terasest ja/või klaasist torusid. Kogemustest nähtub, et suure adsorptsiooniteguriga ainete, näiteks sünteetiliste püretroidide puhul võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellisel juhul tuleks seadmed pärast kasutamist ära visata. Enne katseorganismide viimist katseüsteemi on soovitatav lasta süsteemil puutuda kokku katse kasutatavatel kontsentratsioonidel esineva uuritava ainega nii kaua, kui on vaja kokku puutekontsentratsioonide püsivuse tõendamiseks.

**Vesi**

Üldjuhul kasutatakse katse looduslikku vett, mis peaks pärinema saastumata ja ühtlase kvaliteediga allikast. Püsiva ühtlase kvaliteedi tagamiseks võib siiski olla otstarbekam kasutada taastatud vett (st demineraliseeritud vett, millele on lisatud teadaolev kogus teatud kindlaid toitaineid). Lahjendusvesi – st vesi, millesse segatakse uuritav aine enne katsenõusse viimist (vt punkt 30) – peaks olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab valitud liigi kaladel kohanemis- ja katseperioodi vältel ellu jääda, ilma et neil täheldataks mingeid ebanormaalse välimuse või käitumise ilminguid. Ideaaljuhul tuleks tõendada, et katse kasutatava liigi kalad jäävad lahjendusvees ellu, kasvavad ja paljunevad (näiteks laborikultuuris või elutsükli hõlmavas mürgisuskatse). Lahjendusvee kohta peaks teada olema vähemalt selle pH, karedus, tahkete osakeste üldsisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus ( ) ning soovitatavalt ka ammooniumisisaldus, nitritisisaldus ja mere- liikide puhul soolsus. Kalade heaolu seisukohalt olulised parameetrid ei ole lõpuni teada, kuid 2. liites on esitatud mitme koostisaine soovitatav maksimum- kontsentratsioon mageda ja soolase katsevee puhul.

Lahjendusvesi peaks olema katseperioodi kestel püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema katse alguses vahemikus 6,0–8,5 ning ei tohiks konkreetse katse ajal varieeruda rohkem kui  $\pm 0,5$  ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava ainega komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju kalade seisundile, tuleks kindlate ajavahemike järel, ent vähemalt katse alguses ja lõpus võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib neid määramisi teha harvem (nt iga kuue kuu järel).

Lahjendusvee looduslik tahkete osakeste sisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks olema võimalikult väike, et hoida ära uuritava aine adsorbeerumist orgaanilisele ainele, kuna see võib vähendada uuritava aine biosaadavust ja põhjustada BCFi väärtuse alahindamist. Vastuvõetav tahkete osakeste maksimumsisaldus on 5 mg/l (kuivaine, mis ei läbi 0,45 µm filtrit) ja orgaanilise

( ) Orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC) hõlmab nii tahketes osakestes esinevat orgaanilist süsinikku (POC) kui ka lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC), st  $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$ .

▼ **M7**

süsiniku üldsisaldus 2 mg/l (vt 2. liide). Vajaduse korral tuleks lahjendusvett enne kasutamist filtrida. Katsealuste kalade (väljaheited) ja toidujääkide põhjustatud orgaanilise süsiniku sisalduse suurenemine peaks olema võimalikult väike (vt punkt 46).

**Katselahused**

Valmistatakse uuritava aine sobiva kontsentratsiooniga põhilahus. Põhilahus tuleks soovitatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamise lahjendusvees. Teise võimalusena on mõnel juhul asjakohane kasutada tahkest faasist desorbeerumisel põhinevat doseerimissüsteemi. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamine ei ole üldjuhul soovitatav (vt viide 25); sellise aine kasutamine sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks võib siiski olla vastu võetav, kuid tuleks tagada, et seda kasutatakse võimalikult väikeses koguses ning ei ületata kriitilist mitsellitekke kontsentratsiooni (kui see on asjakohane). Lahustina võib kasutada atsetooni, etanooli, metanooli, dimetüülformamiidi ja trietüleenglükooli; dispergeeriva ainena on kasutatud Tween 80, metüülselluloosi kontsentratsioonis 0,01 % ja HCO-40. Lahusti kontsentratsioon lõplikus katsekeskkonnas peaks olema kõikides uuritava ainega rühmades sama (st uuritava aine kontsentratsioonist sõltumatu) ning ei tohiks ületada asjaomase lahusti puhul konkreetsetes katsetingimustes määratud mürgisusläve. Suurim lubatud sisaldus on 100 mg/l (või 0,1 ml/l). On ebatõenäoline, et kontsentratsioonis 100 mg/l esinev lahusti muudab oluliselt katsekeskkonnas saavutatavat uuritava aine lahustuvust (25). Lahustist ja uuritavast ainest tulenev muutus katse kasutatavas vees esineva orgaanilise süsiniku üldsisalduses peaks olema teada. Orgaanilise süsiniku üldsisaldus ei tohiks katsenõudes kogu katse kestel ületada uuritavast ainest ja lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral<sup>(1)</sup> sellisest ainest pärineva orgaanilise süsiniku sisaldust rohkem kui 10 mg/l ( $\pm 20\%$ ) võrra. Orgaanilise aine sisaldus võib kaladega tehtavas läbivoolukatses oluliselt mõjutada lahuses vabalt esineva uuritava aine kogust, eelkõige väga lipofiilsete ainete puhul. Tahke faasi abil mikroekstraheerimine (vt punkt 60) võib anda olulist teavet ühendi seondunud fraktsiooni ja lahuses vabalt esineva fraktsiooni suhtarvu kohta; lahuses vabalt esinevat fraktsiooni käsitletakse biosaadava fraktsioonina. Uuritava aine sisaldus peaks lahusti või dispergeeriva aine kasutamisest olenemata olema väiksem kui uuritava aine lahustuvus katsekeskkonnas. Kergesti biolagundatavate lahustite kasutamisel tuleks olla ettevaatlik, kuna need võivad läbivoolukatses põhjustada bakterite kasvuga seotud probleeme. Kui põhilahuse valmistamine ilma lahusti või dispergeeriva aineta ei ole võimalik, tuleks kaaluda veekaudse kokkupuute katse asjakohasust toidukaudse kokkupuute katsega võrreldes.

Läbivoolukatsete puhul on katsekambrites rea eri kontsentratsioonide tekitamiseks vaja kasutada süsteemi, kus uuritava aine põhilahust lisatakse ja lahjendatakse pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme või küllastamissüsteemiga), või tahkest faasist desorbeerumisel põhinevat doseerimissüsteemi. Igas katsekambris olev lahus peaks soovitatavalt vahetuma päevas vähemalt viiekordses mahus. Soovitatakse kasutada läbivoolurežiimi, kuid kui see ei ole võimalik (näiteks kui see mõjub katseorganismidele kahjulikult), võib kasutada poolstaatilist meetodit, eeldusel, et nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud (vt punkt 24). Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleks kontrollida 48 tundi enne katset ja seejärel katse vältel vähemalt kord päevas. Kõnealuse kontrollimise käigus määratakse igas katsekambris ka seda läbiva lahuse voolukiirus ja veendutakse, et see ei varieeru ühes katsekambris ja katsekambrite vahel rohkem kui 20 %.

<sup>(1)</sup> Ehkki lahusti või dispergeeriva aine kasutamine ei ole üldiselt soovitatav, tuleks sellise aine kasutamisel lisada sellest pärineva orgaanilise süsiniku kogus uuritavast ainest pärineva orgaanilise süsiniku kogusele, et hinnata orgaanilise süsiniku sisaldust katsenõudes.

▼ **M7****Liigi valimine**

Liigi valimisel on olulised kriteeriumid kättesaadavus, sobiv suurus ja võimalus kalu laboritingimustes rahuldavalt pidada. Muud kriteeriumid kalaliigi valimisel on muuhulgas liigi tähtsus majanduslikust, ökoloogilisest ja vaba aja veetmise seisukohast, samuti võrdluseks sobiv tundlikkus, varasemad eduka kasutamise kogemused jne. Soovitavad katseliigid on esitatud 3. liites. Võib kasutada ka muid liike, kuid selleks võib olla vaja kohandada katsemenetlust, et luua sobivad katsetingimused. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada. Üldiselt lühendab väiksema kalaliigi kasutamine statsionaarse oleku saavutamise aega, kuid lipiidisisalduse ja uuritava aine sisalduse nõuetekohaseks analüüsimeks kalades võib olla vaja rohkem kalu (proove). Peale selle on võimalik, et eri katsetes ja eri liikidega saadud tulemuste võrdlemist raskendavad erinevused noorte ja vanemate kalade hingamiskiiruses ja metabolismis. Tuleks silmas pidada, et kui katse tehakse kalade arengujärgus, kus kasv on kiire (noorjark), võib see raskendada andmete tõlgendamist.

**Kalade pidamine (nii veekaudse kui ka toidukaudse kokkupuute jaoks)**

Kalade lähtepopulatsioonil tuleks lasta kohaneda vähemalt kaks nädalat katsetemperatuuril olevas vees (vt punkt 28) ja neile tuleks anda kogu selle aja vältel piisavalt sööta (vt punkt 45). Vesi ja sööt peavad olema sama tüüpi kui katses kasutatavad vesi ja sööt.

Pärast 48 tunni pikkust harjumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

- kui suurem on populatsioonis seitsme päeva jooksul suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale;
- kui suurem populatsioonis on seitsme päeva jooksul 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suurem suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale;
- kui suurem populatsioonis on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.

Katses kasutatavatel kaladel ei tohi esineda nähtavaid haigusi ega kõrvalekaldeid. Kõik haiged kalad tuleks kõrvale jätta. Katsele eelneva kahe nädala vältel ja katse ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

**KATSE KÄIK****Eelkatse**

Katse tingimuste optimeerimiseks võib olla kasulik teha eelkatse, et valida näiteks uuritava aine kontsentratsioon(id) ning omastamisetapi ja puhastamisetapi kestus või teha kindlaks, kas katse tegemine täismahus on vajalik. Eelkatse plaan peaks võimaldama saada eelkatsest vajalikud andmed. Võib kaaluda, kas BCFi leidmiseks võib piisata miinimumkatsest või on vaja teha täismahus uuring (miinimumkatse kohta vt punktid 83–95).

**Kokkupuutetingimused***Omastamisetapi kestus*

Omastamisetapi eeldatava kestuse võib leida lähtuvalt praktilisest kogemusest (nt varasema uuringu või struktuurilt sarnase ainega tehtud akumulatsioonikatse põhjal) või teatud kindlatest empiirilistest seostest, mis põhinevad uuritava aine teadaoleval vees lahustuvuse või süsteemis oktanool/vesi täheldataval jaotuskoeffitsiendil (eeldusel, et omastamine toimub vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale; vt 5. liide).

▼ **M7**

Omastamisetaap peaks vältama 28 päeva, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et statsionaarne olek saavutatakse varem (mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites). Kõveral, mis väljendab kalades sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni ( $C_f$ ) sõltuvust ajast, saavutatakse statsionaarne olek siis, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevaste intervallidega võetud kolmes järjestikuses proovis mõõdetud  $C_f$  väärtused ei erine üksteisest rohkem kui  $\pm 20\%$  ning esimese ja viimase järjestikuse analüüsi vahelisel perioodil ei täheldata  $C_f$  olulist suurenemist. Koondproovide analüüsimise puhul on vaja teha vähemalt neli järjestikust analüüsi. Aeglaselt omastatavate ainete puhul on sobivam intervall seitse päeva. Kui 28 päeva jooksul ei saavutata statsionaarset olekut, kasutatakse BCFi arvutamiseks üksnes kineetilist lähenemisviisi, mille puhul ei eeldata statsionaarse oleku saavutamist, või pikendatakse omastamisetaapi kestust ja tehakse täiendavaid mõõtmisi kuni statsionaarse oleku saavutamiseni või 60 päeva vältel, olenevalt sellest, kumb periood on lühem. Samuti peab uuritava aine sisaldus kalas olema omastamisetaapi lõpus piisavalt suur, et võimaldada usaldusväärselt hinnata  $k_2$  väärtust puhastamisetaapis. Kui 28 päeva jooksul ei täheldata aine olulisel määral omastamist, võib katse lõpetada.

*Puhastumisetaapi kestus*

Ainete puhul, mida saab kirjeldada esimest järku reaktsiooni kineetika abil, piisab aine sisalduse sobivaks vähenemiseks organismis (nt 95 % võrra) tavaliselt ajavahemikust, mis on poole lühem kui omastamisetaap (seda hinnangut on selgitatud 5. liites). Kui 95 % suuruse kao saavutamiseks vajalik ajavahemik on ebamõistlikult pikk ja ületab näiteks kaks korda omastamisetaapi tavapärase kestuse (st on üle 56 päeva), võib kasutada lühemat perioodi (nt perioodi, mille lõpus on uuritava aine sisaldus alla 10 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest). Ainete puhul, mille omastamise ja millest puhastamise mudel on keerukam kui esimest järku reaktsiooni kineetikaga kirjeldatav üheosalise kala mudel, võib olla vaja kasutada pikemat puhastumisperioodi. Kui täheldatakse ja/või eeldatakse vastavust sellisele keerukale mudelile, soovitatakse kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi, et tagada koostatava katseplaani sobivus. Puhastumisetaapi pikendamise korral võib proovivõtmiseks kasutatavate kalade arv osutuda piiravaks teguriks ja tulemusi võivad mõjutada kaladevahelised kasvuerinevused. Puhastumisetaapi kestust mõjutab ka see, millise ajavahemiku jooksul on uuritava aine sisaldus kalas suurem kui aine analüütiline määramispiir.

*Katsealuste kalade arv*

Kalade arv katsekontsentratsiooni kohta valitakse nii, et igas proovivõtupunktis on võimalik võtta vähemalt neljast kalast koosnev proov. Kalad tuleks koondproovi koondada üksnes juhul, kui üksikute kalade analüüs ei ole teostatav. Kui kõvera lähendamisel (ja selle põhjal arvutatud parameetrite puhul) soovitakse saavutada suuremat täpsust või kui on vaja läbi viia metabolismiuuringud (näiteks lähteaine ja metaboliitide eristamiseks radioaktiivselt märgistatud uuritava aine puhul), peab kalade arv proovivõtupunkti kohta olema suurem. Lipiidisisaldus tuleks määrata samast bioloogilisest materjalist, mida kasutatakse uuritava aine sisalduse määramiseks. Kui see ei ole teostatav, võib olla vaja rohkem kalu (vt punktid 56 ja 57).

Kui kasutatakse täiskasvanud (st suguküpsed) kalu, ei tohiks need olla enne katset jõudnud kudemisetaapi või hiljuti kudenud ega teha seda katse vältel. Ühtlasi tuleks märkida, kas katses kasutatakse isas- või emaskalu või kummastki soost kalu. Kummastki soost kalade kasutamise korral tuleks tagada, et dokumenteeritud sugudevahelised erinevused kasvus ja lipiidisisalduses on ebaolulised, eriti juhul, kui isas- ja emaskalad on eeldatavalt vaja koondada ühte proovi, et võimaldada aine ja/või lipiidisisalduse määramist.

▼ **M7**

Iga katse jaoks valitakse sarnase kehamassiga kalad, nii et kõige väiksemate kalade mass oleks vähemalt kaks kolmandikku kõige suuremate kalade massist. Kõik kalad peaksid olema ühevanused ja pärinema ühest allikast. Kuna kalade mass ja vanus võivad BCFi väärtust oluliselt mõjutada (12), tuleks sellekohased üksikasjad täpselt registreerida. Soovitavalt tuleks vahetult enne katse alustamist mõõta kalaparvest võetud osaproovi mass, et hinnata kalade keskmist massi (vt punkt 61).

*Biomassisisaldus*

Tuleks kasutada suurt veekogust ühe kala kohta, et katse alguses kalade lisamisest tingitud uuritava aine sisalduse vähenemine vees oleks minimaalne ja et hoida ära lahustunud hapniku sisalduse vähenemist. On oluline jälgida, et biomassisisaldus oleks katses kasutatava liigi jaoks sobiv. Kõikidel tavapärastel juhtudel on soovituslik lisatav kalade kogus 0,1–1,0 g (märgmass) liitri vee kohta päevas. Kui uuritava aine sisaldust on võimalik hoida vahemikus  $\pm 20\%$  nõutavast sisaldusest ja lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % küllastuskontsentratsioonist, võib kasutada ka suuremat biomassisisaldust (vt punkt 24).

Sobiva biomassisisalduse valimisel võetakse arvesse asjaomase kalaliigi tavapärast elupaika. Näiteks võivad veekogu põhjas elavad kalad vajada sama veekoguse juures suuremat akvaariumi põhjapinda kui pelaagilised liigid.

*Söötmine*

Kohanemis- ja katseperioodi vältel antakse kaladele sobivat teadaoleva lipiidisisalduse ja valkude üldsisaldusega sööta piisavas koguses, et hoida neid tervena ja säilitada nende kehamassi (teatav kasv on lubatud). Kaladele antakse kohanemis- ja katseperioodi jooksul sööta iga päev kindlaksmääratud koguses, mis sõltub kasutatavast liigist, katsetingimustest ja sööda kalorsusest (näiteks vikerforelli puhul umbes 1–2 % kehamassist päevas). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Söötmissaara samal tasemel hoidmiseks tuleks sööda kogus sobiva sagedusega, näiteks kord nädalas ümber arvutada. Sellise arvutuse jaoks võib kalade massi igas katsekambris hinnata asjaomasesest kambrist viimati võetud proovis mõõdetud kalade massi põhjal. Kambrisse jäänud kalu ei kaaluta.

Toidujäägid ja väljaheidet tuleks sifooni abil kõrvaldada katsekambrist iga päev varsti pärast söötmist (30 minuti kuni ühe tunni möödudes). Kambreid tuleks hoida kogu katse vältel võimalikult puhtana, et orgaanilise aine sisaldus oleks võimalikult väike (vt punkt 29), kuna orgaaniline süsinik võib piirata uuritava aine biosaadavust (12).

Kuna sööt valmistatakse tihti kalajahust, tuleks tagada, et sööt ei mõjuta katsetulemusi ega avalda kahjulikku mõju, näiteks tingituna selles sisalduvatest pestitsiidijääkidest, raskmetallidest ja/või uuritavast ainest.

*Valgus ja temperatuur*

Soovitav valgustusperiood on 12–16 tundi ja veetemperatuur ( $\pm 2\text{ °C}$ ) peaks olema katseliigi jaoks sobiv (vt 3. liide). Kasutatava valguse liik ja omadused peaksid olema teada. Tuleks olla ettevaatlik, et hoida ära uuritava aine võimalikku fotokeemilist muundumist katses kasutatavates valgustustingimustes. Tuleks kasutada sobivat valgusallikat, mille puhul hoitakse ära kalade kokkupuude mittemuunduslike fotokeemilise muundumise saadustega. Mõnel juhul võib olla asjakohane kasutada filtrit, mis peab kinni ultraviolettkiirguse lainepikkusega alla 290 nm.

▼ **M7***Katsekonsentratsioonid*

Käesolev katsemeetod töötati algselt välja mittepolaarsete orgaaniliste ainete jaoks. Selliste ainete puhul eeldatakse, et kalade kokkupuute hindamiseks piisab ühest kontsentratsioonist, kuna kontsentratsioonist sõltuvus eeldatavalt puudub; asjaomase õigusraamistikuga võidakse siiski ette näha aine kasutamine kahel kontsentratsioonil. Muud liiki ainete uurimisel või juhul, kui on teada võimalikule kontsentratsioonist sõltuvusele viitavad asjaolud, tuleks katses kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Kui kasutatakse ainult ühte kontsentratsiooni, tuleks esitada selle kohta põhjendus (vt punkt 79). Samuti peaks katses kasutatav kontsentratsioon olema nii väike, kui on mõistlik ja tehniliselt võimalik (st mitte väga lähedal lahustuvust iseloomustavale kontsentratsioonile).

Mõnel juhul võib eeldada, et aine biokontsenteerumine sõltub aine sisaldusest vees (nt metallide puhul, mille omastamine kalades võib olla vähemalt osaliselt kontrollitud). Sellisel juhul on vaja kasutada katses vähemalt kahte, kuid soovitatavalt suuremat arvu keskkonna seisukohast asjakohaseid kontsentratsioone (vt punkt 49). Ainete puhul, mille kontsentratsioonid katses peavad praktilistel põhjustel olema lahustuvust iseloomustava kontsentratsiooni lähedal, on samuti soovitatav kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni, kuna see võib anda teavet kokkupuutekontsentratsioonide usaldusväärsuse kohta. Valitud katsekonsentratsioonid peaksid hõlmama keskkonnas reaalselt esineda võivat kontsentratsiooni ja konkreetse hindamise puhul asjakohast kontsentratsiooni.

Uuritava aine kontsentratsioon(id) tuleks valida nii, et see või need oleks(id) allpool aine kroonilise mõju avaldumise taset või alla 1 % akuutse mõju asümptootilise LC<sub>50</sub> väärtusest, keskkonna seisukohast asjakohases vahemikus ja vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem(ad) kui kasutatava analüüsimeetodiga saavutatav aine määramispiir vees. Suurima lubatud katsekonsentratsiooni saab kindlaks teha ka nii, et aine 96 tunni jooksul avalduva akuutse mõju LC<sub>50</sub> jagatakse akuutse ja kroonilise mõju suhet väljendava asjaomase suhtarvuga (näiteks on see suhtarv mõne aine puhul umbes kolm, ent mõne üksiku aine puhul üle 100). Kahe kontsentratsiooni kasutamise korral peaksid need erinema teineteisest 10 korda. Kui mürgisuse kriteerium (mis seab piirid suuremale katsekonsentratsioonile) ja analüütiline määramispiir (mis seab piirid väiksemale katsekonsentratsioonile) seda ei võimalda, võib erinevus olla väiksem ning tuleks kaaluda võimalikult puhta (soovitatavalt puhtusega > 98 %) radioaktiivselt märgistatud uuritava aine kasutamist. Tuleks jälgida, et ühegi kasutatava kontsentratsiooni puhul ei ületataks uuritava aine lahustuvust katsekeskkonnas.

*Kontrollid*

Peale uuritava ainega rühma(de) tuleks vastavalt vajadusele (vt punktid 30 ja 31) kasutada ühte lahendusveega kontrolli või ühte lahustiga kontrolli.

**Vee kvaliteediga seotud mõõtmiste sagedus**

Katse ajal tuleks kõikides katse- ja kontrollnõudes mõõta lahustunud hapniku sisaldust, orgaanilise süsiniku üldsisaldust, pH-d ja temperatuuri. Üldkaredust ja vajaduse korral soolsust tuleks mõõta kontrollnõu(de)s ja ühes katsenõus. Kahe või enama kontsentratsiooni kasutamise korral mõõdetakse nimetatud näitajaid suuremal (või suurimal) kontsentratsioonil. Lahustunud hapnikku ja vajaduse korral soolsust tuleks mõõta omastamisperioodi jooksul vähemalt kolm korda – perioodi alguses, keskel ja lõpus – ning puhastumisperioodi jooksul vähemalt kord nädalas. Orgaanilise süsiniku üldsisaldust tuleks mõõta katse alguses (24 tundi ja 48 tundi enne omastamisetapi algust), enne kalade lisamist ning omastamis- ja puhastumisetapi vältel kord nädalas. Temperatuuri mõõtmine ja registreerimine peaks toimuma iga päev, pH mõõtmine iga perioodi alguses ja lõpus ning kareduse mõõtmine üks kord igas katses. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.



▼ **M7****Kala- ja veeproovide võtmine ja analüüs***Kala- ja veeproovide võtmise ajakava*

Katsekambritest tuleks uuritava aine sisalduse määramiseks võtta veeproov enne kalade lisamist ning omastamis- ja puhastumisetapi kestel. Veeproov tuleks võtta enne söötmist, kalaprooviga samaaegselt. Proove võib olla kasulik võtta sagedamini, et veenduda kontsentratsiooni püsivuses pärast kalade lisamist. Omastamisetapi ajal tuleks määrata uuritava aine kontsentratsioon, et kontrollida vastavust nõuetekohasuse kriteeriumidele (punkt 24). Kui puhastumisetapi alguses võetud proovide analüüsimisel ei tuvastata uuritavat ainet, võib sellisest põhjendusest lähtuvalt jätta uuritava aine puhastumisetapi jooksul edaspidi katse- ja kontrollrühma vees määramata.

Kalaproove tuleks uuritava aine määramiseks võtta omastamisetapis vähemalt viiel korral ja puhastumisetapis vähemalt neljal korral. Kuna mõnel juhul on sellise arvu proovide põhjal keeruline arvutada BCFi hinnangulist väärtust rahuldava täpsusega, eriti kui tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikale vastava omastamise ja puhastumisega, võib olla soovitatav võtta kummagi perioodi vältel proove suurema sagedusega (vt 4. liide).

Lipiidisaldus tuleks määrata vähemalt omastamisetapi alguses ja lõpus ning puhastumisetapi lõpus samast bioloogilisest materjalist, mida kasutatakse uuritava aine sisalduse määramiseks. Kui see ei ole teostatav, tuleks kõigil kolmel nimeetatud ajahetkel võtta lipiidisalduse määramiseks vähemalt kolmest muust kalast koosnev proov. Kalade arvu katsenõu kohta tuleks katse alguses sellele vastavalt suurendada <sup>(1)</sup>. Teise võimalusena võib juhul, kui kontrollina kasutatavates kalades (st lähtepopulatsiooni kalades) ei tuvastata märkimisväärset koguses uuritavat ainet, määrata katse ajal kontrollrühma kalades üksnes lipiidisalduse ja korrigeerida katserühma(de) kalades määratud uuritava aine sisaldust (ja sellest lähtuvalt omastamise kiiruskonstandi, puhastamise kiiruskonstandi ja BCFi väärtust) vastavalt katse vältel täheldatud muutustele kontrollrühma kalade lipiidisalduses <sup>(2)</sup>.

Surmud ja haigeid kalu ei tohiks uuritava aine sisalduse ega lipiidisalduse suhtes analüüsida.

Vastuvõetava proovivõtukava näide on esitatud 4. liites. Teistsuguse ajakava võib hõlpsalt koostada lähtuvalt  $K_{OW}$  teistsugusest eeldatavast väärtusest, mille põhjal arvutatakse kokkupuuteperioodi pikkus, mis on vajalik aine omastamiseks 95 % ulatuses (arvutuskäik on esitatud 5. liites).

Proovivõtmist tuleks omastamisetapi vältel jätkata seni, kuni saavutatakse statsionaarne olek (mõisted ja ühikud on esitatud 1. liites) või kuni omastamisetapp loetakse muul põhjusel lõppenuks (pärast 28 või 60 päeva möödumist; vt punktid 37 ja 38). Enne puhastumisetapi algust tuleks kalad üle viia puhastesse nõudesse.

*Proovivõtmine ja proovi ettevalmistamine*

Analüüsitava veeproov tuleks võtta näiteks inertsest materjalist sifoontoruga katsekambri keskosast. Uuritava aine biosaadavat fraktsiooni ei pruugi alati olla võimalik filtrimise või tsentrifugimise teel mittebiosaadavast fraktsioonist eraldada. Biosaadavusega seotud raskustest tulenevalt tuleks eraldamise meetodi kasutamise korral esitada katseprotokollis alati asjaomase meetodi kasutamise põhjendus või meetodi valideerimisandmed (25). Proovide sel viisil töötlemisest tuleks hoiduda, eriti väga hüdrofoobsete ainete puhul (st ainete puhul, mille log

<sup>(1)</sup> Kui lipiidisalduse ja uuritava aine sisalduse määramiseks ei kasutata sama kala, peavad asjaomased kalad olema vähemalt sarnase kehamassiga ja vajaduse korral samast soost.

<sup>(2)</sup> Seda võimalust on lubatud kasutada üksnes juhul, kui kõik katses kasutatavad rühmad on sarnase suurusega ning kalad eemaldatakse ja neid söödetakse sama režiimi alusel. Sellega tagatakse, et kalade kasv on kõikides rühmades sarnane, kui katses kasutatav kontsentratsioon on mürgisuse avaldumise kontsentratsioonist väiksem. Sarnase kasvu korral on ka lipiidisaldus eeldatavalt sarnane. Kasvuerinevus kontrollrühmas viitab aine mõjule ja muudab katse kehtetuks.

▼ **M7**

$K_{ow} > 5$ ) (12, 26), mis võivad filtrile või tsentrifuuginõu seinale adsorbeeruda. Selle asemel tuleks võtta meetmed katsenõude võimalikult puhtana hoidmiseks (vt punkt 46) ja jälgida orgaanilise süsiniku üldsisaldust nii omastamis- kui ka puhastumisetapis (vt punkt 53). Biosaadavuse vähenemisest tingitud võimalike probleemide ärahoidmiseks võib raskesti lahustuvate ja väga hüdrofoobsete ainete puhul kasutada proovivõtmiseks tahke faasi abil mikroekstraheerimise meetodit.

Proovivõtmiseks valitud kalad surmatakse viivitamata kõige sobivamal ja humaansel viisil (terve kalaga tehtavate mõõtmiste jaoks ei tohiks teha muud kui kala veega loputada (vt punkt 28) ja paberiga kuivatada). Mõõdetakse kalade mass ja üldpikkus<sup>(1)</sup>. Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava aine sisaldusega (ja vajaduse korral lipiidisisaldusega), näiteks kordumatu tunnuskoodi abil.

Kalu ja vett soovitatakse analüüsida kohe pärast proovivõtmist, et hoida ära lagunemist ja muul viisil tekkivaid kadusid ning arvutada katse jätkudes ligikaudsed omastamise ja puhastamise kiiruskonstandid. Kohese analüüsiga hoitakse ära ka viivitus platoo (stационаarse oleku) saavutamise kindlakstegemisel.

Kui proove ei analüüsita kohe, tuleks kasutada sobivat meetodit nende säilitamiseks. Enne katse algust tuleks koguda teavet asjaomase uuritava aine jaoks sobiva säilitusmeetodi kohta – selleks võib olla näiteks sügavkülmutamine, säilitamine 4 °C juures, ekstraheerimine vms. Säilitamisaeg tuleks valida nii, et oleks välis- tatud aine lagunemine säilitamise ajal.

#### *Analüüsimeetodi kvaliteet*

Kuna uuritava aine määramiseks kasutatava analüüsimeetodi usaldusväärsus sõltub peamiselt meetodi mõõtetäpsusest, kordustäpsusest ja tundlikkusest, tuleb katseliselt kontrollida, kas aine analüüsi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava aine tuvastamise tõhusus vee- ja kalaproovides on asjaomase meetodi puhul rahuldavad. Seda tuleks teha eelkatsete raames. Peale selle kontrollitakse, et uuritav aine ei oleks tuvastatav lahjendusvees. Vajaduse korral korrigeeritakse katse käigus vees ja kalades mõõdetud uuritava aine kontsentratsiooni väärtusi lähtuvalt tuvastamise tõhususest ja kontrollrühmas määratud taustväärtustest. Kala- ja veeproove käsitsetakse kogu analüüsi vältel nii, et saastumine ja kaod (näiteks proovivõtuseadmele adsorbeerumise tõttu) oleksid võimalikult väikesed.

#### *Kalaproovide analüüs*

Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, on võimalik analüüsida üldradioaktiivsust (st lähteaine ja metaboliitide summaarset radioaktiivsust) või puhastada proovi nii, et lähteainet saab analüüsida eraldi. Kui BCFi arvutamisel soovitakse aluseks võtta lähteaine, tuleks iseloomustada ka peamisi metaboliite vähemalt omastamisetapi lõpus (vt punkt 6). Peamised metaboliidid on metaboliidid, mille osakaal ainejääkide üldsisaldusest kalakudedes on  $\geq 10\%$  või mille osakaal kahes järjestikus proovivõtupunktis on  $\geq 5\%$  või mille tase omastamisetapi jooksul tõuseb või mis on teadaolevalt mürgised. Kui radioaktiivselt märgistatud jääkide üldsisalduse põhjal terve kala kohta arvatud BCF on

<sup>(1)</sup> Peale massi tuleks registreerida ka üldpikkus, kuna katse vältel toimunud pikkuse suurenemise määrade võrdlemine annab hea ettekujutuse kahjuliku mõju esinemisest või puudumisest.

▼ **M7**

$\geq 500$ , võib olla kasulik peamised metaboliidid kindlaks teha ja kvantifitseerida; teatud liiki ainete, näiteks pestitsiidide puhul on see tungivalt soovitatav. Selliste metaboliitide kvantifitseerimist võivad nõuda mõned reguleerivad asutused. Kõikidest kalakudedes esinevatest radioaktiivselt märgistatud jääkidest  $\geq 10\%$  moodustavate lagunemissaaduste tuvastamise ja kvantifitseerimise korral on soovitatav tuvastada ja kvantifitseerida need ka katsevees. Kui see ei ole teostatav, tuleks katseprotokollis esitada sellekohane selgitus.

Uuritava aine sisaldus tuleks üldjuhul määrata igas kaalutud kalas eraldi. Kui see ei ole võimalik, võib proovid igal proovivõtmisel ühte koondada, ent kuna proovide koondamine piirab andmete analüüsimiseks sobivate statistikameetodite valikut, peaks katse kasutatavate kalade arv olema piisav, et võimaldada kasutada soovitud koondproove ja statistikameetodit ning saavutada soovitud statistiline võimsus. Asjakohastest proovide koondamise meetoditest ülevaate saamiseks võib kasutada viiteid 27 ja 28.

BCFi puhul tuleks peale katse otseselt saadud väärtuse esitada ka normaliseeritud väärtus, mille aluseks on võetud kala lipiidisisaldus 5 % (märgmassist) (vt punkt 21), välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas. Võimaluse korral tuleks kalade lipiidisisaldus määrata igas proovivõtupunktis, soovitatavalt samas ekstraktis, mida kasutatakse uuritava aine määramiseks, sest sageli tuleb lipiidid ekstraktist eemaldada, enne kui seda saab kromatograafiliselt analüüsida. Uuritava aine määramine nõuab siiski sageli spetsiifilise ekstraheerimismeetodi kasutamist, mis ei pruugi kokku sobida lipiidide määramiseks kasutatava meetodiga. Sellisel juhul soovitakse kuni sobiva mittepurustava instrumentaalanalüüsi meetodi kättesaadavaks muutmiseni kasutada kalade lipiidisisalduse määramiseks teistsugust strateegiat (vt punkt 56). Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada sobivat meetodit (20). Standardse meetodina võib soovitada kloroformi ja metanooliga ekstraheerimist (29, 30), teise võimalusena aga Smedesi meetodit (31). Viimati nimetatud meetodile on iseloomulik võrreldav ekstraheerimise tõhusus, suur täpsus ja vähem mürgiste orgaaniliste lahustite kasutamine ning seda on lihtne kasutada. Piisava põhjenduse esitamise korral võib kasutada ka muid meetodeid, mille täpsus on soovitatavate meetoditega võrreldes suurem. On oluline esitada kasutatud meetodi üksikasjalik kirjeldus.

*Kalade kasvu mõõtmine*

Katse alguses tuleb üksikhaaval määrata viie kuni kümne lähtepopulatsioonist pärit kala mass ja üldpikkus. Samu kalu võib kasutada ka lipiidisisalduse määramiseks (vt punkt 56). Igal proovivõtmisel kontrollrühmast ja katserühma(de)st valitud kalad tuleks enne uuritava aine või lipiidide sisalduse määramist kaaluda ja mõõta nende pikkus. Kõnealustel valitud kaladel mõõdetud väärtusi saab kasutada katse- ja kontrollrühmadesse jäänud kalade massi ja pikkuse hindamiseks (vt punkt 45).

**ANDMED JA ARUANDLUS****Andmete töötlemine**

Uuritava aine omastamise kõvera saamiseks tuleks graafikule kanda kalas või kala pinnal (või konkreetsetes kudedes) omastamisetapi käigus mõõdetud aine kontsentratsiooni sõltuvus ajast aritmeetilisel skaalal. Kui kõver on jõudnud platoole ehk muutunud ajatelje suhtes ligikaudu asümptootiliseks, tuleks stationaarse oleku BCF (BCF<sub>SS</sub>) arvutada järgmise valemiga:

$$\frac{C_f \text{ stationaarses olekus (keskmine)}}{C_w \text{ stationaarses olekus (keskmine)}}$$

▼ **M7**

$C_f$  muutumist mõjutab kalade kasv (vt punktid 72 ja 73). Keskmise kokkupuutekontsentratsiooni ( $C_w$ ) väärtus sõltub kontsentratsiooni varieeruvusest. Võib eeldada, et bioakumuleerumise katsete puhul on asjakohasem ja täpsem ajaga kaalutud keskmise kontsentratsioon, seda ka juhul, kui varieeruvus jääb asjakohasesse nõutavasse vahemikku (vt punkt 24). Ajaga kaalutud keskmise kontsentratsiooni vees võib arvutada vastavalt 5. liite jaotisele 1.

Kineetiline biokontsentratsioonitegur ( $BCF_K$ ) tuleks leida kahe esimest järku reaktsiooni kiiruskonstandi  $k_1$  ja  $k_2$  suhtarvuna. Kiiruskonstantide  $k_1$  ja  $k_2$  ning  $BCF_K$  arutamiseks võib kasutada mudeli üheaegset sobitamist omastamis- ja puhastumisetapi andmetega. Teise võimalusena võib  $k_1$  ja  $k_2$  leida üksteise järel (nende meetodite kirjeldus ja võrdlus on esitatud 5. liites). Puhastumise kiiruskonstanti ( $k_2$ ) võib olla vaja korrigeerida, et võtta arvesse kasvust tingitud lahjenemist (vt punktid 72 ja 73). Kui omastamiskõver ja/või puhastumiskõver ei vasta ilmselgelt esimest järku reaktsioonile, tuleks rakendada keerukamaid mudeleid (vt viited 5. liites) ning kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

#### *Kalade massi- ja pikkuse andmed*

Iga kala märgmass ja üldpikkus kõikides proovivõtupunktides omastamisetapi vältel (sealhulgas lähtepopulatsiooni andmed omastamisetapi alguses) ja puhastumisetapi vältel kantakse tabelisse kontrollrühma ja katserühma(de) puhul eraldi. Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava aine sisaldusega, näiteks kordumatu tunnuskoodi abil. Kineetilise  $BCF_i$  väärtuse korrigeerimisel kasvust tingitud lahjenemise suhtes on soovitatav kasutada kasvunäitajana massi (meetodit, mida kasutatakse andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes, on kirjeldatud punktis 73 ja 5. liites).

#### *Korrigeerimine kasvust tingitud lahjenemise suhtes ja normaliseerimine lipiidisisalduse suhtes*

Kalade kasv puhastumisetapi jooksul võib vähendada kalades mõõdetud aine sisaldust, mistõttu puhastumise üldise kiiruskonstandi ( $k_2$ ) väärtus võib olla suurem kui väärtus, mis tuleneb üksnes aine kõrvaldamisest (nt hingamise, metabolismi ja roojamise käigus). Kineetilist biokontsentratsioonitegurit tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes. Kasv mõjutab ka  $BCF_{SS}$ -i väärtust, kuid  $BCF_{SS}$ -i korrigeerimiseks kasvu suhtes puudub kokkulepitud metoodika. Märkimisväärse kasvu korral tuleks leida ka kasvu suhtes korrigeeritud  $BCF_K$  ( $BCF_{K_g}$ ), kuna see võib olla biokontsentratsioonitegurina asjakohasem. Katsealuste kalade lipiidisisaldus (millel on tugev seos hüdrofoobsete ainete bioakumuleerumisega) võib praktikas nii palju varieeruda, et nii kineetilise kui ka statsionaarset olekut iseloomustava biokontsentratsiooniteguri mõtestatud väärtuse leidmiseks on vaja läbi viia normaliseerimine, mille aluseks on võetud teatud kindel kala lipiidisisaldus (5 massiprotsenti), välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas (näiteks võib mõni perfluoritud aine seonduda valkudega). Selliste arvutuste jaoks kasutatavad võrrandid ja asjakohased näited on esitatud 5. liites.

Kineetilise  $BCF_i$  korrigeerimiseks kasvust tuleneva lahjenemise suhtes tuleks kasvu suhtes korrigeerida puhastumise kiiruskonstanti. Kõnealuse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi  $k_{2_g}$  arutamiseks lahutatakse üldisest puhastumise kiiruskonstandist  $k_2$  kasvu kiiruskonstant  $k_g$ , mis on leitud mõõdetud kehamassi põhjal. Seejärel jagatakse omastamise kiiruskonstant  $k_1$  kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandiga  $k_{2_g}$  (vt 5. liide), et leida kasvu suhtes korrigeeritud biokontsentratsioonitegur. Mõnel juhul on sellise lähenemisviisi kasutamine raskendatud. Näiteks võib arvutatud  $k_{2_g}$  ainete puhul, millest puhastumine on väga aeglane ja mida analüüsitakse kiirelt kasvavatel kaladel, olla väga väike ja selle leidmiseks kasutatud kahe kiiruskonstandiga seotud viiga muutub

▼ **M7**

väga oluliseks, ning mõnel juhul võib  $k_g$  hinnanguline väärtus olla suurem kui  $k_2$  väärtus. Teise lähenemisviisina, mis ei nõua korrigeerimist kasvust tingitud lahjenemise suhtes, kasutatakse puhastumisandmetena mitte tavapäraselt uuritava aine massi kala massiühiku kohta (kontsentratsioon), vaid uuritava aine massi kala kohta (terve kala alusel). See peaks olema hõlpsalt teostatav, kuna käesoleva katsemeetodi kohaste katsete puhul peaks aine registreeritud sisaldus iga üksiku kala kudedes olema seostatav asjaomase kala massiga. Lihtsat meetodit selle lähenemisviisi kasutamiseks on tutvustatud 5. liites. Tuleb meeles pidada, et ka kõnealuse alternatiivse lähenemisviisi puhul tuleks esitada  $k_2$  väärtus.

Samuti tuleks kineetilise ja statsionaarse oleku iseloomustava biokontsentratsiooniteguri väärtus esitada lähtuvalt standardsest kala lipiidisisaldusest 5 massiprotsenti, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas. Kalas esineva kontsentratsiooni andmed ja BCF normaliseeritakse suhtarvu põhjal, mis saadakse 5 % jagamisel tegeliku keskmise (või konkreetsel kala mõõdetud) lipiidisisaldusega (protsentides märgmassist) (vt 5. liide).

Kui aine ja lipiidide sisaldus on määratud samal kalal, tuleks lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCFi arvutamiseks kasutada konkreetse asjaomase kala lipiidisisalduse alusel normaliseeritud andmeid. Teise võimalusena võib juhul, kui kalade kasv kontrollrühmas ja ainega kokku puutunud rühmas on sarnane, kasutada lipiidisisalduse suhtes korrigeerimiseks üksnes kontrollrühma kalade lipiidisisaldust (vt punkt 56). Lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCFi arvutamise meetodit on kirjeldatud 5. liites.

#### Tulemuste tõlgendamine

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritava aine lahuses mõõdetud kontsentratsioon on analüüsimetodi määramispiiri lähedal.

Mürgise toime välistamiseks ei tohiks keskmine kasvukiirus kontrollrühmas ja katserühma(de)s olla märkimisväärselt erinev. Kõnealuse kahe rühma kalade kasvu kiiruskonstantide või kasvukõverate võrdlemiseks tuleks kasutada sobivat meetodit<sup>(1)</sup>.

Selgelt väljendunud omastamis- ja puhastumiskõverad viitavad kvaliteetsetele biokontsenteerumise andmetele. Kiiruskonstantide puhul peaks bioakumuleerumise mudeli sobivuse hindamiseks tehtava  $\chi^2$ -testi tulemustest nähtuma hea sobivus andmetega (st protsentides väljendatav mõõtmisviga peaks olema väike (32)), et neid konstante saaks lugeda usaldusväärseks (vt 5. liide). Kui kasutatakse mitut katsekontsentratsiooni, peaks eri kontsentratsioonide vaheline omastamise/puhastumise kiiruskonstantide varieeruvus olema väiksem kui 20 %<sup>(2)</sup>. Suurem varieeruvus võib viidata kontsentratsioonist sõltuvusele. Kui omastamise/puhastumise kiiruskonstantide puhul täheldatakse eri kontsentratsioonide vahelisi märkimisväärselt erinevusi, tuleks need registreerida ja esitada sellekohased võimalikud seletused. Üldjuhul on hästi kavandatud uuringutest saadud BCFide puhul usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ligikaudu  $\pm 20$  % asjaomase BCFi väärtusest.

Kahe või enama kontsentratsiooni kasutamisel vaadeldakse kõikidel kontsentratsioonidel saadud tulemusi, et hinnata tulemuste omavahelist koosõla ja teha

<sup>(1)</sup> Kasvu kiiruskonstantide puhul võib kohaldada *t*-testi, et kontrollida, kas kasv kontroll- ja katserühma(de)s on erinev; dispersioonanalüüsi puhul võib kasutada *F*-testi. Vajaduse korral võib sobiva kasvumudeli valimise hõlbustamiseks kasutada *F*-testi või tõepärasuhte testi (OECD monograafia 54 (32)).

<sup>(2)</sup> Selle väärtuse puhul eeldatakse, et analüüsimetodid on usaldusväärsed ja poolväärtusaeg on < 14 päeva. Kui analüüsimetodid ei ole nii usaldusväärsed või poolväärtusaeg on (oluliselt) pikem, on varieeruvus suurem.

▼ **M7**

kindlaks, kas esineb kontsentratsioonist sõltuvust. Kui loomade arvu ja/või ressursikulu vähendamise eesmärgil kasutatakse ainult ühte kontsentratsiooni, tuleks esitada sellekohane põhjendus.

Kui  $BCF_K$  on oluliselt suurem kui  $BCF_{SS}$ , on  $BCF_{SS}$ -i väärtus kaheldav, kuna see võib viidata asjaolule, et statsionaarset olekut ei saavutatud või ei ole võetud arvesse kasvust tingitud lahjenemist ega kadu põhjustavaid protsesse. Kui  $BCF_{SS}$  on väga palju suurem kui  $BCF_K$ , tuleks kontrollida, kas omastamise ja puhastamise kiiruskonstantide arvutamisel on tehtud vigu, ning neid näitajaid uuesti hinnata.  $BCF_K$  hindamise tulemust võib parandada teistsuguse lähendamismetodi kasutamine (vt 5. liide).

**Katseprotokoll**

Peale punktis 3 nimetatud teabe uuritava aine kohta tuleb katseprotokollis esitada järgmine teave.

*Uuritav aine:*

füüsikalised ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

— mitut koostisosa sisaldava aine või UVCB (tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal) puhul võimalikult täpne kirjeldus iga koostisosa keemilise määratluse kohta ja protsentuaalse osakaalu kohta aine üldmassist; tuleks anda ülevaade, kuidas katses kasutatud analüüsimeetodiga kajastatakse aine kontsentratsiooni; tuleks kirjeldada kõiki analüüsimeetodeid, sealhulgas nende täpsust, avastamispiiri ja määramispiiri;

— radioaktiivselt märgistatud ainete puhul märgistatud aatomi(te) täpne asukoht ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsentuaalne osakaal;

— teave uuritava aine mürgisuse kohta kaladel (soovitavalt katseliigil); mürgisuse näitajana tuleks esitada 96 tunni jooksul avalduva akuutse mõju  $LC_{50}$  ning kroonilise mõju uuringust (st varast arengujärku või kogu elutsüklit hõlmavast katses) saadud täheldatava kahjuliku toime puudumise kontsentratsioon (NOAEC) ja vähima täheldatava kahjuliku toime avaldumise kontsentratsioon (LOAEC);

— kasutamisele eelneva säilitamise korral uuritava kemikaali või aine säilitustingimused ja püsivus sellistes säilitustingimustes.

*Katseliik:*

teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltötlused, kohandamine, vanus, sugu (vajaduse korral), suurusevahemik (mass ja pikkus) jne.

*Katsetingimused:*

— kasutatud katsemeetod (nt läbivoolumeetod või poolstaatiline meetod); standardne või minimeeritud katseplaan (koos põhjendusega);

— kasutatud valguse liik ja omadused ning valgustusperiood(id);

— katseplaan (näiteks katsekambrite arv ja suurus, veekoguse vahetumise kiirus, biomassisaldus, paralleelproovide arv, kalade arv paralleelproovi kohta, katsekonsentratsioonide arv, omastamis- ja puhastumisetapi kestus, vee- ja kalaproovide võtmise sagedus);

▼ M7

- põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada lahusti kirjeldus, kontsentratsioon ja osakaal katsevee orgaanilise süsiniku sisaldusest) või alternatiivse doseerimissüsteemi kirjeldus;
- nominaalsed katsekonsentratsioonid, katsenõudes saadud mõõtmistulemuste keskvaartused ja standardhälbed ning mõõtmismeetod ja -sagedus;
- lahjendusvee päritolu, kõikide eeltöötluste kirjeldus, kõik tõendid selle kohta, et kalad suudavad selles vees elada, ning vee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus, katsekeskkonna soolsus (vajaduse korral) ja kõikide muude mõõtmiste tulemused;
- vee kvaliteet katsenõudes, selle pH, karedus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus; kasutatud mõõtmismeetod ja mõõtesagedus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta, näiteks sööda liik, päritolu, koostis (võimaluse korral vähemalt lipiidi- ja valgusisaldus), valitud söötmissrežiim, sööda kogus ja söötmissagedus;
- andmed kala- ja veeproovide töötlemise kohta, sealhulgas üksikasjad proovide ettevalmistamise ja säilitamise ning uuritava aine ja lipiidide ekstraheerimise ja nende sisalduse määramiseks kasutatud analüüsimeetodite (ja nende täpsuse) kohta;
- meetodid, mida kasutati kokkupuute suhtes randomiseerimiseks ja kalade jaotamiseks katsenõude vahel;
- katseorganismide katselahusesse viimise kuupäev ja katse kestus;
- võimaluse korral kontsentratsioonivahemiku leidmise katsete kirjeldus ja tulemused.

*Tulemused:*

- kõikide tehtud eeluuringute tulemused;
- kalade suremus kontrollrühmas ja igas uuritava ainega katsekambris ning kõik täheldatud ebanormaalse käitumise ilmingud;
- teave mis tahes täheldatud kahjuliku mõju kohta;
- kemikaali analüüsimise meetodite täielik kirjeldus, sealhulgas avastamis- ja määramispiir, meetodist tulenev varieeruvus ning tuvastamise tõhusus;
- kalade lipiidisisaldus ja selle määramiseks kasutatud meetod ning lipiidisisalduse suhtes normaliseerimise tegur  $L_n$ , mille abil väljendatakse tulemusi lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %;
- tabeli kujul esitatud andmed nii kontrollrühma kui ka katserühma(de) kalade massi (ja pikkuse) kohta, mis on seostatud kemikaali (ja vajaduse korral lipiidide) sisaldusega igas üksikus kalas (näiteks igale proovivõtmiseks kasutatud kalale antud kordumatu tunnuskoodi abil), ning kasvu kiiruskonstandi leidmiseks kasutatud arvutuskäik;

▼ **M7**

- tabeli kujul esitatud andmed igal proovivõtmisel määratud aine sisalduse kohta kalades (iga üksikut kala iseloomustav  $C_f$ ) ja vees ( $C_w$ ) ning vajaduse korral asjaomane keskvaartus, standardhälve ja vahemik kontrollrühmas ja katserühma(de)s ( $C_f$ -i väljendatakse milligrammides terve kala või konkreetsete kudede, näiteks rasvkoe märgmassi kilogrammi kohta ja  $C_w$ -d milligrammides liitri kohta);  $C_w$  väärtus kontrollrühmas (tuleks esitada ka taustsisaldus);
- kõverad, mis hõlmavad kõiki mõõtmisandmeid ja väljendavad järgmisi näitajaid (vajaduse korral võib kontsentratsiooni väljendada terve keha massi alusel ja lipiidisisalduse suhtes normaliseerituna lähtuvalt kala või selle konkreetsete kudede lipiidisisaldusest 5 %):
  - kasv, st kalade massi muutus ajas või naturaalloogaritmitud massiandmete muutus ajas (sealhulgas arvatud kasvu kiiruskonstant  $k_g$ );
  - uuritava aine omastamine ja sellest puhastumine kalades (samal graafikul);
  - statsionaarse oleku saavutamiseks kulunud aeg (selle saavutamise korral);
  - naturaalloogaritmitud kontsentratsioonandmete muutus omastamisetapi vältel (sealhulgas arvatud omastamise kiiruskonstant  $k_1$ );
  - naturaalloogaritmitud kontsentratsioonandmete muutus puhastumisetapi vältel (sealhulgas arvatud puhastumise kiiruskonstant  $k_2$ ) ning
  - omastamisetapi ja puhastumisetapi andmed koos lähendamiseks kasutatud mudelit iseloomustava kõveraga;
- kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt võõrväärtuste esinemist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usaldusväärset võõrväärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta;
- biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus ( $BCF_{SS}$ ), kui see (peaaegu) saavutati;
- kineetiline biokontsentratsioonitegur ( $BCF_K$ ) ning arvatud omastamise ja puhastumise kiiruskonstandid  $k_1$  ja  $k_2$ , järjestikuse lähendamise korral koos  $k_2$  iseloomustava hajuvusega (tõus ja algordinaat);
- iga parameetrit igal kasutatud uuritava aine kontsentratsioonil iseloomustavad usalduspiirid ja standardhälve (vastavalt võimalusele) ning asjaomased arvutus- ja andmeanalüüsi meetodid;
- kõik andmed radioaktiivselt märgistatud aine metaboliitide ja nende akumulereerumise kohta;
- kasvu kiiruskonstant või -konstandid koos usaldusvahemikuga usaldusnivool 95 % ning arvutuslik kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant ( $k_{2g}$ ), poolväärtusaeg ja BCF ( $BCF_{K_g}$ );
- kõik katsega seotud ebatavalised asjaolud, kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja mis tahes muu asjakohane teave;
- allpool esitatud koondtabel asjakohaste mõõtmis- ja arvutustulemustega.



## ▼ M7

Aine omastamise ja ainest puhastumise kiiruskonstandid ning biokontsentratsioonitegurid (BCF)	
$k_g$ (kasvu kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$k_1$ (üldine omastamise kiiruskonstant; l/kg päevas):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$k_2$ (üldine puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$k_{2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$C_f$ (kemikaali kontsentratsioon kalas statsionaarses olekus; mg/kg):	märkida väärtus $\pm$ SH <sup>(2)</sup> )
$C_w$ (kemikaali kontsentratsioon vees; mg/l):	märkida väärtus $\pm$ SH <sup>(2)</sup> )
$L_n$ (lipiidisisalduse suhtes normaliseerimise tegur):	märkida väärtus <sup>(3)</sup> )
$BCF_{SS}$ (BCF statsionaarses olekus; l/kg):	märkida väärtus $\pm$ SH <sup>(2)</sup> )
$BCF_{SSL}$ (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud BCF statsionaarses olekus; l/kg):	märkida väärtus <sup>(3)</sup> ) $\pm$ SH <sup>(2)</sup> )
$BCF_K$ (kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$BCF_{Kg}$ (kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$t_{1/2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg; päevades):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$BCF_{KL}$ (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus
$BCF_{KLg}$ (lipiidisisalduse suhtes normaliseeritud, kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF; l/kg):	märkida väärtus

<sup>(1)</sup> UV – usaldusvahemik (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).

<sup>(2)</sup> SH – standardhälve (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).

Tuleks jälgida, et kasutatava meetodi katse-eelse väljatöötamise ja katseplaani koostamise käigus ei saadaks tulemusi, mille kohta tuleb märkida „Ei olnud avastamis-/määramispiiril avastatav/määratav“, kuna selliseid tulemusi ei saa kasutada kiiruskonstantide arvutamiseks.

### C.13 – II: KALADE VEEKAUDSE KOKKUPUUTE KATSE MINIMEERITUD KUJUL

#### SISSEJUHATUS

Täismahus katse läbiviimisel ja katsetulemuste tõlgendamisel laborites ja reguleerivates asutustes saadud üha suuremate kogemustest ilmneb, et omastamise ja puhastumise kiiruskonstandi hindamisel saab kohaldada esimest järku reaktsiooni kineetikat, välja arvatud mõnel erandjuhul. Seega on omastamise ja puhastumise kiiruskonstanti ning kineetilist BCFi võimalik leida minimaalse arvu proovivõtupunktide põhjal.

Biokontsentreerumise uuringute jaoks alternatiivse katseplaani väljatöötamise algeesmärk oli võimaldada viia vaheastmena läbi väikesemahuline katse, millega

▼ M7

saaks  $K_{OW}$ -l ja QSAR-meetoditel põhinevaid hinnangulisi BCFi väärtusi kinnitada või need ümber lükata ja mille teostamisega langeks paljude ainete puhul ära vajadus teha täismahus katse; samuti sooviti proovivõtmiste ja analüüsi etappide arvu vähendamiseks minimeerida kulusid ja kasutatavate loomade arvu. Seejuures järgiti varasema katsemeetodi ülesehituse põhiaspekte, et võimaldada katsetulemuste ühildamist olemasolevate BCFi andmetega ning hõlbustada katsete tegemist ja andmete tõlgendamist; eesmärgiks võeti saavutada selline hinnanguline BCFi väärtus, mille puhul mõõtetäpsus ja kordustäpsus on riskihinnanguga seotud otsuste tegemiseks piisav. Minimeeritud katseplaani puhul kehtivad suures osas samad kaalutlused kui täismahus katse puhul, näiteks nõuetekohasuse kriteeriumid (vt punkt 24) ja võimalus katse lõpetada, kui omastamisetapi lõpus ei täheldata märkimisväärset aine omastamist (vt punktid 16 ja 38).

Ained, mida võib uurida minimeeritud katseplaani alusel, peaksid kuuluma sellesse üldkategoriasse, mille jaoks kõnealune katseplaan välja töötati, st mitte-polaarsete orgaaniliste ainete klassi (vt punkt 49). Kui on tähelepanekuid selle kohta, et uuritav aine võib käituda teisiti (näiteks ei ole selgelt tegemist esimest järku reaktsiooni kineetikaga), tuleks regulatiivsetel põhjustel teha täismahus katse.

Tavaliselt ei ole minimeeritud kujul tehtav katse lühem kui standardne BCFi määramise katse, kuid hõlmab väiksemat arvu kalaproove (seda on selgitatud 6. liites). Ainete puhul, millest puhastumine on kiire, võib puhastumisetapi kestust siiski lühendada, et hoida ära kalas sisalduva aine kontsentratsiooni lange-mist allapoole avastamis-/määramispiiri enne katse lõppu. Täismahus katse läbi-viimise vajaduse kindlakstegemiseks võib kaladega teha minimeeritud kujul kokkupuutekatse ühel kontsentratsioonil ning kui saadud andmed, mille põhjal arvutatakse kiiruskonstandid ja BCF, on usaldusväärsed (vt punkt 93), võib täis-mahus katse jätta tegemata juhul, kui leitud BCF erineb märkimisväärselt õigus-likult reguleeritavatest väärtustest.

Mõnel juhul võib eelkatseks olla kasulik teha minimeeritud plaani kohane katse mitmel kontsentratsioonil, et teha kindlaks, kas aine hinnanguline BCF on sõltuv kontsentratsioonist. Kui minimeeritud kujul tehtud katsest saadud hinnangulise BCFi puhul täheldatakse kontsentratsioonist sõltuvust, tuleb viia läbi täismahus katse. Kui sellisest minimeeritud kujul katsest leitud hinnanguline BCF ei ole kontsentratsioonist sõltuv, kuid tulemusi ei saa pidada lõplikeks, võib järgnevas täismahus katses kasutada kahe (või enama) kontsentratsiooni asemel ühte kontsentratsiooni, et vähendada katsealuste loomade arvu.

Aine, mis võib sobida minimeeritud kujul katse tegemiseks, peaks vastama järg-mistele kriteeriumidele:

- selle omastamise ja sellest puhastumise kineetika peaks näiteks sarnaste aine-tega saadud tulemustest lähtuvalt suure tõenäosusega ligikaudselt vastama esimest järku reaktsiooni kineetikale;
- selle  $\log K_{OW}$  peaks olema alla 6, välja arvatud juhul, kui eeldatakse kiiret metaboliseerumist <sup>(1)</sup>;
- selle lahustuvus vees peaks olema asjaomast analüüsimeetodit silmas pidades piisav (vt punkt 24);
- see peaks olema nii kalades kui ka vees hästi mõõdetav (st selle kontsentratsioon peaks olema vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem kui meetodi määramispiir) – soovitatatakse kasutada radioaktiivset märgistamist (vt punkt 23) – ning
- selle puhul eeldatav puhastumisetapi kestus peaks olema pikem kui aine eeldatav poolväärtusaeg (arvutuskäik on esitatud 5. liites); vastasel juhul tuleks puhastumisetapi kestust vastavalt muuta (vt punkt 91). Sellest reeglist võib teha erandi, kui aine on eeldatavalt kiirelt metaboliseeruv.

<sup>(1)</sup> Minimeeritud katseplaani võibki kasutada kiire metaboliseerumise tõendamiseks, kui on teada, et kiire metaboliseerumine on tõenäoline.

▼ **M7****PROOVIVÕTU AJAKAVA MINIMEERITUD KATSEPLAANI ALUSEL TEHTAVAS KATSES****Kalaproovide võtmine**

Kalaproove võetakse vaid neljas proovivõtupunktis:

- omastamisetapi keskel ja lõpus (viimane tähistab ühtlasi puhastumisetapi algust), näiteks 14 ja 28 päeva möödudes (33);
- puhastumisetapi keskel ja katse lõpus (mil aine sisaldus on < 10 % maksimumsisaldusest või vähemalt selgelt väiksem kui aine poolväärtusajale vastav sisaldus), näiteks 7 ja 14 päeva pärast puhastumisetapi algust (33). Kui eeldatakse või täheldatakse kiiret puhastumist, võib olla vaja lühendada puhastumisetapi kestust, et aine sisaldus kalas ei langeks määramispiirist allapoole.
- Lipiidisisaldust mõõdetakse samal viisil kui täismahus katses.
- Kasvu suhtes korrigeerimine toimub samal viisil kui täismahus katses.
- BCF arvutatakse kineetilise BCF<sub>ina</sub>.

**Veeproovide võtmine**

Minimeeritud katseplaani puhul võetakse veeproove sama sagedusega kui täismahus katses (vt punkt 54) või omastamisetapis vähemalt viis korda võrdsete ajavahemike järel ja puhastumisetapis kord nädalas.

**Katseplaani muudatused**

Lähtuvalt uuritava aine omadustest, usaldusväärsest QSAR-meetodil põhinevast hinnangust ja uuringu konkreetsest eesmärgist võib kaaluda katseplaanis järgmiste muudatuste tegemist.

- Kui on vaja saavutada suuremat täpsust, võib suurendada kalade arvu omastamisetapi lõpus võetavas proovis (4 asemel 6 või 8).
- Kui puhastumine ei ole 14 päeva jooksul (või puhastumisetapi eeldatava lõppemise ajaks) olnud piisav (st > 50 %), võib kasutada ühte täiendavat kalade rühma. Kui puhastumisetapi eeldatav kestus on lühem või pikem kui 14 päeva, tuleks proovivõtu ajakava vastavalt kohendada (st valida üks rühm kalu puhastumisetapi eeldatava lõppemise ajal ja üks rühm ajal, mil on möödunud pool etapi kestusest).
- Võimaliku kontsentratsioonist sõltuvuse kindlakstegemiseks võib kasutada kahte katsekontsentratsiooni. Kui minimeeritud plaani kohase kahel kontsentratsioonil tehtud katse tulemustest nähtub, et BCF ei ole kontsentratsioonist sõltuv (st erinevus on väiksem kui 20 %), võib täismahus katse tegemise korral lugeda ühe katsekontsentratsiooni kasutamise piisavaks.
- Näib, et bioakumuleerumise protsesse kirjeldavaid mudeleid, näiteks neid, mille on välja pakkunud Arnot *et al.* (35), on võimalik kasutada omastamis- ja puhastumisetapi kestuse hõlpsamaks kavandamiseks (vt ka 5. liide).

**Arvutused**

Siin kirjeldatud lähenemisviisi puhul lähtutakse põhimõttest, et biokontsentratsiooniteguri võib täismahus katse tulemuste põhjal leida kas biokontsentratsioonitegurina statsionaarses olekus (BCF<sub>SS</sub>), mis väljendab kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni ja vees esineva uuritava aine kontsentratsiooni suhet, või kineetilise biokontsentratsioonitegurina (BCF<sub>K</sub>), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi  $k_1$  ja puhastumise kiiruskonstandi  $k_2$  suhet. BCF<sub>K</sub> on kehtiv ka olukorras, kus omastamisetapis ei saavutata aine sisalduse puhul statsionaarset olekut, eeldusel, et omastamine ja puhastumine toimuvad ligikaudu

▼ **M7**

vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Omastamise ja puhastamise kiiruskonstandi hindamiseks on vaja minimaalselt kahte andmepunkti, üks neist omastamisetapi lõpus (st puhastamisetapi alguses) ja teine puhastamisetapi lõpus (või punktis, kus oluline osa puhastamisetapist on möödas). Omastamise ja puhastamise kineetika kontrollimiseks on soovitatav lisada vahepealne proovivõtupunkt <sup>(1)</sup>. Arvutuskäik on esitatud 5. ja 6. liites.

**Tulemuste tõlgendamine**

Katse nõuetekohasuse ja tulemuste teabeväärtuse tagamiseks veendutakse, et puhastamisperioodi kestus on pikem kui üks poolväärtusaeg. Samuti tuleks  $BCF_{Km}$ -i (minimeeritud kujul katsest saadud kineetiline BCF) võrrelda minimeeritud katseplaani kohase  $BCF_{SS}$ -i väärtusega, mis on arvatud omastamisetapi lõpus lähtuvalt eeldusest, et on saavutatud statsionaarne olek. Viimast on võimalik üksnes eeldada, sest proovivõtupunktide arv ei ole selle tõendamiseks piisav. Kui  $BCF_{Km}$  on väiksem kui minimeeritud kujul katse kohane  $BCF_{SS}$ , tuleks eelistada viimast. Kui  $BCF_{Km}$  on alla 70 % minimeeritud kujul katse kohasest  $BCF_{SS}$ -st, ei ole tulemused kehtivad ja tuleks läbi viia täismahus katse.

Kui minimeeritud kujul katsest saadud  $BCF_{Km}$ -i väärtus jääb õiguslikult reguleeritavasse vahemikku, tuleks teha täismahus katse. Kui saadud väärtus erineb märkimisväärselt kõikidest õiguslikult reguleeritavatest väärtustest (on neist oluliselt suurem või väiksem), ei pruugi täismahus katse tegemine olla vajalik või võib selle teha ühel kontsentratsioonil, kui asjaomases õigusraamistikus seda nõutakse.

Kui pärast minimeeritud kujul ühel kontsentratsioonil tehtud katset leitakse olevat vajalik viia läbi täismahus katse, võib selle teha ühel muul kontsentratsioonil. Kui tulemused on omavahel kooskõlas, võib täiendava täismahus katse veel ühel kontsentratsioonil ära jätta, kuna aine biokontsentreerumine ei ole eeldatavalt kontsentratsioonist sõltuv. Kui minimeeritud kujul katse on tehtud kahel kontsentratsioonil ja tulemustest ei nähtu kontsentratsioonist sõltuvust, võib täismahus katse teha ainult ühel kontsentratsioonil (vt punkt 87).

**Katseprotokoll**

Minimeeritud kujul tehtud katse protokoll peaks sisaldama kõiki täismahus katse puhul nõutavaid andmeid (vt punkt 81), välja arvatud andmed, mida ei ole võimalik esitada (st kõver, mis väljendab aega statsionaarse oleku saavutamiseni, ning biokontsentratsioonitegur statsionaarses olekus; viimase asemel tuleks esitada minimeeritud kujul katse kohane  $BCF_{SS}$ ). Peale selle tuleks katseprotokollis esitada minimeeritud katsemeetodi kasutamise põhjendus ja leitud  $BCF_{Km}$ .

**C.13 – III: TOIDUKAUDSEL KOKKUPUUTEL BOKONTSENTEERUMISE KATSE KALADEGA****SISSEJUHATUS**

Käesolevas osas kirjeldatud meetodit tuleks kasutada ainete puhul, mille uurimine veekaudse kokkupuute meetodiga ei ole teostatav (näiteks seetõttu, et aine sisaldust vees ei suudeta hoida püsiva ja mõõdetavana või et 60 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi jooksul ei ole võimalik saavutada aine piisaval määral kontsentreerumist organismis; veekaudse kokkupuute meetodit on kirjeldatud eespool olevates osades). Tuleks siiski silmas pidada, et käesoleva meetodi puhul leitav lõppnäitaja on biokontsentratsiooniteguri (BCF) asemel toidukaudse biokuhjumise tegur (BMF) <sup>(2)</sup>.

2001. aasta mais Madridis toimunud Keskkonnatoksikoloogia ja -keemia Ühingu (SETAC) Euroopa üksuse konverentsil tutvustati uut meetodit vees raskesti lahustuvate orgaaniliste ainete bioakumuleerumise hindamiseks (36). Selle meetodi väljatöötamisel lähtuti mitmest varem avaldatud bioakumuleerumise uuringust, kus kasutati söödasse uuritava aine lisamisel põhinevat doseerimismeetodit (nt viide 37). 2004. aasta alguses esitati püsivate, bioakumuleeruvate ja mürgiste kemikaalide ELi tööühikule sellise meetodi kavand (38), mis oli ette

<sup>(1)</sup> Kui mõõtmisi tehakse ainult kahes andmepunktis, võib  $BCF_{Km}$ -i usalduspiiride hindamiseks kasutada andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimise meetodit (*bootstrapping*).

Kui kasutatakse ka vahepealseid andmepunkte, võib  $BCF_{Km}$ -i usalduspiirid arvutada samal viisil kui täismahus katses.

<sup>(2)</sup> Mõisted ja ühikud on määratletud 1. liites.

▼ **M7**

nähtud võimaliku bioakumuleerumise tuvastamiseks selliste vees raskesti lahustuvate orgaaniliste ainete puhul, mida ei saa uurida veekausel kokkupuutel toimuva biokontsentreerumise hindamise standardmeetodiga; nimetatud kavandiga koos esitati ka seda toetav taustdokument (39). Kõnealuse meetodi vajalikkust põhjendati ka sellega, et võimalik kokkupuude selliste raskesti lahustuvate ainetega (st ained, mille  $\log K_{OW} > 5$ ) võib keskkonnas toimuda suures osas toidu kaudu (vt viited 40–44). Sel põhjusel on mõnes kemikaale käsitlevas avaldatud määruuses viidatud toidukaude kokkupuute katsetele<sup>(1)</sup>. Tuleks siiski meeles pidada, et siin kirjeldatud meetodi puhul hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud BMFi väärtus ei ole otsestelt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

Käesoleva katsemeetodi käesolev osa põhineb eespool nimetatud meetodil (38) ning selles kirjeldatakse uut meetodit, mis puudus katsemeetodi C.13 eelmises versioonis. Kõnealune alternatiivne meetod võimaldab uurida otsest toidukaudet kokkupuudet kontrollitud laboritingimustes.

Selliste uuringute võimalikel läbiviijatel tuleks tutvuda kõnealuse katsemeetodi punktidega 1–14, mis sisaldavad teavet selle kohta, millal võib olla parem kasutada veekaude kokkupuute katse asemel toidukaude kokkupuute katset. Seal on esitatud uuritavate ainetega seotud eri kaalutlused, mida tuleks enne katse tegemist arvesse võtta.

Radioaktiivselt märgistatud uuritavate ainete kasutamist tuleks kaaluda sarnasel viisil kui veekaude kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 6 ja 65).

Toidukaude kokkupuute meetodit võib kasutada rohkem kui ühe aine hindamiseks samas katses, kui on täidetud teatavad kriteeriumid, mida on põhjalikumalt käsitletud punktis 112. Lihtsuse huvides on siin kirjeldatud ainult ühe uuritava ainega tehtava katse meetodikat.

Toidukaude ja veekaude kokkupuute meetodid on paljuski sarnased, välja arvatud muidugi kokkupuuteviisi poolest. Seega kattuvad paljud siin kirjeldatud meetodi üksikasjad eelmistes osades kirjeldatud veekaude kokkupuute meetodi omadega. On esitatud võimalikult palju viiteid eelmiste osade asjakohastele punktidele, ent loetavuse ja arusaadavuse huvides on teataval määral kordamine paratamatu.

## KATSE PÕHIMÕTE

Võib kasutada läbivoolurežiimi või poolstaatilist režiimi (vt punkt 4); soovitatavalt tuleks kasutada läbivoolurežiimi, et piirata võimalikku veekaudet kokkupuudet uuritava ainega tulenevalt selle desorbeerumisest rikastatud söödast või väljaheidetest. Katse hõlmab kahte etappi: omastamine (uuritava ainega rikastatud sööt) ja puhastamine (puhas töötlemata sööt) (vt punkt 16). Omastamisetapis söödetakse katserühma(de) kalu iga päev kindlaksmääratud kaubandusliku kalasöödaga, mille koostis on teada ja millesse on lisatud uuritavat ainet. Ideaaljuhul peaksid kalad ära tarbima kogu pakutava sööda (vt punkt 141). Seejärel söödetakse kalu puhastamisetapi vältel puhta töötlemata kaubandusliku kalasöödaga. Nagu veekaude kokkupuute meetodi puhul, võib ka siin kasutada vajaduse

<sup>(1)</sup> Seda küsimust on seoses määruusega (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) (ELT L 396, 30.12.2006, lk 1), käsitletud dokumendi „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment“ („Teabenõudeid ja kemikaalide ohutuse hindamist käsitlevad suunised“) peatüki R.7c punktis R.7.10.3.1, punktis R.7.10.4.1 ja joonisel R7.10–2.

▼ **M7**

korral rohkem kui ühte katserühma, kellele antav sööt sisaldab rikastamiseks kasutatavat uuritavat ainet eri kontsentratsioonides, kuid enamiku väga hüdrofoobsete orgaaniliste ainete puhul piisab ühest katserühmast (vt punktid 49 ja 107). Poolstaatilise režiimi kasutamise korral tuleks kalad viia omastamisetapi lõpus üle uude katsekeskkonda ja/või katsekambrisse (kui omastamisetapi ajal kasutatud katsekeskkond ja/või seadmed on leostumise tagajärjel uuritava ainega saastunud). Uuritava aine kontsentratsiooni kalas mõõdetakse katse kummagi etapi kestel. Peale rikastatud sööta saavate kalade rühma (katserühm) kasutatakse kontrollrühma, mille kalu hoitakse identsetes tingimustes ja söödetakse täpselt samal viisil kaubandusliku kalasöödaga, mis ainsa erinevusena ei ole rikastatud uuritava ainega. Kõnealune kontrollrühm võimaldab kvantitatiivselt määrata uuritava aine taustsisalduse ainega mitte kokku puutunud kalades ja kasutada seda võrdlusalusena ainega kokkupuutumisest tuleneva mis tahes kahjuliku toime hindamisel katserühma(de)s<sup>(1)</sup>. Ühtlasi võimaldab see võrrelda kasvu kiiruskonstante eri rühmades ja seeläbi veenduda, et pakutud sööta on tarbitud sarnases koguses (kasvu kiiruskonstandi väärtuste erinevuse põhjendamisel tuleks kaaluda ka söötade võimalikke maitseerinevusi; vt punkt 138). Nii omastamis- kui ka puhastumisetapis on oluline anda katserühma(de) ja kontrollrühma kaladele sama toiteväärtusega sööta.

Meetodi väljatöötajate kogemuste põhjal piisab üldjuhul 7–14 päeva pikkusest omastamisetapist (38, 39). See vahemik peaks võimaldama minimeerida katse läbiviimise kulusid ja tagada samas enamiku ainete puhul piisava kokkupuutemäära. Mõnel juhul võib omastamisetapi kestust siiski pikendada (vt punkt 127). Aine sisaldus kalas ei pruugi omastamisetapi jooksul saavutada statsionaarsele olekule vastavat väärtust, mistõttu käesoleva meetodi puhul põhinevad andmetöötlus ja tulemused üldjuhul kudedes leiduvate jääkide kineetilisel analüüsil. (Märkus: statsionaarse oleku saavutamiseks kuluva aja hindamise võrrandeid võib siin kasutada samamoodi kui veekaudse kokkupuute katse puhul – vt 5. liide.) Puhastumisetapp algab hetkel, mil kaladele antakse esmakordselt rikastamata sööta, ning kestab tavaliselt kuni 28 päeva või seni, kuni uuritav aine ei ole terves kalas enam tuvastatav, kui selline hetk saabub varem. Puhastumisetappi võib sõltuvalt kemikaali mõõdetud sisalduse muutumisest ajas ja olenevalt kalade suuruselt lühendada või muuta selle 28 päevast pikemaks.

Käesolev meetod võimaldab määrata kalas esineva konkreetse uuritava aine poolväärtusaja ( $t_{1/2}$ , puhastumise kiiruskonstandi  $k_2$  alusel), imendumistõhususe (absorbeerumine soolestikus;  $a$ ), kineetilise toidukaude biokuhjumise teguri ( $BMF_K$ ), kasvu suhtes korrigeeritud kineetilise toidukaude biokuhjumise teguri ( $BMF_{Kg}$ ) ja lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud<sup>(2)</sup> kineetilise toidukaude biokuhjumise teguri ( $BMF_{KL}$ ) (ja/või nii kasvu kui ka lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud kineetilise toidukaude biokuhjumise teguri  $BMF_{KgL}$ ). Nagu ka veekaudse kokkupuute meetodi puhul, nii põhjustab kalade kehamassi suuremine katse vältel siingi uuritava aine lahjenemise kasvavates kalades, mistõttu (kineetilise)  $BMFi$  väärtust alahinnatakse juhul, kui seda ei korrigeerita kasvu suhtes (vt punktid 162 ja 163). Peale selle saab juhul, kui omastamisetapis saavutati eelduste kohaselt statsionaarne olek, arvutada statsionaarsele olekule vastava  $BMFi$  hinnangulise väärtuse. On välja töötatud lähenemisviisid, mis võimaldavad hinnata kineetilise biokontsentratsiooniteguri ( $BCF_K$ ) väärtust lähtuvalt toidukaude kokkupuute uuringu andmetest (nt viited 44–48). Selliste lähenemisviiside positiivseid ja negatiivseid külgi on käsitletud 8. liites.

<sup>(1)</sup> Enamiku uuritavate ainete puhul ei tohiks aine ideaaljuhul olla kontrollrühma vees tuvastatav. Taustsisaldus peaks olema asjakohane üksnes looduslikult esinevate materjalide (nt mõned metallid) ja keskkonnas laialdaselt levinud ainete puhul.

<sup>(2)</sup> Kuna  $BMF$  on määratletud kui suhtarv, mis väljendab organismis esineva aine kontsentratsiooni ja organismi toidus esineva aine kontsentratsiooni suhet statsionaarses olekus, korrigeeritakse seda lipiidisisalduse arvessevõtmiseks nii organismi kui ka toidu lipiidisisalduse suhtes ning seega on täpsem nimetada seda korrigeerimiseks. See lähenemisviis erineb veekaudsel kokkupuutel toimuva biokontsentreerumise katses tehtavast normalseerimisest organismi teatud kindla lipiidisisalduse alusel.

▼ **M7**

Käesolev meetod töötati välja peamiselt raskesti lahustuvate mittepolaarsete orgaaniliste ainete jaoks, mille omastamine ja millest puhastumine toimub kalades ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui katses kasutatakse ainet, mille omastamine ja millest puhastumine ei toimu ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, tuleks rakendada keerukamaid mudeleid (vt viited 5. liites) ning kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

BMFi määramiseks analüüsitakse uuritavat ainet üldjuhul terves kalas (lähtuvalt märgmassist). Kui see on uuringu eesmärkide saavutamiseks asjakohane, võib proovi võtta konkreetsest koest (nt lihaskude, maks), kui kala on jagatud söödavaks ja mittesöödavaks osaks (vt punkt 21). Peale selle võib eemaldada seedekulgla ja seda eraldi analüüsida kas massibilansil põhineva lähenemisviisi raames või selleks, et teha kindlaks selles leiduva ainekoguse osakaal terves kalas leiduvas ainekoguses omastamisetapi lõpus ja veidi pärast puhastamisetapi algust võetud proovides.

Tuleks mõõta proovivõtmiseks valitud tervete kalade lipiidisisaldus, et aine kontsentratsiooni saaks korrigeerida nii kalade kui ka sööda lipiidisisalduse suhtes (vt punktid 56 ja 57 ning 7. liide).

Katse jooksul toimuda võiva kasvu kindlakstegemiseks tuleks iga proovivõtmiseks valitud kala kaaluda ning massiandmed registreerida ja seostada konkreetse kalas mõõdetud kemikaali kontsentratsiooniga (näiteks sel viisil, et registreerimisel kasutatakse igale analüüsitud kalale antud kordumatut tunnuskoodi). Samuti tuleks võimaluse korral mõõta kala üldpikkus<sup>(1)</sup>. Massiandmed on vajalikud ka BCFi hinnangulise väärtuse leidmiseks toidukaudse kokkupuute katsest saadud puhastamisandmete põhjal.

## TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Uuritava aine kohta peaks olema kättesaadav punktides 3 ja 22 kirjeldatud teave. Andmed analüüsimeetodi kohta, mis võimaldab määrata uuritava aine sisaldust vees, ei ole üldjuhul vajalikud, ent tuleb esitada teave meetodite kohta, mis võimaldavad sobiva tundlikkusega mõõta aine sisaldust kalasöödas ja kalakudedes.

Käesolevat meetodit võib kasutada rohkem kui ühe aine hindamiseks samas katses. Sel juhul peavad uuritavad ained sobima koos kasutamiseks: need ei tohi kalasöödale lisatuna üksteist vastastikku mõjutada ega oma keemilisi omadusi muuta. Eesmärk on tagada, et iga uuritava aine puhul saadud mõõtmistulemused ei erineks ainete koos kasutamisel oluliselt tulemustest, mis saadaks iga ainega eraldi katse tegemise korral. Eelanalüüsi käigus tuleks veenduda, et iga asjaomane aine on mitme ainega rikastatud söödast ja kala koeproovist tuvastatav i) suure tõhususega (nt > 85 % ulatuses nominaalsest sisaldusest) ja ii) katse läbiviimiseks vajaliku tundlikkusega. Koos analüüsivate ainete summaarne sisaldus peaks olema väiksem kui võimaliku mürgise toime avaldumise summaarne kontsentratsioon (vt punkt 51). Peale selle tuleks katseplaani koostamisel arvesse võtta mitme aine üheaegselt katset kasutamisest tuleneva võivat kahjulikku mõju kaladele ja ainete võimalikku vastastikust toimet (nt metaboolne toime). Ioniseeruvate ainete koos kasutamisest tuleks hoiduda. Käesolev meetod sobib ka keerukate segudega kokkupuute hindamiseks (vt punkt 13; sellise analüüsi puhul kehtivad siiski samad piirangud kui kõikide muude meetodite puhul).

## KATSE NÕUETEKOHASUS

Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused (vt punkt 24):

— veetemperatuuri varieeruvus katserühma(de)s ja kontrollrühmas on väiksem kui  $\pm 2$  °C;

<sup>(1)</sup> Katse käigus tuleks registreerida ka üldpikkus, kuna selle näitaja alusel saab hästi hinnata, kas aine on avaldanud kahjulikku toimet.

**▼ M7**

- lahustunud hapniku sisaldus ei lange alla 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;
- uuritava aine sisaldus kalasöödas enne omastamisetapi algust ja selle lõpus ei erine rohkem kui  $\pm 20$  % (kummalgi ajahetkel võetud vähemalt kolme proovi andmete alusel);
- rikastatud söödaga tehtava eelanalüüsi käigus tuleks tõendada, et aine sisaldus söödas on väga homogeenne; see ei tohiks katse alguses võetud vähemalt kolmes proovis erineda keskväärtusest rohkem kui  $\pm 15$  %;
- uuritav aine peaks rikastamata söödas ja kontrollkalade kudedes olema tuvastamatu või esinema uuritava ainega proovidega võrreldes vaid tüüpilises mikrokoguses;
- suremus või kahjuliku mõju või haiguse osakaal kontroll- ja katserühma kalade hulgas peaks katse lõpus olema  $\leq 10$  %; kui katset mingil põhjusel pikendatakse, peab kahjuliku mõju osakaal kummaski rühmas olema  $\leq 5$  % kuus ja kokku  $\leq 30$  %. Oluline erinevus katserühma(de)st ja kontrollrühmast analüüsimiseks võetud kalade kasvukiiruses võib viidata uuritava aine mürgisele toimele.

**VÕRDLUSAINED**

Kui laboris ei ole asjaomast katset varem läbi viidud või seal on tehtud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalaliik, kalade liin või tarnija, toimunud olulisi muudatusi seoses kalade suuruse, kalasööda või rikastamismeetodiga vms), on soovitatav teha tehnilise pädevuse katse võrdlusainega. Võrdlusainet kasutatakse eelkõige selle kindlakstegemiseks, kas sööda rikastamise meetod sobib uuritava aine maksimaalse homogeensuse ja biosaadavuse tagamiseks. Ühe näitena võib tuua mittepolaarsete hüdrofoobsete ainete puhul võrdlusainena kasutatud heksaklorobenseeni, kuid selle aine ohtlike omaduste tõttu <sup>(1)</sup> tuleks kaaluda mõne muu aine kasutamist, mille kohta on olemas usaldusväärsed omastamist ja biokuhjumist käsitlevad andmed. Võrdlusaine kasutamise korral tuleks katseprotokollis esitada asjaomase aine kohta sama põhiteave kui uuritavate ainete kohta, sealhulgas aine nimetus, puhtus, CASi number, struktuur ja võimaluse korral mürgisust käsitlevad andmed (vt punktid 3 ja 22).

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

Tuleks kasutada veekaudse kokkupuute meetodis kirjeldatud materjale ja seadmeid (vt punkt 26). Tuleks kasutada läbivoolusüsteemi või staatilist uuendamise süsteemi, millega tagatakse lahjendusvee piisava koguse lisamine katsenõudesse. Voolukiirus tuleks registreerida.

**Vesi**

Katses tuleks kasutada sellist vett, nagu on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (vt punktid 27–29). Katsekeskkond peaks olema kirjeldatud viisil iseloomustatud ja selle kvaliteet peaks olema katse vältel püsiv. Selle looduslik tahkete osakeste sisaldus ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks enne katse algust olema võimalikult väike (tahkeid osakesi  $\leq 5$  mg/l; orgaanilise süsiniku üldsisaldus  $\leq 2$  mg/l). Orgaanilise süsiniku üldsisaldust on vaja mõõta üksnes katsevee iseloomustamise käigus enne katse algust (vt punkt 53).

<sup>(1)</sup> Heksaklorobenseen on loetletud Stockholmi konventsiooni A ja C lisas ning püsivaid orgaanilisi saasteaineid käsitleva määruse (EÜ) nr 850/2004 (ELT L 158, 30.4.2004, lk 7) I ja III lisas.



▼ **M7****Toit**

Soovitatakse kasutada müügilolevat kalasööta (ujuvsööt ja/või aeglaselt põhja vajuv granuleeritud sööt), mille puhul on teada vähemalt selle valgu- ja rasvasisaldus. Söödagraanulid peaksid olema ühesuurused, et kokkupuude söödaga oleks tõhusam, st et kalad sööksid rohkem graanuleid, selle asemel et süüa suuremaid tükke ja jätta väikesed tükid alles. Graanulite mõõtmed peaksid vastama kalade suurusele katse alguses (näiteks võib kalade jaoks, kelle üldpikkus on 3–7 cm, kasutada graanuleid läbimõelduga umbes 0,6–0,85 mm ning kalade jaoks, kelle üldpikkus on 6–12 cm, graanuleid läbimõelduga 0,85–1,2 mm). Graanulite suurus võib sõltuvalt kalade kasvust puhastumisetapi alguses muuta. Müügiloleva sööda sobiva koostise näide on esitatud 7. liites. Käesoleva meetodi väljatöötamisel on tavapäraselt kasutatud katsesööta, milles lipiidide üldsisaldus on 15–20 massiprotsenti. Mõnes piirkonnas ei pruugi nii suure lipiidisisaldusega kalasööt olla kättesaadav. Sellisel juhul võib uuringus kasutada väiksema lipiidisisaldusega sööta ja kohandada vajaduse korral söötmissüsteemi, et tagada kalade püsimine tervena (lähtuvalt eelkatsete tulemustest). Lipiidide üldsisaldus tuleb katserühma(de) ja kontrollrühma söödas mõõta ja registreerida enne katse algust ja omastamisetapi lõpus. Katseprotokollis tuleks esitada sööda kaubanduslikult tarnijalt pärit analüüsandmed toitaine-, niiskuse-, kiudaine- ja tuhasisalduse ning võimaluse korral mineraalainete ja pestitsiidijääkide (nt „standardsete“ prioriteetsete saasteainete) sisalduse kohta.

Sööda rikastamisel uuritava ainega tuleks teha kõik, et tagada aine homogeensus katsesöödas. Uuritava aine kontsentratsioon katserühma(de) söödas tuleks valida lähtuvalt analüüsimeetodi tundlikkusest, uuritava aine mürgisusest (tähtsatatava toime puudumise kontsentratsioonist, kui see on teada) ja asjakohastest füüsikalise-keemilistest näitajatest. Võrdlusaine kasutamise korral peaks selle kontsentratsioon olema soovitatavalt umbes 10 % uuritava aine kontsentratsioonist (või igatahes võimalikult väike); seejuures tuleks arvesse võtta analüüsimeetodi tundlikkust (nt heksaklorobenseeni puhul on vastuvõetav sisaldus söödas leitud olevat 1–100 µg/g; lisateave heksaklorobenseeni imendumise tõhususe kohta on esitatud viites 47).

Kalasööta võib uuritava ainega rikastada aine füüsikalistest omadustest ja lahustuvusest sõltuvalt mitmel eri viisil (rikastamismeetodeid on üksikasjalikumalt kirjeldatud 7. liites):

- kui aine on triglütseriidides lahustuv ja püsiv, tuleks see enne kalasöödaga segamist lahustada väikeses koguses kalaõlis või taimses toiduõlis. Sel juhul tuleks jälgida, et valmistatav sööt ei sisaldaks rikastamiseks kasutatava sööda tavapärase lipiidisisaldusega võrreldes liiga palju lipiide; seepärast lisatakse söödale teadaolev minimaalne õlikogus, mis on vajalik uuritava aine jaotumise ja homogeensuse saavutamiseks söödas; või
- sööda rikastamisel tuleks kasutada sobivat orgaanilist lahustit, kui sellega ei vähendata homogeensust ja biosaadavust (on võimalik, et lahusti aurustumise tagajärjel tekivad söödas uuritava aine (mikro)kristallid, ning ei ole hõlbus tõendada, et seda ei ole toimunud; vt viide 49); või
- mitteviskoossed vedelikud tuleks lisada otse kalasööta, kuid neid tuleks hästi segada, et hõlbustada homogeensuse saavutamist ja aine tõhusat imendumist. Tuleks kasutada segamismeetodit, millega tagatakse rikastatud sööda homogeensus.

**▼ M7**

Mõnel üksikul juhul, näiteks vähem hüdrofoobsete ainete puhul, mis söödast suurema tõenäosusega desorbeeruvad, võib olla vaja kasutada valmistatud sööda-graanulite katmiseks väikest kogust maisi- või kalaõli (vt punkt 142). Sel juhul tuleks kontrollrühma sööta töödelda samal viisil ja kasutada lipiidisisalduse mõõtmiseks lõplikult ette valmistatud sööta.

Võrdlusaine kasutamise korral peaksid sellega saadud tulemused olema võrreldavad varem avaldatud andmetega sarnastes tingimustes ja sarnasel söötmissrežiimil tehtud uuringutes (vt punkt 45) ning asjaomase võrdlusainega seotud näitajad peaksid vastama punktis 113 (loetelu kolmas, neljas ja viies taane) esitatud asjakohastele kriteeriumidele.

Kui uuritava aine puhul kasutatakse kandeainena õli või lahustit, tuleks võrreldav kogus sama kandeainet (ilma uuritava aineta) segada ka kontrollrühma söödaga, et tagada selle samaväärsus rikastatud söödaga. Nii omastamis- kui ka puhastumisetapis on oluline anda katsesühma(de) ja kontrollrühma kaladele sama toitväärtusega sööta.

Rikastatud sööta tuleks säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult), ja märkida need tingimused katseprotokollis.

**Kalaliigi valimine**

Võib kasutada veekaudse kokkupuute meetodis määratletud kalaliike (vt punkt 32 ja 3. liide). Enne käesoleva katsemeetodi avaldamist on orgaaniliste ainete teatud toidukaudse bioakumuleerumise uuringutes kasutatud tavaliselt vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), karpkala (*Cyprinus carpio*) ja tüsedat tõmpnina (*Pimephales promelas*). Katsealuse liigi toitumiskäitumine peaks olema selline, et lisatud söödakogus tarbitakse kiirelt ära; sellega tagatakse, et kõikide söödas esineva uuritava aine sisaldust muuta võivate tegurite mõju (nt leostumine vette ja veekaudse kokkupuute võimalus) on minimaalne. Tuleks kasutada soovitatavasse suuruse-/massivahemikku jäävaid kalu (vt 3. liide). Kalad ei tohiks olla nii väikesed, et see takistaks iga kala eraldi analüüsimist. Kiire kasvamise etapis olevate kalade kasutamisel võib andmete tõlgendamine olla raskendatud, samuti võib suur kasvukiirus mõjutada aine imendumistõhususe arvutamist <sup>(1)</sup>

**Kalade pidamine**

Katse eel kohaldatavad kalade kohanemise, suremuse ja haigustega seotud vastuvõtavuse kriteeriumid on samad kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 33–35).

**KATSE KÄIK****Katse-eelne analüüs ja kontsentratsioonivahemiku leidmise katse**

Enne katse läbiviimist on vaja teha analüüs, millega tõendatakse aine tuvastatavust rikastatud söödast või rikastatud kalakudedest. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse sobiva kontsentratsiooni valimiseks ei ole alati vajalik. Võib teha söötmise eelkatseid, et tõendada tähtsat kahjuliku mõju puudumist, hinnata rikastatud sööda maitse sobivust ja analüüsimeetodi tundlikkust kalakudedele ja

<sup>(1)</sup> Omastamisetapis toimuva kiire kasvu korral langeb söötmismäär kokkupuute alguses kehtestatud määra allapoole.

▼ **M7**

sööda puhul, valida sobiv söötmissrežiim ja proovivõtuintervall puhastumisetapis jne; sellised eelkatsed ei ole siiski kohustuslikud. Väärtuslikku teavet võib anda puhastumisetapis võetavate proovide jaoks vajaliku kalade arvu hindamiseks tehtav eeluuring. See võib oluliselt vähendada katses kasutatavate kalade arvu, eriti selliste uuritavate ainete puhul, mis on iseäranis kergesti metaboliseeruvad.

**Kokkupuutetingimused***Omastamisetapi kestus*

Tavaliselt on omastamisetapi piisav kestus 7–14 päeva, mille jooksul ühele kalade rühmale antakse iga päev kontrollsööta ja teisele katsesööta kindlaksmääratud koguses, mis sõltub katsealusest liigist ja katsetingimustest; näiteks vikerforelli puhul on see 1–2 % kehamassist (märgmassi alusel). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Vajaduse korral võib omastamisetapi kestust pikendada lähtuvalt varasemate uuringutega saadud praktilisest kogemusest või andmetest uuritava aine (või selle analoogi) omastamise või sellest puhastumise kohta kalades. Katse alguse hetkeks loetakse rikastatud sööda esmakordse lisamise hetke. Katsepäev kestab söötmise ajast kuni ajani veidi (nt üks tund) enne järgmist söötmist. Seega algab esimene katsepäev rikastatud sööda esmakordse lisamise hetkest ja lõpeb veidi enne rikastatud sööda teistkordse lisamise hetke. Praktikas lõpeb omastamisetapp veidi (nt üks tund) enne uuritava ainega rikastamata sööda esmakordset lisamist, kuna sellele eelneva 24 tunni jooksul jätkavad kalad rikastatud sööda seedimist ja uuritava aine absorbeerimist. On oluline tagada, et organismis saavutatakse uuritava aine piisavalt suur sisaldus (mürgisuse ilmnemiseta), et kasutatava analüüsimeetodiga oleks puhastumisetapis võimalik mõõta ka vähemalt ühe suurusjärgu võrra väiksemat aine sisaldust. Erandjuhul võib omastamisetappi pikendada (kuni 28 päevani) ja võtta omastamiskineetika kirjeldamiseks lisaproove. Aine sisaldus kalas ei pruugi omastamisetapi vältel saavutada statsionaarsele olekule vastavat väärtust. Käesoleva meetodi puhul võib statsionaarse oleku saavutamiseks kuluda aja hindamiseks kasutada samu võrrandeid kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul, et teha kindlaks eeldatav ajavahemik, mille jooksul aine sisaldus kalas jõuab piisavale tasemele (vt 5. liide).

Mõnel juhul võib olla teada, et analüüsimeetodi vähesest tundlikkusest või väikesest aine imendumise tõhususest tulenevalt ei omasta kalad asjaomase söödas kasutatava kontsentratsiooni puhul ainet 7–14 päeva jooksul piisavalt, et selle sisaldus kalas oleks puhastumisetapis toimuva vähemalt ühe suurusjärgu võrra vähenemise järel määratav. Sellisel juhul võib olla kasulik muuta söötmissetapi algset kestust nii, et see oleks pikem kui 14 päeva; teise võimalusena tuleks kaaluda aine sisalduse suurendamist söödas, eelkõige kiirelt metaboliseeruvate ainete puhul. Tuleks siiski jälgida, et omastamisetapis jääks aine sisaldus kalakudedes väiksemaks kui (eeldatav) täheldatava kroonilise toime puudumise kontsentratsioon (vt punkt 138).

*Puhastumisetapi kestus*

Puhastumine kestab üldjuhul kuni 28 päeva ja algab hetkel, mil katserühma(de) kaladele hakatakse omastamisetapi järel andma puhast töötlemata sööta. Puhastumine ei alga kohe pärast viimast söötmist rikastatud söödaga, vaid esimesel rikastamata söödaga söötisel, kuna sellele eelneva 24 tunni jooksul jätkavad kalad sööda seedimist ja uuritava aine absorbeerimist, nagu on märgitud punktis 126. Seepärast võetakse puhastumisetapis esimene proov veidi enne teistkordset söötmist rikastamata söödaga. Nimetatud puhastumisperiod on ette nähtud

▼ M7

selliste ainete uurimiseks, mille eeldatav poolväärtusaeg on kuni 14 päeva – nagu see on bioakumuleeruvatel ainetel <sup>(1)</sup> – ja mille puhul 28 päeva sisse mahub kaks poolväärtusaega. Väga bioakumuleeruvate ainete puhul võib olla kasulik puhastumisetapi kestust pikendada (kui see on eelkatsete põhjal vajalik).

Kui ainest puhastumine on väga aeglane ja täpset poolväärtusaega ei saa puhastumisetapis kindlaks teha, võib saadav teave olla hindamiseks siiski piisav ja viidata ulatuslikule bioakumuleerumisele. Kui aga ainest puhastumine on nii kiire, et ei ole võimalik usaldusväärselt leida aine sisaldust alghetkel ( $C_{0,d}$  – kontsentratsioon omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses) ja  $k_2$  väärtust, võib arvutada konservatiivse hinnangu kohase  $k_2$  väärtuse (vt 7. liide).

Kui kalade analüüsimisest mõnel varasemal ajahetkel (nt 7 või 14 päeva järel) nähtub, et aine sisaldus on langenud enne täispika 28-päevase puhastumisetapi lõppu määramispiirist allapoole, võib järgnevad proovid võtmata jätta ja katse lõpetada.

Mõnel üksikul juhul ei pruugi omastamisperioodi lõpuks (või puhastumisetapis teise proovi võtmise ajaks) olla toimunud aine omastamist mõõdetavas koguses. Kui on võimalik tõendada, et i) punktis 113 esitatud nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud ja ii) mitteomastamine ei tulene katsemeetodiga seotud muudest puudustest (nt omastamisetapi ebapiisav kestus, sööda rikastamise meetodi puudulikkusest põhjustatud vähene biosaadavus, analüüsimeetodi liiga väike tundlikkus, asjaolu, et kalad ei tarbi sööta, vms), võib olla võimalik katse lõpetada, ilma et oleks vaja teha pikema omastamisperioodiga korduskatset. Kui eelanalüüsist nähtub, et tegemist võib olla sellise juhuga, võib olla soovitatav võimaluse korral analüüsida massibilansil põhineva lähenemisviisi raames väljajätteid seedimata uuritava aine suhtes.

*Katsealuste kalade arv*

Nagu veekaudse kokkupuute katse puhul, tuleks siingi valida katsesse sarnase massi ja pikkusega kalad, nii et kõige väiksemate kalade mass oleks vähemalt kaks kolmandikku kõige suuremate kalade massist (vt punktid 40–42).

Uuringus kasutatavate kalade üldarvu kindlaksmääramisel tuleks lähtuda proovivõtukavast (vähemalt üks proov omastamisetapi lõpus ja neli kuni kuus proovi puhastumisetapi vältel, ent sõltuvalt nende etappide kestusest) ning võtta arvesse analüüsimeetodi tundlikkust, omastamisetapi lõpuks eelduste kohaselt saavutatavat sisaldust (varasemate andmete alusel) ja puhastumisetapi kestust (kui varasemad andmed võimaldavad seda hinnata). Igal proovivõtmisel tuleks valida viis kuni kümme kala ning mõõta enne kemikaali või lipiidide sisalduse määramist kasvu iseloomustavad näitajad (mass ja üldpikkus).

Tulenevalt suuruse, kasvukiiruse ja füsioloogiliste näitajate loomulikust varieeruvusest kalade hulgas ning iga kala tarbitava söödakoguse tõenäolisest varieeruvusest tuleks igal proovivõtmisel valida katserühmast vähemalt viis kala ja kontrollrühmast samuti vähemalt viis kala, et oleks võimalik teha nõuetekohaselt kindlaks aine sisalduse keskvärtus ja varieeruvus. Kasutatavate kalade hulgas täheldatav varieeruvus moodustab katses esinevast üldisest kontrollimatust varieeruvusest tõenäoliselt suurema osa kui kohaldatavatele analüüsimeetoditele omane varieeruvus, mistõttu mõnel juhul on põhjendatud kuni kümne kala kasutamine igas proovivõtupunktis. Kui uuritava aine taustsisaldus kontrollrühma kalades ei ole puhastumisetapi alguses tuvastatav, võib piisata kemikaali määramisest vaid kahes-kolmes kontrollrühma kalas üksnes viimases proovivõtupunktis, eeldusel, et kontrollrühma ülejäänud kaladel mõõdetakse kõikides proovivõtupunktides mass ja üldpikkus (nii et kasvu hindamiseks valitakse katserühma(de)s ja kontrollrühmas proovi sama arv kalu). Kalu tuleks säilitada ning mõõta eraldi iga kala mass ja üldpikkus (ka juhul, kui proovide andmed on vaja hiljem ühte koondata).

<sup>(1)</sup> Veekaudse kokkupuute katses on 14 päeva pikkusele poolväärtusajale vastav BCFi väärtus 1 g kaaluvate kalade kasutamisel umbes 10 000 l/kg ja vastav omastamiskiirus umbes 500 l/kg päevas (vastavalt võrrandile, mille on avaldanud Sijm *et al.* (46)).

▼ **M7**

See tähendab, et standardkatse puhul, kus kasutatakse näiteks 28 päeva pikkust puhastumisetappi ja selle aja jooksul võetakse viis proovi, valitakse katserühmast kokku 59–120 kala ja kontrollrühmast 50–110 kala, kui aine analüüsimise meetod võimaldab määrata samal kalal ka lipiidisisalduse. Kui samal kalal ei ole võimalik määrata korraga nii lipiidide kui ka kemikaali sisaldust ja lipiidisisalduse määramine üksnes kontrollrühma kaladel ei ole samuti teostatav (vt punkt 56), läheb vaja veel 15 kala (kolm kala lähtepopulatsioonist katse alguses ning kontrollrühmast ja katserühmast kummastki kolm kala nii puhastumisetapi alguses kui ka katse lõpus). Proovivõtmise näidisajakava koos kalade arvuga on esitatud 4. liites.

*Biomassisaldus*

Ühe kala kohta tuleks kasutada samasugust suurt veekogust nagu veekaudse kokkupuute meetodi puhul (vt punktid 43 ja 44). Ehkki käesoleva katsemeetodi puhul ei sõltu kokkupuutekontsentratsioon ühe kala kohta kasutatavast veekogusest, on lahustunud hapniku nõuetekohase sisalduse säilitamise ja katseorganismide stressi minimeerimise huvides soovitatav lisatav kalade kogus 0,1–1,0 g (märgmass) liitri vee kohta päevas.

*Katsesööt ja söötmine*

Kohanemisperioodi jooksul tuleks kalu sööta eespool kirjeldatud sobiva söödaga (punkt 117). Kui katse tehakse läbivoolurežiimis, tuleks veevool kalade söötmise ajaks peatada.

Katse ajal tuleks katserühma(de)s kasutada eespool kirjeldatud sööta (punktid 116–121). Soovitud rikastamisjärgse kontsentratsiooni valimisel tuleks peale konkreetse uuritava ainega seotud tegurite, analüüsimeetodi tundlikkuse, asjaomaste keskkonnatingimuste juures söödas saavutatava eeldatava sisalduse ja organismis kroonilise mürgisuse avaldumise kontsentratsiooni võtta arvesse ka sööda maitseomadusi (et kalad ei hoiduks seda söömast). Rikastamisel saavutatav uuritava aine nominaalne kontsentratsioon tuleks esitada katseprotokollis. Kogemustest ilmneb, et selliste uuritavate ainete puhul, millel puudub konkreetne mürgisuse avaldumise mehhanism, jääb praktikas kasutatav rikastamisjärgne kontsentratsioon vahemikku 1–1 000 µg/g. Mittespetsiifilise toimetehhanismiga ainete puhul ei tohiks ainejääkide sisaldus kudedes olla suurem kui 5 µmol grammi lipiidide kohta, kuna on tõenäoline, et sellest suurema jääkide sisalduse juures ilmneb aine krooniline mõju (19, 48, 50) <sup>(1)</sup>. Muude ainete puhul tuleks jälgida, et kumulatiivne kokkupuude ei põhjustaks mingit kahjulikku mõju (vt punkt 127). Seda tuleb eriti silmas pidada juhul, kui katses kasutatakse üheaegselt mitut ainet (vt punkt 112).

Kalasööda rikastamiseks sobiva koguse uuritava ainega võib kasutada ühte kolmest meetodist, mida on kirjeldatud punktis 119 ja 7. liites. Sööda rikastamiseks kasutatud meetodid tuleks esitada katseprotokollis. Kontrollrühma kalu söödetakse töötlemata söödaga, mis sisaldab sobivas koguses õli, kui seda kasutatakse kandeaianena omastamisetapis antavas rikastatud söödas, või uuritava aineta lahustit, kui katserühma sööda valmistamisel kasutatakse kandeaianena lahustit. Töödeldud ja töötlemata söödas tuleks uuritava aine sisaldus määrata analüütiliselt enne omastamisetapi algust ja selle lõpus vähemalt kolmes paralleelis. Pärast kokkupuudet töödeldud söödaga (omastamisetapp) söödetakse kummagi rühma kalu töötlemata söödaga (puhastumisetapp).

Kalade söötmisel kasutatakse kindlaksmääratud söödakogust (sõltuvalt liigist; näiteks vikerforelli puhul on see umbes 1–2 % kala märgmassist päevas). Sööda kogus valitakse nii, et ei toimuks kiiret kasvu ega lipiidisisalduse olulist suurenemist. Katses kasutatud täpne söötmissrežiim tuleks registreerida. Algselt tuleks söötmisel aluseks võtta lähtepopulatsioonis vahetult enne katse algust tehtud plaanilise kaalumise tulemused. Sööda kogust tuleks muuta lähtuvalt

<sup>(1)</sup> Kuna aine tegelikku sisaldust organismis on võimalik mõõta alles pärast katse läbiviimist, on vaja leida aine hinnanguline eeldatav sisaldus organismis (näiteks lähtuvalt eeldatavast BMFst ja aine sisaldusest söödas; vt 5. liide, võrrand A5.8).

▼ **M7**

igal proovivõtmisel valitud kalade märgmassist, et võtta arvesse kalade kasvu katse vältel. Katse- ja kontrollnõudes olevate kalade massi ja pikkust saab hinnata igal proovivõtmisel valitud kalade massi ja üldpikkuse põhjal; katse- ja kontrollnõudesse jäänud kalu ei kaaluta ega mõõdeta. On oluline kasutada kogu katse vältel sama kindlaksmääratud söötmissrežiimi.

Söömist tuleks vaadelda, et olla kindel, et kalad tarbivad nähtavalt ära kogu lisatud sööda ja et sellest tulenevalt kasutatakse arvutustes õiget sööda tarbimise määra. Sellise söötmissrežiimi valimisel, mille puhul on tagatud kord päevas antava sööda täielik äratarbimine, tuleks tugineda söötmise eelkatsete tulemustele või varasemale kogemusele. Kui sööt jäetakse pidevalt söömata, võib olla soovitatav hajutada iga katsepäeva söödakogust ühe söötmiskorra lisamisega (näiteks asendada kord päevas toimuv söötmine kaks korda päevas toimuva poole väiksema koguse söötmisega). Sellise vajaduse korral peaks teine söötmine toimuma kindlal kellaajal ja olema ajastatud nii, et ajavahemik söötmisest kalaproovi võtmiseni on võimalikult pikk (näiteks toimub teine söötmine katsepäeva esimeses pooles).

Ehkki üldjuhul tarbivad kalad sööda kiiresti ära, on oluline tagada, et aine jääks söödale adsorbeerunuks. Tuleks teha jõupingutusi, et hoida ära uuritava aine dispergeerumist söödast vette ja sellest tulenevat kalade veekaudset kokkupuudet uuritava ainega lisaks toidukaudsele kokkupuutele. Seda on võimalik saavutada nii, et kogu söömata jäänud sööt (ja väljaheited) eemaldatakse katse- ja kontrollnõudest ühe tunni, kuid soovitatavalt 30 minuti jooksul pärast söötmist. Peale selle võib kasutada süsteemi, mille puhul vett puhastatakse pidevalt aktiivsöefiltri abil, mis absorbeerib kõik „lahustunud“ saasteained. Abi võib olla ka läbivoolusüsteemist, kus toiduosakesed ja lahustunud ained uhutakse kiiresti välja<sup>(1)</sup>. Mõnel juhul võivad aidata seda probleemi leevendada väikesed muudatused rikastatud sööda valmistamise meetodis (vt punkt 119).

*Valgus ja temperatuur*

Nagu veekaudse kokkupuute meetodis (vt punkt 48), soovitatakse siingi kasutada 12–16 tunni pikkust valgustusperioodi ja katsealuse liigi jaoks sobivat temperatuuri ( $\pm 2$  °C) (vt 3. liide). Kasutatava valguse liik ja omadused peaksid olema teada ja need tuleks registreerida.

*Kontrollid*

Tuleks kasutada ühte kontrollrühma, mille kaladele antakse sama kogus sööta kui katserühma kaladele, kuid mille söödas puudub uuritav aine. Kui katserühma sööda rikastamisel kasutatakse kandainena lahustit, tuleks kontrollrühma sööta töödelda täpselt samal viisil, kuid ilma uuritava aineta, nii et nende rühmade sööt oleks võrreldava koostisega (vt punktid 121 ja 139).

<sup>(1)</sup> Uuritava aine esinemist katselahuses kaladest eritumise või söödast leostumise tõttu ei pruugi olla võimalik täielikult ära hoida. Seepärast on üks võimalus määrata aine sisaldus vees omastamisetapi lõpus, eriti poolstaatilise režiimi kasutamise korral, et aidata kindlaks teha, kas veekaudne kokkupuude on aset leidnud.

▼ **M7****Vee kvaliteediga seotud mõõtmiste sagedus**

Veekaudse kokkupuute meetodis kirjeldatud tingimusi kohaldatakse ka siin; ainsa erinevusena on orgaanilise süsiniku üldsisaldust vaja mõõta üksnes katse eel katsevee iseloomustamise käigus (vt punkt 53).

**Kala- ja söödaproovide võtmine ja analüüs***Söödaproovide analüüs*

Katse- ja kontrollsööda proovides tuleks uuritava aine ja lipiidide sisaldus määrata vähemalt enne omastamisetapi algust ja selle lõpus vähemalt kolmes paralleelis. Sööda homogeensuse tagamiseks kasutatud analüüsimeetodid tuleks esitada katseprotokollis.

Uuritava aine analüüsimiseks proovis tuleks kasutada üldlevinud valideeritud meetodit. Enne katse alustamist tuleks teha eeluuringud, et selgitada välja määramispiir, protsentuaalne tuvastamise tõhusus, segavad tegurid ja analüütiliselt tuvastatav varieeruvus kavandatavas proovi materjalis. Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, tuleks lähtuda samadest kaalutlustest kui veekaudse kokkupuute meetodis, ainult et vee analüüsimise asemel analüüsitakse sööta (vt punkt 65).

*Kalaproovide analüüs*

Igal kalaproovide võtmisel valitakse uuritava ainega kokku puutuvast rühmast ja kontrollrühmast 5–10 isendit (mõnel juhul võib kontrollrühma kalade arv olla väiksem; vt punkt 134).

Proovivõtmine peaks igal katsepäeval toimuma samal ajal (söötmisajaga võrreldes) ja olema ajastatud nii, et omastamisetapi ajal ja puhastumisetapi algusjärgus oleks soolestikku jäänud toidu esinemise tõenäosus võimalikult väike ning uuritava aine üldsisalduse andmetes ei oleks seepärast vaja kahelda (st proovivõtmiseks valitud kalad tuleks eemaldada katsepäeva lõpus; seejuures tuleks meeles pidada, et katsepäev algab söötmise hetkel ja lõpeb järgmise söötmise hetkel umbes 24 tundi hiljem; puhastumine algab rikastamata sööda esmakordse lisamise hetkel; vt punkt 128). Puhastumisetapi esimene proov, mis võetakse veidi enne teistkordset rikastamata söödaga söötmist, on oluline põhjusel, et sellest mõõtmisest ühe päeva võrra tagasi ekstrapoleerimise teel leitakse aine eeldatav sisaldus alghetkel ( $C_{0,d}$  – kontsentratsioon kalas omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses). Soovi korral võib omastamisetapi lõpus ning puhastumisetapi esimesel ja kolmandal päeval eemaldada kala seedekulgla ja seda eraldi analüüsida.

Kalad tuleks igal proovivõtmisel kummagi rühma nõudest eemaldada ja käidelda neid samal viisil, nagu on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (vt punktid 61–63).

Nii katse- kui ka kontrollrühmas mõõdetakse uuritava aine sisaldust terves kalas (märgmassi alusel) vähemalt omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi kestel. Puhastumisetapis soovitatakse võtta proove neljal kuni kuuel korral (nt 1, 3, 7, 14 ja 28 päeva möödudes). Soovi korral võib 1–3 päeva kestnud omastamise järel võtta ühe lisaproovi, et hinnata imendumistõhusust kokkupuute algusjärgu põhjal, mil aine omastamine kalades on lineaarne. Kaks peamist võimalikku kõrvalekaldumist proovivõtukavast on järgmised: i) kui omastamisetappi pikendatakse, et analüüsida omastamiskineetikat, võetakse omastamisetapis proove sagedamini ja seega tuleb katses kasutada suuremat arvu kalu (vt punkt 126); ii) katse lõpetatakse omastamisetapi lõpus, kuna ainet ei ole mõõdetavas koguses

▼ **M7**

omastatud (vt punkt 131). Kasvu kiiruskonstandi leidmiseks tuleks mõõta iga proovivõtmiseks valitud kala mass (ja üldpikkus). Omastamisetapi lõpus ja puhastamisetapi valitud aegadel võib määrata ka aine sisalduse konkreetsetes kalakudedes (söödav ja mittedööv osa). Kui katses kasutatakse radioaktiivselt märgistatud ainet, tuleks lähtuda samadest kaalutlustest kui veekaudse kokkupuute meetodis, ainult et vee analüüsimise asemel analüüsitakse sööta (vt punkt 65).

Kui aeg-ajalt kasutatakse võrdlusainet (vt punkt 25), on katserühmas soovitatav määrata selle sisaldus omastamisetapi lõpus ja kõikides uuritava aine puhul kasutatavates puhastamisetapi proovivõtupunktides (terve kala alusel); kontrollrühmas on võrdlusaine sisaldus vaja määrata üksnes omastamisetapi lõpus (terve kala alusel). Teatavas olukorras (näiteks kui uuritava aine ja võrdlusaine puhul kasutatavad analüüsimeetodid on omavahel sobimatud ja proovivõtukavast kinni pidamiseks tuleks kasutada suuremat arvu kalu) võib täiendavalt vaja minevate kalade arvu minimeerimiseks kasutada teistsugust lähenemisviisi: võrdlusaine sisaldust mõõdetakse üksnes puhastamisetapis selle esimesel ja kolmandal päeval ning veel kahes proovivõtupunktis, mis on valitud nii, et oleks võimalik usaldusväärselt hinnata võrdlusaine sisaldust alghetkel ( $C_{0,d}$ ) ja võrdlusaine  $k_2$ .

Võimaluse korral tuleks igal proovivõtmisel või vähemalt omastamisetapi alguses ja lõpus ning puhastamisetapi lõpus määrata iga kala lipiidisisaldus (vt punktid 56 ja 67). Kasutatavast analüüsimeetodist sõltuvalt (vt punkt 67 ja 4. liide) võib olla võimalik kasutada lipiidisisalduse ja uuritava aine sisalduse määramiseks sama kala. See on kalade arvu minimeerimise seisukohast soovitatav. Kui see ei ole aga võimalik, võib kasutada lähenemisviisi, mida on kirjeldatud veekaudse kokkupuute meetodis (kõnealuseid alternatiivseid võimalusi lipiidisisalduse mõõtmiseks on käsitletud punktis 56). Lipiidisisalduse kvantifitseerimiseks kasutatud meetod tuleks esitada katseprotokollis.

*Analüüsimeetodi kvaliteet*

Tuleks katseliselt veenduda, et konkreetse aine analüüsimise meetodi spetsiifilisus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning tulemuste reprodutseeritavus, samuti uuritava aine tuvastamise tõhusus sööda- ja kalaproovides on piisavad.

*Kalade kasvu mõõtmine*

Katse alguses tuleb määrata lähtepopulatsioonist võetud proovis olevate kalade mass ja üldpikkus. Kõnealune proov tuleks võtta veidi (nt üks tund) enne esmakordset rikastatud söödaga söötmist ja lugeda see võetuks katse nullpäeval. Kalade arv selles proovis peaks olema vähemalt sama suur kui katse vältel võetavates proovides. Mõni neist kaladest võib olla seesama, keda kasutatakse lipiidisisalduse määramiseks enne omastamisetapi algust (vt punkt 153). Igal proovivõtmisel mõõdetakse kõigepealt kalade mass ja pikkus. Iga üksiku proovivõtmiseks valitud kala puhul tuleks mõõdetud mass ja pikkus kokku viia määratud uuritava kemikaali sisaldusega (ja vajaduse korral lipiidisisaldusega), näiteks kordumatu tunnuskoodi abil. Kõnealustel valitud kaladel mõõdetud väärtusi saab kasutada katse- ja kontrollnõudesse jäänud kalade massi ja pikkuse hindamiseks.

**Vaatlused katse ajal**

Iga päev tuleks vaadelda suremust ja andmed registreerida. Tuleks teha lisavaatlusi kahjuliku mõju, näiteks ebanormaalse käitumise või pigmenteerumise tuvastamiseks ning tulemused registreerida. Kala loetakse surnuks, kui tal ei täheldata hingamisliigutusi ja ta ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale. Kõik surnud või selgelt surmaeelses seisundis kalad tuleks eemaldada.



▼ **M7****ANDMED JA ARUANDLUS****Andmete töötlemine**

Katse tulemusi kasutatakse puhastumise kiiruskonstandi ( $k_2$ ) leidmiseks kalade märgmassi põhjal. Kalade massi suurenemise keskmisest määra-st lähtuvalt arvutatakse kasvu kiiruskonstant  $k_g$ , mida vajaduse korral kasutatakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi  $k_{2g}$  leidmiseks. Peale selle tuleks esitada imendumistõhusus (absorbeerumine soolestikus;  $a$ ), kineetiline biokuhjumistegur ( $BMF_K$ ) (vajaduse korral kasvu suhtes korrigeerituna –  $BMF_{Kg}$ ), selle väärtus lipiidisisalduse suhtes korrigeerituna ( $BMF_{KL}$ ) või nii kasvu kui ka lipiidisisalduse suhtes korrigeerituna ( $BMF_{KgL}$ ) ning söödatarbimise kiirus. Samuti võib juhul, kui on võimalik hinnata stacionaarse oleku saavutamiseks kuluvat aega (nt 95 % stacionaarsele olekule vastavast väärtusest ehk  $t_{95} = 3,0 / k_2$ ), esitada ka stacionaarsele olekule vastava BMFi ( $BMF_{SS}$ ) hinnangulise väärtuse (vt punktid 105 ja 106 ning 5. liide), kui  $t_{95}$  väärtusest nähtub, et katses võidi saavutada stacionaarne olek. Kõnealuse  $BMF_{SS}$ -i puhul tuleks lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtuse ( $BMF_{SSL}$ ) saamiseks korrigeerida seda lipiidisisalduse suhtes samal viisil kui kineetilist BMF-i ( $BMF_K$ ) (tuleb märkida, et stacionaarsele olekule vastava BMF-i korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes puudub kokkulepitud metoodika). Valemid ja näidisarvutused on esitatud 7. liites. On välja töötatud lähenemisviisid, mis võimaldavad hinnata kineetilise biokontsentratsiooniteguri ( $BCF_K$ ) väärtust lähtuvalt toidukaude kokkupuute uuringu andmetest. Seda on käsitletud 8. liites.

*Kalade massi- ja pikkuse andmed*

Igal perioodil mõõdetud iga kala märgmass ja pikkus kantakse tabelisse iga omastamisetapi proovivõtupäeva ning katserühma(de) ja kontrollrühma kohta eraldi (lähtepopulatsiooni andmed omastamisetapi alguses; kontrollrühma ja katserühma(de) andmed omastamisetapi lõpus ning vastavate proovide olemasolu korral omastamisetapi algusjärgus (nt 1.–3. päeval) ja puhastumisetapis (nt 1., 2., 4., 7., 14. ja 28. päeval)). Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimiseks tuleks kasvunäitajana eelistatavalt kasutada massi. Meetod(id), mida kasutatakse andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes, on esitatud allpool punktides 162 ja 163 ning 5. liites.

*Andmed uuritava aine sisalduse kohta kalas*

Katserühma(de) ja kontrollrühma igas kalas (või kui igas kalas eraldi määramine ei ole võimalik, siis kalade koondproovis) tehtud uuritava aine jääkide mõõtmise tulemused, mis on väljendatud sisaldusena massiühikutes märgmassi ühiku kohta, kantakse tabelisse iga proovivõtukorra kohta. Kui iga proovivõtmiseks valitud kala on analüüsitud lipiidisisalduse suhtes, saab iga kala kohta leida ja tabelisse kanda lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud sisalduse, mis arvutatakse lähtuvalt lipiidide massiosast.

— Igas kalas (või kui igas kalas eraldi määramine ei ole võimalik, siis kalade koondproovis; vt punkt 66) tehtud uuritava aine jääkide mõõtmise tulemused puhastumisperioodi kohta naturaallogaritmakse ja kantakse graafikule päevades väljendatud aja funktsioonina. Kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt väärtuste esinemist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usaldusväärset väärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta.

— Vähimruutude meetodil arvutatakse naturaallogaritmide kontsentratsiooni ja päevades väljendatud puhastumisaja lineaarne korrelatsioon. Saadud sirge tõus ja algordinaat esitatakse puhastumise üldise kiiruskonstandina ( $k_2$ ) ja naturaallogaritmide eeldatava sisaldusena alghetkel ( $C_{0,d}$ ) (üksikasjalikum teave on esitatud 5. ja 7. liites). Kui see ei ole võimalik, sest aine sisaldus on puhastumisetapi teises proovis langenud määramispiirist allapoole, võib leida  $k_2$  konservatiivse hinnangulise väärtuse (vt 7. liide).

— Standardsete statistiliste meetoditega arvutatakse sirge tõusu ja algordinaadi väärtuste hajuvus ning leitakse ja esitatakse tulemuste usaldusvahemik usaldusnivool 90 % (või 95 %).

▼ M7

- Samuti arvutatakse omastamisetapi viimasel päeval kalades mõõdetud aine sisalduse ( $C_{0,m}$  – mõõdetud sisaldus alghetkel) keskvärtus ja võrreldakse seda eeldatava väärtusega  $C_{0,d}$ . Kui eeldatav väärtus on väiksem kui mõõdetud väärtus, võib see viidata seedimata jäänud rikastatud sööda esinemisele soolestikus. Kui eeldatav väärtus on mõõdetud väärtusest väga palju suurem, võib see viidata asjaolule, et puhastumisandmete lineaarse regressiooni teel leitud väärtus ei ole õige ja seda tuleks uuesti hinnata (vt 7. liide).

*Puhastumiskiirus ja biokuhjumistegur*

Katseandmete alusel biokuhjumisteguri arvutamiseks tuleks kõigepealt leida imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus;  $\alpha$ ). Selleks tuleks kasutada 7. liites esitatud võrrandit A7.1, mille puhul on vaja teada aine eeldatavat sisaldust kalades puhastamisetapi alghetkel ( $C_{0,d}$ ), (üldist) puhastumise kiiruskonstanti ( $k_2$ ), aine sisaldust söödas ( $C_{sööd}$ ), söödatarbimise kiiruskonstanti ( $I$ ) ja omastamisetapi kestust ( $t$ ). Nagu eespool kirjeldatud, esitatakse naturaalloogaritmitud kontsentratsiooni ja puhastumisaja lineaarse korrelatsiooni sirge tõus ja algordinaat puhastumise üldise kiiruskonstandina ( $k_2 = \text{tõus}$ ) ja sisaldusena alghetkel ( $C_{0,d} = e^{\text{algordinaat}}$ ). Tuleks kontrollida saadud väärtuste bioloogilist usutavust (näiteks ei tohiks osakaaluna väljendatav imendumistõhusus olla suurem kui 1).  $I$  leidmiseks jagatakse iga päev kaladele antava sööda mass kalade summaarse massiga (kui sööda kogus on 2 % kehamassist, on  $I$  väärtus 0,02). Arvutamisel kasutatavat söötmismäära võib siiski olla vaja kohendada, et võtta arvesse kalade kasvu (kalade massi hindamiseks omastamisetapi igal ajahetkel võib kasutada teadaolevat kasvu kiiruskonstanti; vt 7. liide). Kui  $k_2$  ja  $C_{0,d}$  leidmine ei ole võimalik, näiteks seetõttu, et aine sisaldus on puhastamisetapi teises proovis langenud määramispiirist allapoole, võib arvutada  $k_2$  ja maksimaalse  $BMF_k$  konservatiivse hinnangulise väärtuse (vt 7. liide).

Pärast imendumistõhususe ( $\alpha$ ) leidmist saab biokuhjumisteguri arvutamiseks korrutada  $\alpha$  söödatarbimise kiiruskonstandiga ( $I$ ) ja jagada puhastumise (üldise) kiiruskonstandiga ( $k_2$ ). Kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur arvutatakse samal viisil, ent sel juhul kasutatakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstanti ( $k_{2g}$ ; vt punktid 162 ja 163). Teise võimalusena saab imendumistõhusust hinnata omastamisetapi varases, lineaarse omastamise järgus võetud kalakudede analüüsi põhjal; vt punkt 151 ja 7. liide. Nii saadakse sõltumatu hinnanguline imendumistõhususe väärtus, mis iseloomustab organismi, kes ei ole sisuliselt ainega veel kokku puutunud (st kaladel on omastamisetapi algusest möödunud vähe aega).  $BMF_i$  leidmiseks kasutatakse tavaliselt puhastumisandmete põhjal hinnatud imendumistõhusust.

*Lipiidisalduse ja kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimine*

Kalade kasv puhastamisetapi jooksul võib vähendada kalades mõõdetavat aine sisaldust, mistõttu puhastumise üldise kiiruskonstandi  $k_2$  väärtus võib olla suurem kui väärtus, mis tuleneb üksnes aine kõrvaldamisest näiteks metabolismi ja roojamise käigus (vt punkt 72). Katserühma kalade lipiidisisaldus (millel on tugev seos hüdrofoobsete ainete bioakumuleerumisega) ja sööda lipiidisisaldus võib praktikas nii palju varieeruda, et biokuhjumisteguri esitamiseks mõtestatud kujul on vaja seda korrigeerida. Biokuhjumistegurit tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes (samuti kui veekaudse kokkupuute meetodi puhul korrigeeritakse kineetilist  $BCF_i$ ) ning lipiidisisalduse suhtes lähtuvalt sööda ja kalade lipiidisisalduse suhtarvust (lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur). Selliste arvutuste jaoks kasutatavad võrrandid ja asjakohased näited on esitatud vastavalt 5. ja 7. liites.

Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimiseks tuleks arvutada kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant ( $k_{2g}$ ; võrrandid on esitatud 5. liites). Seejärel leitakse kõnealuse konstandi  $k_{2g}$  abil kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur samal viisil, nagu on kirjeldatud punktis 73. Mõnel juhul ei ole sellise lähenemisviisi kasutamine võimalik. Teise lähenemisviisina, mis ei nõua

▼ **M7**

korrigeerimist kasvust tingitud lahjenemise suhtes, kasutatakse puhastumisandmetena mitte tavapäraselt uuritava aine massi kala massiühiku kohta (kontsentratsioon), vaid uuritava aine massi kala kohta (terve kala alusel). See peaks olema hõlpsalt teostatav, kuna käesoleva katsemetodi kohaste katsete puhul peaks aine registreeritud sisaldus iga üksiku kala kudedes olema seostatav asjaomase kala massiga. Lihtsat meetodit selle lähenemisviisi kasutamiseks on tutvustatud 5. liites. Tuleb meeles pidada, et ka kõnealuse alternatiivse lähenemisviisi puhul tuleks leida ja esitada  $k_2$  väärtus.

Kui lipiidisisaldust ei ole määratud kõikides proovivõtmiseks valitud kalades, arvutatakse sööda ja kalade lipiidisisalduse suhtes korrigeerimiseks lipiidide keskmine massiosa kalades ja söödas <sup>(1)</sup>. Seejärel leitakse lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur ( $L_c$ ) kalas sisalduvate lipiidide keskmise osakaalu jagamisel söödas sisalduvate lipiidide keskmise osakaaluga. Lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud biokuhjumisteguri arvutamiseks jagatakse korrigeerimata või vajaduse korral kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise teguriga.

Kui igas proovivõtupunktis on nii kemikaali kui ka lipiidide sisaldus määratud samal kalal, võib lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud BMFi arvutada otse asjaomase kala lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud koeandmete põhjal (vt viide 37). Lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud kontsentratsiooniandmete graafik võimaldab leida  $k_2$  ja lipiidisisaldusest lähtuva  $C_{0,d}$ . Sellele järgnevas matemaatilises analüüsis võib kasutada 7. liites esitatud võrrandeid selle erinevusega, et imendumistõhususe ( $a$ ) arvutamiseks kasutatakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud söödatarbimise kiiruskonstanti ( $I_{lipiid}$ ) ja lipiidisisaldusest lähtuvat aine sisaldust söödas ( $C_{sööd-lipiid}$ ). Seejärel kasutatakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtusi samal viisil, et leida BMF (tuleb meeles pidada, et nii lipiidisisalduse kui ka kasvu suhtes korrigeeritud  $BMF_{KGL}$  arvutamiseks tuleks kasvu kiiruskonstandiga korrigeerimisel samuti lähtuda kala märgmassi asemel lipiidide osakaalust).

### Tulemuste tõlgendamine

Mürgise toime välistamiseks ei tohiks keskmine kasvukiirus kontrollrühmas ja katserühma(de)s olla märkimisväärselt erinev. Kõnealuse kahe rühma kalade kasvu kiiruskonstantide või kasvukõverate võrdlemiseks tuleks kasutada sobivat meetodit <sup>(2)</sup>.

### Katseprotokoll

Pärast katse lõppemist koostatakse katse lõpp-protokoll, mis sisaldab punktis 81 loetletud teavet uuritava aine, katsealuse liigi ja katsetingimuste kohta (nagu veekaudse kokkupuute meetodi puhul). Peale selle on nõutav järgmine teave.

*Uuritav aine:*

— kõik andmed uuritava aine püsivuse kohta valmistatud söödas.

<sup>(1)</sup> Seda lähenemisviisi kasutatakse üksnes toidukaude kokkupuute puhul ja see erineb veekaudse kokkupuute puhul järgitavast meetodist, mistõttu segaduse vältimiseks on mõiste „normaliseerimine“ asemel kasutatud mõistet „korrigeerimine“ – vt ka joonealune märkus punktis 106.

<sup>(2)</sup> Kasvu kiiruskonstantide puhul võib kohaldada  $t$ -testi, et kontrollida, kas kasv kontroll- ja katserühma(de)s on erinev; dispersioonanalüüsi puhul võib kasutada  $F$ -testi. Vajaduse korral võib sobiva kasvumudeli valimise hõlbustamiseks kasutada  $F$ -testi või tõepärasuhte testi (OECD monograafia 54 (32)).

▼ M7*Katsetingimused:*

- aine nominaalne sisaldus söödas, rikastamismeetod, sööda rikastamisel kasutatud (lipiidse) kandeaine kogus (kui on kasutatud), uuritava aine mõõdetud sisaldus rikastatud söödas igal mõõtmiskorral (vähemalt kolm paralleeli enne katse algust ja omastamisetapi lõpus) ja vastavad keskväärtused;
- sööda rikastamise juures kandeainena õli või lahusti kasutamise korral selle liik ja kvaliteet (puhtusaste, tarnija jne);
- kasutatud sööda liik (Weende analüüsi <sup>(1)</sup>) andmed, klass või kvaliteet, tarnija jne), söötmissagedus omastamisetapis, antud sööda kogus ja söötmissagedus (sealhulgas kõik muudatused lähtuvalt proovivõtmiseks valitud kalade massist);
- kemikaali analüüsimiseks kalade kogumise ja humaanse surmamise aeg igas proovivõtupunktis (näiteks üks tund enne järgmise päeva söötiskorda).

*Tulemused:*

- kõikide tehtud eeluuringute tulemused;
- teave mis tahes täheldatud kahjuliku mõju kohta;
- kemikaali analüüsimise meetodite täielik kirjeldus, sealhulgas avastamis- ja määramispiir, meetodist tulenev varieeruvus ning tuvastamise tõhusus;
- söödas (rikastatud ja kontrollisöödas) mõõdetud lipiidisisalduse üksikväärtused, keskvärtus ja standardhälve;
- tabeli kujul esitatud andmed nii kontrollrühma kui ka katserühma(de) kalade massi (ja pikkuse) kohta, mis on seostatud konkreetse kalaga (näiteks igale kalale antud kordumatu tunnuskoode abil), ning arvutuskäik kasvu kiiruskonstandi ja usaldusnivoole 95 % vastava usaldusvahemiku leidmiseks;
- tabeli kujul esitatud andmed uuritava aine sisalduse kohta kalas, omastamisetapi lõpus mõõdetud sisalduse keskvärtus ( $C_{0,m}$ ), leitud (üldine) puhastumise kiiruskonstant ( $k_2$ ), sisaldus kalas puhastumisetapi alguses ( $C_{0,d}$ ) ja nende väärtuste hajuvus (tõus ja algordinaat);
- tabeli kujul esitatud andmed kalade lipiidisisalduse kohta (vajaduse korral kõrvutatuna aine sisaldusega asjaomases kalas) ning vastavad keskvärtused katserühma(de)s ja kontrollrühmas katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus;
- kõverad, mis hõlmavad kõiki mõõtmisandmeid ja väljendavad järgmisi näitajaid (vajaduse korral võib kontsentratsiooni väljendada kala terve keha või selle konkreetsete kudede massi alusel):
  - kasv, st kalade massi (ja pikkuse) muutus ajas või naturaallogaritmitud massiandmete muutus ajas;

<sup>(1)</sup> Sööda analüüsimise meetod valgu-, lipiidi-, toorkiu- ja tuhasisalduse määramiseks; see teave saadakse tavaliselt sööda tarnija käest.

▼ **M7**

- uuritavast ainest puhastumine kalades; ning
- naturaallagaritmitud kontsentratsioonandmete muutus ajas puhastumise-tapi vältel (sealhulgas leitud puhastumise kiiruskonstant  $k_2$  ja aine natu-raalagaritmitud eeldatav sisaldus kalas puhastumisetapi alguses –  $C_{0,d}$ );
- kui graafiku visuaalsel hindamisel täheldatakse selgelt võõrväärtuste esine-mist, võib kahtlaste andmepunktide väljajätmiseks kasutada statistiliselt usal-dusväärset võõrväärtuste testi ja esitada dokumenteeritud põhjenduse selliste andmepunktide väljajätmise kohta;
- arvutuslik kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant ja kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg;
- arvutatud imendumistõhusus ( $\alpha$ );
- toidukaudse biokuhjumise tegur korrigeerimata kujul, lipiidisisalduse ja kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud kineetiline BMF (korrigeerimata ja lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud väärtus lähtuvalt terve kala märgmassist) ja vajaduse korral koospetsiifiline BMF;
- kõik andmed radioaktiivselt märgistatud aine metaboliitide ja nende akumu-leerumise kohta;
- kõik katsega seotud ebatavalised asjaolud, kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja mis tahes muu asjakohane teave;
- allpool esitatud koondtabel asjakohaste mõõtmis- ja arvutustulemustega.

Aineist puhastumise kiiruskonstandid ja biokuhjumistegurid (BMF<sub>K</sub>)

$k_g$ (kasvu kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$k_2$ (üldine puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(185)</sup> ) nivool 95 %)
$k_{2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant; päeva kohta):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
$C_{0,m}$ (mõõdetud sisaldus alghetkel – sisaldus kalas omastamisetapi lõpus; µg/g):	märkida väärtus ± SH <sup>(2)</sup> )
$C_{0,d}$ (eeldatav sisaldus puhastumise-tapi alghetkel; µg/g):	märkida väärtus ± SH <sup>(2)</sup> )
$I$ (kindlaksmääratud söödatabimise kiirus sööda grammides grammi kala kohta päevas):	märkida väärtus
$I_g$ (kasvu suhtes korrigeeritud tegelik söödatabimise kiirus sööda gram-mides grammi kala kohta päevas):	märkida väärtus ± SH <sup>(2)</sup> )
$C_{sööti}$ (kemikaali kontsentratsioon söödas; µg/g):	märkida väärtus ± SH <sup>(2)</sup> )
$\alpha$ (aine imendumistõhusus):	märkida väärtus ± SH <sup>(2)</sup> )
BMF <sub>K</sub> (kineetiline toidukaudse biokuhjumise tegur):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)
BMF <sub>Kg</sub> (kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline toidukaudse biokuhjumise tegur):	märkida väärtus (UV <sup>(1)</sup> ) nivool 95 %)

▼ **M7**

Ainest puhastamise kiiruskonstandid ja biokuhjumistegurid (BMF <sub>K</sub> )	
$t_{1/2g}$ (kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg päevades):	märkida väärtus $\pm$ SH <sup>(2)</sup>
$L_c$ (lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur):	märkida väärtus
BMF <sub>KgL</sub> (lipiidisisalduse ja kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BMF):	märkida väärtus
BMF <sub>SSL</sub> (hinnanguline lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud BMF stationaarses olekus):	märkida väärtus $\pm$ SH <sup>(2)</sup>

(<sup>1</sup>) UV – usaldusvahemik (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).  
(<sup>2</sup>) SH – standardhälve (esitatakse juhul, kui seda on võimalik hinnata).

## KIRJANDUS

- (1) Käesoleva lisa peatükk C.13 varem kehtinud kujul („Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse“).
- (2) Käesoleva lisa peatükk A.6 „Lahustuvus vees“.
- (3) Li, A., ja Doucette, W. J. (1993). The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 2031–2035.
- (4) Käesoleva lisa peatükk A.8 „Jaotustegur“.
- (5) Käesoleva lisa peatükk A.24 „Jaotuskoeffitsient ( $n$ -oktanool/vesi): kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) meetod“.
- (6) Käesoleva lisa peatükk A.23 „Jaotuskoeffitsient (süsteemis 1-oktanool-vesi): aeglase segamise meetod“.
- (7) Käesoleva lisa peatükk C.7 „Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst“.
- (8) OECD (1997). Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water (OCDE/GD(97)21). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.
- (9) Käesoleva lisa peatükk A.5 „Pindpinevus“.
- (10) Käesoleva lisa peatükk A.4 „Aururõhk“.
- (11) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.
- (12) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO<sub>2</sub> suletud nõudes (vabaruumi katse)“.
- (13) Connell, D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. T.* 102: 117–156.
- (14) Bintein, S., Devillers, J., ja Karcher, W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on  $n$ -octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29–39.
- (15) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. Veebruar 2011. Kättesaadav aadressil [http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en\\_2649\\_34379\\_42923638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html).

▼ M7

- (16) Brown, R. S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I. S., Villerius, L. A., ja Klamer, H. J. C. (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097–4102.
- (17) Fernandez, J. D., Denny, J. S., ja Tietge, J. E. (1998). A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058–2062.
- (18) Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., Whiteman, F. W., ja Dawson, T. D. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206–218.
- (19) Parkerton, T. F., Arnot, J. A., Weisbrod, A. V., Russom, C., Hoke, R. A., Woodburn, K., Traas, T., Bonnell, M., Burkhard, L. P., ja Lampi, M. A. (2008). Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139–155.
- (20) Verbruggen, E. M. J., Beek, M., Pijnenburg, J., ja Traas, T. P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436–2448.
- (21) Schlechtriem, C., Fliedner, A., ja Schäfers, C. (2012). Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Env. Sci. Eur.* 24: 13.
- (22) Käesoleva lisa peatükk C.47 „Varases arengujärgus kaladele avalduva mürgisuse katse“.
- (23) Käesoleva lisa peatükk C.15 „Kala embrüo ja rebukotiga vastsetega tehtav lühiajaline toksilisuse katse“.
- (24) Käesoleva lisa peatükk C.14 „Noorkalade kasvukatse“.
- (25) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (ENV/JM/MONO(2000)6). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.
- (26) USA Keskkonnakaitseamet (1994). Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors (822-R-94-002). USA Keskkonnakaitseamet, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) USA Toidu- ja Ravimiamet (1999). Pesticide analytical manual (PAM). 1. kd. USA Toidu- ja Ravimiamet, Rockville, MD, USA.
- (28) USA Toidu- ja Ravimiamet (1974). Jaotis 5, A (1) „Analysis of Human or Animal Adipose Tissue“. Väljaandes: Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples. Toim. Thompson, J. F. USA Toidu- ja Ravimiamet, Research Triangle Park, NC, USA.
- (29) Bligh, E. G., ja Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37: 911–917.
- (30) Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A., ja Parrish, C. C. (1985). Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099–1105.
- (31) Smedes, F. (1999) Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124: 1711–1718.
- (32) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application (ENV/JM/MONO(2006)18). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

▼ M7

- (33) Springer, T. A., Guiney, P. D., Krueger, H. O., ja Jaber, M. J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271–2280.
- (34) Springer, T. A. (2009). Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot, J. A., Meylan, W., Tunkel, J., Howard, P. H., Mackay, D., Bonnell, M., ja Boethling, R. S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168–1177.
- (36) Parkerton, T., Letinski, D., Febbo, E., Davi, R., Dzambia, C., Connelly, M., Christensen, K., ja Peterson, D. (2001). A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (ettekanne). SETAC Europe 12th Annual Meeting, Madrid, Hispaania.
- (37) Fisk, A. T., Cymbalisky, C. D., Bergman, Å., ja Muir, D. C. G. (1996). Dietary accumulation of C<sub>12</sub>- and C<sub>16</sub>-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775–1782.
- (38) Anonüümne autor (2004). Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleerivate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.
- (39) Anonüümne autor (2004). Background document to the fish dietary study protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleerivate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.
- (40) Bruggeman, W. A., Opperhuizen, A., Wijnbenga, A., ja Hutzinger, O. (1984). Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173–189.
- (41) Muir, D. C. G., Marshall, W. K., ja Webster, G. R. B. (1985). Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere* 14: 829–833.
- (42) Thomann, R. V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699–707.
- (43) Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., ja Whiteman, F. W. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219–229.
- (44) Gobas, F. A. P. C., de Wolf, W., Burkhard, L. P., Verbruggen, E., ja Plotzke, K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624–637.
- (45) Sijm, D. T. H. M., ja van der Linde, A. (1995). Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769–2777.
- (46) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., de Jonge, W. J., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.
- (47) Fisk, A. T., Norstrom, R. J., Cymbalisky, C. D., ja Muir, D. G. G. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951–961.
- (48) McGrath, J. A., Parkerton, T. F., ja Di Toro, D. M. (2004). Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503–2517.
- (49) Poppendieck, D. G. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Väitekiri. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.



**▼M7**

- (50) McCarty, L. S., ja Mackay, D. (1993). Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718–1728.
- (51) OECD (2012). Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results (ENV/JM/MONO(2012)20). OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 175. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD), Pariis, Prantsusmaa.

▼ M7

## 1. liide

## MÕISTED JA ÜHIKUD

Bioakumuleerumine – üldjuhul mõistetakse selle all protsessi, mille käigus aine sisaldus organismis saavutab taseme, mis on kõrgem kui hingamiskeskkonnas (nt vesi kala puhul või õhk imetaja puhul), toidus või nii ühes kui ka teises (1).

Biokontsentratsioonitegur (BCF või  $K_B$ ) – käesoleva meetodi kohases akumuleerumiskatses omastamisetapi mis tahes ajahetkel kalas, kala pinnal või teatavates kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni ( $C_f$ , mg/kg) ja ümbritsevas keskkonnas esineva uuritava aine kontsentratsiooni ( $C_w$ , mg/l) jagatis. BCFi väljendatakse liitrites kilogrammi kohta. Tuleb tähele panna, et kasvu ja/või standardse lipiidisisalduse suhtes korrigeerimist ei ole arvesse võetud.

Biokontsentratsioonitegur stacionaarses olekus (BCF<sub>SS</sub>) – tegur, mille väärtus ei muutu pikema aja jooksul märkimisväärselt, kui uuritava aine kontsentratsioon ümbritsevas keskkonnas on asjaomase ajavahemiku vältel püsiv (vt stacionaarse oleku määratlus).

Biokontsentreerumine – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või selle pinnal (või selle teatavates kudedes) võrdluses uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas.

Biokuhjumine – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või selle pinnal (või selle teatavates kudedes) võrdluses uuritava aine kontsentratsiooniga toidus.

Biokuhjumistegur (BMF) – stacionaarses olekus täheldatav aine kontsentratsioon röövlomas võrdluses aine kontsentratsiooniga tema saakloomas (või toidus). Käesoleva katsmeetodi puhul hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud BMFi väärtus ei ole otseselt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

Imendumistõhusus ( $\alpha$ ) – soolestikust organismi imendunud aine suhtelise koguse näitaja ( $\alpha$  on ühikuta suurus, kuid seda väljendatakse lihtsakaalu asemel sageli protsentuaalse osakaaluna).

Jaotuskoefitsient süsteemis oktaanol/vesi ( $K_{OW}$ ) – suhtarv, mis väljendab  $n$ -oktaanolis ja vees lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide suhet (katsemeetodid A.8 (2), A.24 (3) ja A.23 (4)); kasutatakse ka tähist  $P_{OW}$ .  $K_{OW}$  logaritmi kasutatakse aine veorganismides biokontsentreerumise määra hindamiseks.

Kemikaal – aine või segu.

Kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF<sub>K</sub>) – omastamise kiiruskonstandi  $k_1$  ja puhastumise kiiruskonstandi  $k_2$  suhtarv (st  $k_1/k_2$ ; nimetatud mõisted on määratletud käesolevas liites). Üldiselt peaks selle näitaja väärtus olema võrreldav BCF<sub>SS</sub>-i väärtusega (vt määratlust allpool), kuid kõrvalekaldeid võib esineda juhul, kui stacionaarse oleku saavutamises ei saa olla kindel või kui kineetilist BCFi on korrigeeritud kasvu suhtes.

Lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (DOC) – katsekeskkonnas lahustunud orgaanilisest ainest pärit süsiniku sisaldust väljendav suurus.

Lipiidisalduse suhtes normaliseeritud biokontsentratsioonitegur stacionaarses olekus (BCF<sub>SSL</sub>) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %.

Lipiidisalduse suhtes normaliseeritud, kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline biokontsentratsioonitegur (BCF<sub>KLg</sub>) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 % ja mida on korrigeeritud katse vältel toimunud kasvu suhtes, nagu on kirjeldatud 5. liites.

▼ M7

Lipiidisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline biokontsentratsioonitegur ( $BCF_{KL}$ ) – tegur, mis on normaliseeritud lähtuvalt kala lipiidisaldusest 5 %.

Mitme koostisosa sisaldav aine – aine, mis on REACH-määruse kontekstis määratletud ainenäite, mille rohkem kui ühe koostisosa osakaal on 10–80 massiprotsenti.

Omastamise kiiruskonstant ( $k_1$ ) – arvvaartus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirust katsealuses kalas või kala pinnal (või teatavates kalakudedes) kala kokkupuutumisel selle ainega ( $k_1$  väljendatakse liitrites kilogrammi kohta päevas).

Omastamisetapp või kokkupuuteetapp – aeg, mille jooksul kala puutub kokku uuritava ainega.

Orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC) – katsekeskkonna kõikidest orgaanilise aine allikatest, sealhulgas tahketest osakestest ja lahustunud orgaanilisest ainest pärit süsiniku sisaldust väljendav suurus.

Puhastumise (kao) kiiruskonstant ( $k_2$ ) – arvvaartus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirust katsealuses kalas (või teatavates kalakudedes) pärast kala viimist uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast seda ainet mittesisaldavasse keskkonda ( $k_2$  väljendatakse päeva kohta).

Puhastumisetapp või kokkupuutejärgne (kao) etapp – aeg, mis järgneb katsealuse kala viimisele uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast seda ainet mittesisaldavasse keskkonda ja mille jooksul uuritakse ainest puhastumist (või aine summaarset kadu) kalas (või teatavates kalakudedes).

Statsionaarne olek – olek, mis saavutatakse kalades sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni ( $C_f$ ) ajas muutumist väljendaval kõveral siis, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevaste intervallidega võetud kolmes järjestikus proovis mõõdetud  $C_f$  väärtused ei erine üksteisest rohkem kui  $\pm 20$  % ning esimese ja viimase järjestikuse analüüsi vahelisel perioodil ei täheledata  $C_f$  olulist suurenemist. Koondproovide analüüsimise puhul on vaja teha vähemalt neli järjestikust analüüsi. Aeglaselt omastatavate ainete puhul on sobivam intervall seitse päeva.

Söödatarbimise kiirus ( $I$ ) – iga kala tarbitav keskmine päevane söödakogus terve kala eeldatava keskmise kehamassi ühiku kohta (väljendatakse sööda grammides grammi kala kohta päevas).

Tahke faasi abil mikroekstraheerimine – lahjade lahuste jaoks välja töötatud lahustivaba analüüsimeetod. Selle meetodi puhul viiakse polümeeriga kaetud kiud kokkupuutesse huvipakkuvat ainet sisaldava gaasifaasi või vedelfaasiga. Üldjuhul kohaldatakse kõnealuse analüüsi puhul miinimumaega, et võimaldada uuritaval ainel saavutada tasakaaluolek tahke ja voolava faasi vahel. Seejärel saab määrata huvipakkuva aine kontsentratsiooni määramismeetodist sõltuvalt kas otse kiul või pärast aine ekstraheerimist kiult lahustisse.

Tahketes osakestes esineva orgaanilise süsiniku sisaldus (POC) – katsekeskkonna orgaanilise hõljuvaine süsinikusisaldust väljendav suurus.

Toidukaude biokuhjumise tegur – käesolevas katsemeetodis kasutatav mõiste, mille abil kirjeldatakse sellise toidukaude kokkupuute katse tulemusi, kus hoidutakse hoolikalt veefaasi kaudu kokkupuute loomisest, mistõttu sel viisil leitud toidukaude biokuhjumise teguri väärtus ei ole otseselt võrreldav väliuuringust saadud BMFi väärtusega (mille puhul kokkupuude võib üheaegselt toimuda nii vee kui ka toidu kaudu).

**▼ M7**

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

UVCB – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**KIRJANDUS**

- (1) Gobas, F. A. P. C., de Wolf, W., Burkhard, L. P., Verbruggen, E., ja Plotzke, K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624–637.
- (2) Käesoleva lisa peatükk A.8 „Jaotustegur“.
- (3) Käesoleva lisa peatükk A.24 „Jaotuskoefitsient (*n*-oktanool/vesi): kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) meetod“.
- (4) Käesoleva lisa peatükk A.23 „Jaotuskoefitsient (süsteemis 1-oktanool-vesi): aeglase segamise meetod“.

▼ **M7**

## 2. liide

**MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED  
OMADUSED**

Koostisosa	Piirsaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülid summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

## ▼M7

## 3. liide

## KATSE JAOKS SOOVITATAVAD KALALIIGID

Soovitav liik	Soovitav katsetemperatuuride vahemik (°C)	Soovitav katselooma üldpikkus (cm) (²)
<i>Danio rerio</i> (¹) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) – vöödilise daanio	20–25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) – tüse tõmpnina	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) – harilik karpkala	20–25	8,0 ± 4,0 (³)
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck & Schlegel) – jaapani riisikala	20–25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) – gupi	20–25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) – sinilõpuseline päikeseahven	20–25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) – vikerforell	13–17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) – harilik ogalik	18–20	3,0 ± 1,0

(¹) Meyer *et al.* (1).

(²) Tuleks silmas pidada, et katses kasutatakse suuruse näitajana ja kasvu kiiruskonstandi leidmiseks soovitatavalt massi. Samas mõeldakse, et praktikas on hõlpsam kasutada pikkust, kui kalu tuleb katse alguses (st lähtepopulatsioonist) valida silma järgi.

(³) See pikkusevahemik on esitatud Jaapanis kehtival kemikaalide kontrollimise seadusel põhinevates katsemeetodites uute kemikaalide jmt jaoks.

*Harvemini on kasutatud näiteks järgmisi suudmeala- ja merekalu.*

Kotkaskalalane	( <i>Leiostomus xanthurus</i> )
Hammaskarp	( <i>Cyprinodon variegatus</i> )
Hõbeateriin	( <i>Menidia beryllina</i> )
Punnkõht	( <i>Cymatogaster aggregata</i> )
Inglise merikeel	( <i>Parophrys vetulus</i> )
Sarvikvõldas	( <i>Leptocottus armatus</i> )
Harilik ogalik	( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )
Harilik huntahven	( <i>Dicentrarchus labrax</i> )
Harilik viidikas	( <i>Alburnus alburnus</i> )

**▼M7**

Eespool tabelis loetletud mageveekalu on lihtne kasvatada ja/või nad on aastaringselt laialdaselt kättesaadavad, ent suudmeala- ja mere liikide kättesaadavus on osaliselt piiratud konkreetsete riikidega. Nimetatud kalu saab kasvatada ja kultiveerida kalakasvanduses või laboris haiguste ja parasiitide suhtes kontrollitud tingimustes nii, et katseloomad on terved ja nende põlvnemine on teada. Need kalad on kättesaadavad paljudes maailma piirkondades.

**KIRJANDUS**

- (1) Meyer, A., Biermann, C. H., ja Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 252: 231–236.

## ▼M7

## 4. liide

VEEKAUDSE JA TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE KATSETES  
KASUTATAVAD PROOVIVÕTUKAVAD1. Teoreetiline näide proovivõtukavast täismahus tehtavas veekaudsel  
kokkupuutel biokontsenteerumise katses, milles uuritava aine  $\log K_{OW} = 4$ .

Võetav kalaproov	Proovivõtu ajakava		Veeproovide arv <sup>(1)</sup>	Kalade arv proovi kohta <sup>(1)</sup>
	Minimaalselt nõutavate proovide võtmise aeg (päevades) <sup>(2)</sup>	Lisaproovide võtmise aeg (päevades) <sup>(2)</sup>		
Omastamisetapp				
1	– 1		2 <sup>(3)</sup>	4 <sup>(4)</sup>
	0		(2)	(3 <sup>(6)</sup> )
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4–8 <sup>(5)</sup>
				(3 <sup>(6)</sup> )
Puhastumisetapp				Kalad viiakse uuritavat ainet mittesisaldavasse vette
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4–8 <sup>(5)</sup>
		17,5		(4 + 3 <sup>(6)</sup> )
KOKKU				40 –72 (48–80) <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> Sulgudes on esitatud lisaproovide võtmise korral analüüsitava veeproovide või kalade arv.<sup>(2)</sup> Katse eel arvutatud hinnanguline  $k_2$  väärtus  $\log K_{OW}$  väärtusel 4,0 on 0,652 päeva kohta. Katse kavandatud üldkestus on  $3 \times t_{SS} = 3 \times 4,6$  päeva, s.o 14 päeva. Näitaja  $t_{SS}$ -i hindamist on käsitletud 5. liites.<sup>(3)</sup> Veeproov võetakse pärast seda, kui vesi on vahetunud vähemalt kolmekordses kambri mahus.<sup>(4)</sup> Need kalad võetakse lähtepopulatsioonist.<sup>(5)</sup> Kui suurema täpsuse saavutamiseks või metabolismiuuringute tegemiseks on vaja suuremat arvu kalu, tuleks täiendavalt vajaminevad kalad võtta omastamisetapi ja puhastumisetapi lõpus (vt punkt 40).<sup>(6)</sup> Lipiidisisalduse analüüsimiseks võib olla täiendavalt vaja vähemalt 3 kala, kui selleks ei ole võimalik kasutada kalu, kes valiti aine sisalduse määramiseks katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus. Tuleb silmas pida, et paljudel juhtudel peaks olema võimalik kasutada selleks otstarbeks üksnes 3 kontrollrühmast võetud kala (vt punkt 56).



## ▼M7

2. Teoreetiline näide proovivõtukavast aine toidukaudse bioakumuleerumise katses, kus omastamisetapi kestus on 10 päeva ja puhastumisetapi kestus 42 päeva.

Võetav proov	Proovivõtu ajakava		Söödaproovide arv	Kalade arv proovi kohta	
	Etapi päev	Täiendav kalaproov?		Katserühm	Kontrollrühm
Omastamisetapp					
1	0	Võimalik <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	3 – katserühmast 3 – kontrollrühmast <sup>(1)</sup>	0	5–10 (8–13) <sup>(2)</sup>
1A <sup>(3)</sup>	1–3			5–10	5–10
2	10	Jah <sup>(4)</sup>	3 – katserühmast 3 – kontrollrühmast <sup>(1)</sup>	10–15 <sup>(4)</sup> (13–18) <sup>(5)</sup>	5–10 8–13 <sup>(5)</sup>
Puhastumisetapp					
3	1	Jah <sup>(4)</sup>		10–15 <sup>(4)</sup>	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10
6	7	Jah <sup>(4)</sup>		10–15 <sup>(4)</sup>	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Jah <sup>(4)</sup>		10–15 <sup>(4)</sup> (13–18) <sup>(5)</sup>	5–10 (8–13) <sup>(5)</sup>
KOKKU				59–120 (63–126) <sup>(4)</sup> <sup>(5)</sup>	50–110 (56–116) <sup>(4)</sup> <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> Uuritava aine ja lipiidide sisalduse suhtes analüüsitakse nii kontrollrühmast kui ka katserühmast 3 söödaproovi.

<sup>(2)</sup> Kalaproov võetakse lähtepopulatsioonist uuringu algushetkele võimalikult lähedal hetkel; lähtepopulatsioonist tuleks lipiidisalduse suhtes analüüsiks võtta katse alguses vähemalt 3 kala.

<sup>(3)</sup> Omastamisetapi algusjärgus (soovi korral) võetavatest proovidest saadud andmed võimaldavad arvutada uuritava aine toidust imendumise määra, mida saab võrrelda puhastumisetapi andmete põhjal arvutatud imendumistõhususe väärtusega.

<sup>(4)</sup> Koespetsiifilise analüüsi jaoks võib võtta veel 5 kala.

<sup>(5)</sup> Lipiidisalduse analüüsiks võib olla täiendavalt vaja vähemalt 3 kala, kui selleks ei ole võimalik kasutada kalu, kes valiti aine sisalduse määramiseks katse alguses, omastamisetapi lõpus ja puhastumisetapi lõpus. Tuleb silmas pida, et paljudel juhtudel peaks olema võimalik kasutada selleks otstarbeks üksnes 3 kontrollrühmast võetud kala (vt punktid 56 ja 153).

**Märkus etappide kestuse ja proovivõtuaegade kohta:** omastamisetapp algab rikastatud sööda esmakordse andmise hetkel. Katsepäev kestab ühest söötmiskorrast kuni hetkeni veidi enne järgmist söötmiskorda 24 tundi hiljem. Esimene proov (tabelis tähistatud numbriga 1) tuleks võtta veidi (nt üks tund) enne esmakordset söötmist. Proovid tuleks kogu katse vältel ideaaljuhul võtta veidi enne järgmise päeva söötmiskorda (st umbes 23 tundi pärast proovivõtupäeva söötmiskorda). Omastamisetapp lõpeb veidi enne esmakordset rikastamata söödaga söötmist, mis tähistab puhastumisetapi algust (eeldatavalt jätkavad katserühma kalad 24 tunni jooksul pärast viimast rikastatud söödaga söötmist rikastatud sööda seedimist). Seepärast tuleks omastamisetapi lõpus võetav proov võtta veidi enne esmakordset rikastatud söödaga söötmist ja puhastumisetapi esimene proov umbes 23 tundi pärast esmakordset rikastatud söödaga söötmist.

▼ **M7**

## 5. liide

**ÜLDISED ARVUTUSED**

1. Sissejuhatus
2. Omastamisetapi kestuse hindamine
3. Puhastumisetapi kestuse hindamine
4. Järjestikuse analüüsi meetod: puhastumise (kao) kiiruskonstandi  $k_2$  määramine
5. Järjestikuse analüüsi meetod: omastamise kiiruskonstandi  $k_1$  määramine (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)
6. Omastamise ja puhastumise (kao) kiiruskonstantide üheaegse arvutamise meetod (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)
7. Kineetilise BCF-i ja BMF-i korrigeerimine kasvust tingitud lahjenemise suhtes
8. Lipiidisisalduse suhtes normaliseerimine lähtuvalt lipiidisisaldusest 5 % (üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul)

## 1. SISSEJUHATUS

Veekaudse kalades bioakumuleerumise üldmudel on kirjeldatav omastamise ja kaoga seotud protsesside kaudu; sealjuures ei võeta arvesse toidu kaudu omastamist. Diferentsiaalvõrrand ( $dC_f/dt$ ), millega kirjeldatakse aine sisalduse muutumise kiirust kalas ( $\text{mg/kg}^{-1}$  päevas<sup>-1</sup>), on järgmine (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{võrrand A5.1}],$$

kus

- $k_1$  on aine kalas omastamist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant ( $\text{l/kg}$  päevas),
- $k_2$  on kalas toimuvat ainet puhastumist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),
- $k_g$  on kala kasvu (kasvust tingitud lahjenemist) iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),
- $k_m$  on metaboliseerumist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),
- $k_e$  on roojamist iseloomustav esimest järku reaktsiooni kiiruskonstant (päeva kohta),
- $C_w$  on kontsentratsioon vees ( $\text{mg/l}$ ) ja
- $C_f$  on kontsentratsioon kalas ( $\text{mg/kg}$  märgmassi alusel).

Bioakumuleeruvate ainete puhul võib eeldada, et kõige asjakohasem lubatud kõikumise (vt punkt 24) piiresse jääv kokkupuutekontsentratsioon vees ( $C_w$ ) on ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon. Selle arvutamiseks vees soovitatakse järgida katsemeetodi C.20 (2) 6. liites sätestatud korda. Tuleks tähele panna, et vees täheldatava kontsentratsiooni naturaallogaritmimine on sobiv juhul, kui uuendamiste vahelisel perioodil toimub eeldatavalt kontsentratsiooni eksponentsiaalne vähenemine, näiteks poolstaatilise katserežiimi puhul. Läbi-voolustusrežiimi puhul ei pruugi kokkupuutekontsentratsiooni naturaallogaritmimine olla vajalik. Kui leitakse ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon vees, tuleks esitada see katseprotokollis ja kasutada seda järgnevatel arvutustel.

Standardsetes kaladega tehtavas BCF-i leidmise katses võib omastamist ja puhastumist kirjeldada kui kahte esimese järgu reaktsiooni kineetikat järgivat protsessi.

▼ **M7**

$$Omastamiskiirus = k_1 \times C_w \quad [\text{võrrand A5.2}]$$

$$\text{Üldine puhastumiskiirus} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{võrrand A5.3}]$$

Statsionaarses olekus on omastamiskiirus eeldusel, et kasvu ja metabolismi mõju on tühine (st  $k_g$  ja  $k_m$  väärtust ei saa eristada nullist), võrdne puhastumiskiirusega ning seega tekib võrrandite A5.2 ja A5.3 kombineerimisel järgmine seos:

$$BCF = \frac{C_f - SS}{C_w - SS} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{võrrand A5.4}],$$

kus

$C_{f-SS}$  on kontsentratsioon kalas statsionaarses olekus (mg/kg märgmassi alusel) ja

$C_{w-SS}$  on kontsentratsioon vees statsionaarses olekus (mg/l).

Suhtarvu  $k_1/k_2$  näol on tegemist kineetilise BCFga ( $BCF_K$ ), mis peaks olema võrdne statsionaarset olekut iseloomustava BCFga ( $BCF_{SS}$ ), mis väljendab kalades ja vees täheldatavate statsionaarsele olekule vastavate kontsentratsioonide suhet, kuid kõrvalekaldeid võib esineda juhul, kui statsionaarse oleku saavutamises ei saa olla kindel või kui kineetilist BCFi on korrigeeritud kasvu suhtes. Kuna  $k_1$  ja  $k_2$  on konstandid, ei ole statsionaarse oleku saavutamine  $BCF_K$  leidmiseks siiski vajalik.

Kirjeldatud esimest järku reaktsiooni võrranditest lähtuvalt on käesolevas 5. liites esitatud üldised arvutused, mida läheb vaja nii veekaudset kui ka toidukaudset kokkupuudet käsitlevate bioakumuleerumise hindamise meetodite puhul. Jaotised 5, 6 ja 8 on siiski asjakohased üksnes veekaudse kokkupuute meetodi puhul, kuid on lisatud siia põhjusel, et tegemist on üldkasutatavate meetoditega. Järjestikuse (jaotised 4 ja 5) ja üheaegse (jaotis 6) analüüsi meetodid võimaldavad arvutada omastamise ja puhastamise kiiruskonstandid, mida kasutatakse kineetilise BCFi leidmiseks. Järjestikuse analüüsi meetod  $k_2$  määramiseks (jaotis 4) on oluline toidukaudse kokkupuute meetodi puhul, kuna saadud väärtust on vaja nii imendumistõhususe kui ka BMFi arvutamiseks. Üksnes toidukaudse kokkupuute meetodi puhul kasutatavaid arvutusi on üksikasjalikult käsitletud 7. liites.

## 2. OMASTAMISETAPI KESTUSE HINDAMINE

Enne katse tegemist saab  $k_2$  ja seeläbi aega, mis kulub statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks, hinnata lähtuvalt empiirilistest seostest  $k_2$  ja süsteemi  $n$ -oktanool/vesi iseloomustava jaotuskoefitsiendi ( $K_{OW}$ ) vahel või  $k_2$  ning  $k_1$  ja BCFi vahel. Tuleks siiski meeles pidada, et käesolevas jaotises esitatud võrrandid kehtivad üksnes juhul, kui omastamine ja puhastamine toimuvad vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui see ei ole ilmselgelt nii, soovitatakse omastamisetapi kestuse hindamise vajaduse korral kasutada biostatistiku ja/või farmakokineetika spetsialisti abi.

Hinnangulist  $k_2$  väärtust (päeva kohta) saab arvutada mitme meetodiga. Näiteks võib esmalt kasutada järgmisi empiirilisi seoseid<sup>(1)</sup>:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{OW} \quad (r^2 = 0,95) \quad [(3); \text{võrrand A5.5}]$$

või

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{võrrand A5.6}],$$

$$\text{kus } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (ainete puhul, mille } K_{OW} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad [(4); \text{võrrand A5.7}]$$

<sup>(1)</sup> Nagu kõikide muudegi empiiriliste seoste puhul, tuleks enne veenduda, et asjaomane seos on kohaldatav ka uuritava aine puhul.

## ▼ M7

ja  $BCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)}$  ( $r^2 = 0,90$ ) [(5); võrrand A5.8];

$W$  on uuritava ainega kokku puutuvate kalade keskmine mass (märgmassi grammides) omastamisetapi lõpus / puhastumisetapi alguses <sup>(1)</sup>.

Muid seoseid on kirjeldatud viites 6. Konstandi  $k_2$  hindamiseks võib olla kasulik rakendada keerukamat mudelit juhul, kui on näiteks tõenäoline, et aine metaboliseerumine on märkimisväärne (7, 8). Mudeli keerukuse suurenedes tuleks aga olla saadud hinnangute tõlgendamisel ettevaatlikum. Näiteks võib nitrorühmade esinemine viidata kiirele metaboliseerumisele, kuid see ei ole alati nii. Seepärast peaks hindamismeetodi kasutaja katse ajakava koostamisel kaaluma saadud tulemusi keemilise struktuuri ja kõikide muude asjakohaste andmete (näiteks eelkatsete tulemuste) valguses.

Statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks kuluva aja võib  $k_2$  hinnangulise väärtuse põhjal leida omastamise ja puhastamise kineetikat (esimest järku reaktsiooni) kirjeldava üldvõrrandi abil, eeldusel, et kasvu ja metaboliseerumise määrad on tühine. Kui katse jooksul täheldatakse märkimisväärset kasvu, ei ole allpool kirjeldatud hindamismeetodid usaldusväärsed. Sellisel juhul on parem kasutada kasvu suhtes korregeeritud konstanti  $k_{2g}$ , nagu on kirjeldatud mujal (vt käesoleva liite jaotis 7).

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{võrrand A5.9}]$$

või püsiva  $C_w$  korral

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{võrrand A5.10}]$$

Statsionaarsele olekule lähenemisel ( $t \rightarrow \infty$ ) võib võrrandi A5.10 taandada (vt viited 9 ja 10) kujule

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{võrrand A5.11}]$$

või

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{võrrand A5.12}].$$

Sellest lähtuvalt väljendab  $BCF \times C_w$  ligikaudselt aine sisaldust kalas statsionaarses olekus ( $C_{f,SS}$ ). [Märkus: sama lähenemisviisi võib kasutada statsionaarsele olekule vastava BMFi hindamiseks toidukaude kokkupuute katse puhul. Sel juhul asendatakse BCF eespool esitatud võrrandites BMFga ja  $C_w$  aine sisaldusega söödas ( $C_{sööd}$ ).]

Võrrandi A5.10 võib teisendada kujule

$$C_f = C_{f-SS} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{võrrand A5.13}]$$

või

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{võrrand A5.14}].$$

Võrrandist A5.14 saab leida statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest teatava protsentuaalse osakaalu saavutamiseks kuluva hinnangulise aja, kui võrrandite A5.5 ja A5.6 põhjal on eelnevalt arvutatud  $k_2$  hinnanguline väärtus.

Omastamisetapi statistiliselt optimaalne kestus statistiliselt vastuvõetavate andmete ( $BCF_K$ ) saamiseks vastab üldiselt ajavahemikule, mille jooksul kõver, mis väljendab kalas sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi muutust lineaarsel skaalal esitatud ajas, saavutab väärtuse, mis on vähemalt

<sup>(1)</sup> Kalade massi omastamisetapi lõpus saab hinnata lähtuvalt varasematest uuringuandmetest või teadmistest katseliigi kalade massi eeldatava suurenemise kohta omastamisetapi tüüpilise kestuse (nt 28 päeva) jooksul võrdluses kalade tavapärase massiga katse alguses.

▼ M7

50 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest (st  $0,69/k_2$ ), kuid mitte rohkem kui 95 % sellisest sisaldusest (st  $3,0/k_2$ ) (11). Kui akumuleerumise määr ületab 95 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, on võimalik arvutada  $BCF_{SS}$ .

Aeg, mille jooksul saavutatakse 80 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, arvutatakse (lähtuvalt võrrandist A5.14) järgmiselt:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{võrrand A5.15}]$$

ehk

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{võrrand A5.16}].$$

Samal viisil võib leida aja, mille jooksul saavutatakse 95 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{võrrand A5.17}].$$

Näiteks on omastamisetapi kestus (st aeg, mille jooksul saavutatakse teatav protsentuaalne osakaal statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest, nt  $t_{80}$  või  $t_{95}$ ) sellise uuritava aine puhul, mille  $\log K_{OW} = 4$ , järgmine (võrrandite A5.5, A5.16 ja A5.17 põhjal):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ päeva kohta}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ päeva (59 tundi)}$$

$$\text{või } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ päeva (110 tundi.)}$$

Teise võimalusena võib kasutada võrrandit:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (tundi)} \quad [\text{võrrand A5.18}],$$

et arvutada tegeliku statsionaarse oleku saavutamiseks vajalik aeg ( $t_{eSS}$ ) (12). Uuritava aine puhul, mille  $\log K_{OW} = 4$ , on see järgmine:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ tundi.}$$

### 3. PUHASTUMISETAPI KESTUSE HINDAMINE

Ajavahemikku, mille jooksul aine sisaldus organismis väheneb teatava protsendini algsisaldusest, võib samuti hinnata omastamist ja puhastumist kirjeldava üldvõrrandi abil (eeldusel, et tegemist on esimest järku reaktsiooni kineetikaga; vt võrrand A5.9) (1, 13).

Puhastumisetapi puhul eeldatakse, et  $C_w$  (toidukaudse kokkupuute katses  $C_{s\ddot{o}t}$ ) väärtus on null. Kõnealuse võrrandi võib seega taandada kujule

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{võrrand A5.19}]$$

või

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{võrrand A5.20}],$$

kus  $C_{f,0}$  on kontsentratsioon puhastumisperioodi alguses.

Sellest lähtuvalt arvutatakse 50 % ulatuses puhastumiseks kuluv aeg ( $t_{50}$ ) järgmiselt:

## ▼ M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ehk

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Samamoodi leitakse 95 % ulatuses puhastumiseks kuluv aeg:

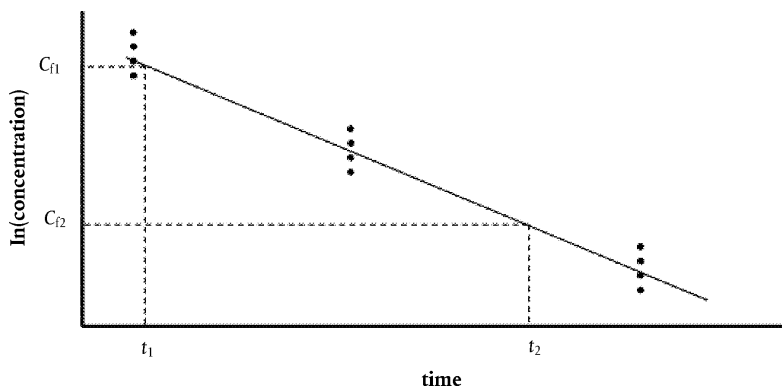
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Kui omastamisetapis soovitakse saavutada 80 % statsionaarsele olekule vastavast sisaldusest (kestus  $1,6/k_2$ ) ja puhastumisetapis kao määr 95 % (kestus  $3,0/k_2$ ), siis on puhastumisetapp umbes kaks korda pikem kui omastamisetapp.

Tuleb meeles pidada, et kõnealuste hinnangute puhul lähtutakse eeldusest, et omastamine ja puhastumine toimuvad vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Need hinnangud ei kehti juhul, kui tegemist on selgelt muu kui esimest järku reaktsiooni kineetikaga.

#### 4. JÄRJESTIKUSE ANALÜÜSI MEETOD: PUHASTUMISE (KAO) KIIRUSKONSTANDI $k_2$ MÄÄRAMINE

Enamiku biokontsentreerumise andmete puhul on eeldatud, et neid saab piisavalt hästi kirjeldada lihtsa kaheosalise/kaheparameetrilise mudeliga, mida väljendab sirgjoon, mis läheneb kalas puhastumisetapi ajal esineva kontsentratsiooni naturaallogaritmidele väärtustele.



Tuleb silmas pidada, et kõrvalekalded sirgjoonest võivad viidata esimest järku reaktsiooni kineetikast keerukamale puhastumiskineetikale. Kui puhastumine ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, võib selle kirjeldamiseks kasutada graafikupõhist meetodit.

Konstant  $k_2$  arvutatakse eri ajahetkedel võetud mitme proovi andmete põhjal lineaarse regressiooni teel, mis väljendab kontsentratsiooni naturaallogaritmide sõltuvust ajast. Regressioonisirge tõus vastab puhastumise kiiruskonstandi  $k_2$  hinnangulisele väärtusele <sup>(1)</sup> Algordinaadi põhjal saab hõlpsalt leida keskmise kontsentratsiooni kalas puhastumisetapi alguses ( $C_{0,a}$ ; see on võrdne keskmise kontsentratsiooniga kalas omastamisetapi lõpus) ning selle näitaja veamäära <sup>(2)</sup>:

<sup>(1)</sup> Enamiku programmide puhul, mis võimaldavad kasutada lineaarset regressiooni (nt andmeanalüüsi mooduliga Microsoft Excel), arvutatakse ka asjaomase hinnangulise väärtuse standardviga ja usaldusvahemik.

▼ **M7**

$$C_{0,d} = e^{\text{algordinaat}} \quad [\text{võrrand A5.21}].$$

Kui on olemas ainult kahel eri ajahetkel võetud proovide andmed (näiteks minimeeritud katseplaani puhul), sisestatakse kõnealuse kahe kontsentratsiooni keskvaartused järgmisse võrrandisse:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{võrrand A5.22}],$$

kus  $\ln(C_{f1})$  ja  $\ln(C_{f2})$  on vastavalt ajahetkel  $t_1$  ja  $t_2$  mõõdetud kontsentratsiooni naturaallõgaritmide ning  $t_1$  ja  $t_2$  tähistavad ajavahemikku puhastumisetapi algusest kuni kõnealuse kahe proovi võtmiseni <sup>(1)</sup>.

#### 5. JÄRJESTIKUSE ANALÜÜSI MEETOD: OMASTAMISE KIIRUSKONSTANTANDI $k_1$ MÄÄRAMINE (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Konstandi  $k_1$  arvutamisel järjestikuste kontsentratsiooni ajas muutumist väljendavate omastamisetapi andmete alusel kasutatakse arvutiprogrammi järgmise mudeli lähendamiseks:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{võrrand A5.23}],$$

kus  $k_2$  on teada varasematest arvutustest ning  $C_f(t)$  ja  $C_w(t)$  on vastavalt kalades ja vees ajahetkel  $t$  täheldatud kontsentratsioon.

Kui on olemas ainult kahel eri ajahetkel võetud proovide andmed (näiteks minimeeritud katseplaani puhul), kasutatakse  $k_1$  leidmiseks järgmist võrrandit:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{võrrand A5.24}],$$

kus  $k_2$  on teada varasematest arvutustest,  $C_f$  on kontsentratsioon kalas puhastumisetapi alguses ja  $C_w$  on keskmine kontsentratsioon vees omastamisetapi ajal <sup>(2)</sup>.

Mudeli sobivust andmetega saab visuaalselt hinnata, kui kanda tõusudega  $k_1$  and  $k_2$  sirged koos proovivõtupunktide andmetega graafikule. Kui selgub, et järjestikuse analüüsi meetodiga saadud hinnanguline  $k_1$  väärtus on ebausaldusväärne, tuleks  $k_1$  ja  $k_2$  arvutamiseks kasutada üheaegse analüüsi meetodit. Seejärel tuleks uuesti visuaalselt kontrollida saadud tõusude sobivust graafikule kantud mõõtmistulemustega. Kui sobivus on endiselt väike, võib see viidata asjaolule, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga ja tuleks kasutada keerukamat mudelit.

#### 6. OMASTAMISE JA PUHASTUMISE (KAO) KIIRUSKONSTANTIDE ÜHEAEGSE ARVUTAMISE MEETOD (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Konstantide  $k_1$  ja  $k_2$  väärtuse arvutamisel järjestikuste kontsentratsiooni ajas muutumist väljendavate andmete alusel võib kasutada arvutiprogramme ja järgmist mudelit:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad (0 < t < t_c) \quad [\text{võrrand A5.25}];$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad (t > t_c) \quad [\text{võrrand A5.26}],$$

kus

$t_c$  on aeg omastamisetapi lõpus.

See lähenemisviis võimaldab vahetult leida hinnangulise  $k_1$  ja  $k_2$  standardvea. Kui  $k_1/k_2$  asendatakse võrrandis A5.25 või A5.26 BCFga (vt võrrand 5.4), saab leida ka BCFi standardvea ja usaldusvahemiku usaldusnivool 95 %. See on eriti kasulik juhul, kui võrreldakse eri hinnangulisi väärtusi, mis on saadud

<sup>(1)</sup> Erinevalt lineaarse regressiooni meetodist ei võimalda see valem arvutada  $k_2$  standardviga.

<sup>(2)</sup> Erinevalt lineaarse regressiooni meetodist ei võimalda see valem tavaliselt arvutada hinnangulise  $k_1$  standardviga ega usaldusvahemikku.

▼ **M7**

teisendatud andmete põhjal. Mudeli lähendamisel võib kasutada sõltuva muutuja (kalades täheldatav kontsentratsioon) nii logaritmitamata kui ka naturaallogaritmide väärtusi ning hinnata leitud BCFi usaldusväärsust.

Kuna  $k_1$  and  $k_2$  üheaegse hindamise korral on need näitajad omavahel tugevalt korreleeritud, võib olla soovitatav arvutada esmalt  $k_2$  üksnes puhastumissandmete põhjal (vt eespool); enamikul juhtudel saab  $k_2$  hinnata puhastumiskõvera alusel suhteliselt suure täpsusega. Seejärel saab omastamisandmete põhjal arvutada  $k_1$  mittelineaarse regressiooni teel<sup>(1)</sup>. Järjestikuse lähendamise korral soovitatakse kasutada sama andmeteisendust.

Mudeli sobivust andmetega saab visuaalselt hinnata, kui kanda leitud tõusudega sirged koos proovivõtupunktide andmetega graafikule. Kui selgub, et selle meetodiga saadud hinnanguline  $k_1$  väärtus on ebausaldusväärne, tuleks  $k_1$  ja  $k_2$  arvutamiseks kasutada üheaegse analüüsi meetodit. Seejärel tuleks uuesti visuaalselt kontrollida lähendatud mudeli sobivust graafikule kantud mõõtmistulemustega ning võrrelda omavahel eri tüüpi mudelitega saadud  $k_1$ ,  $k_2$  ja neil põhineva BCFi hinnangulisi väärtusi ja nende standardviguga ja/või usaldusvahemikke.

Kui sobivus on endiselt väike, võib see viidata asjaolule, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga ja tuleks kasutada keerukamat mudelit. Üks kõige sagedasem segav asjaolu on kalade kasv katse ajal.

## 7. KINEETILISE BCF-I JA BMF-I KORRIGEERIMINE KASVUST TINGITUD LAHJENEMISE SUHTES

Käesolevas jaotises kirjeldatakse katse ajal toimuva kalade kasvu (st kasvust tingitud lahjenemise) suhtes korrigeerimise standardmeetodit, mis on kohaldatav üksnes esimest järku reaktsiooni kineetika puhul. Kui on viiteid sellele, et tegemist ei ole esimest järku reaktsiooni kineetikaga, soovitatakse kasutada kasvust tingitud lahjenemise asjakohasel viisil arvessevõtmiseks biostatistika abi või rakendada allpool kirjeldatud massipõhist lähenemisviisi.

Mõnel juhul on käesolev meetod kasvust tingitud lahjenemise arvessevõtmiseks ebatäpne või ei ole kasutatav (näiteks ainete puhul, millest puhastumine on väga aeglane ja mille uurimiseks kasutatakse kiire kasvuga kalu, võib kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandi  $k_{2g}$  leitud väärtus olla väga väike; seega omandab selle arvutamiseks kasutatud kahe kiiruskonstandiga seotud väga kriitilise tähtsuse ja mõnel juhul võib hinnanguline  $k_g$  olla suurem kui  $k_2$ ). Sellisel juhul võib kasutada alternatiivset lähenemisviisi (st massipõhist meetodit), mis on rakendatav ka juhul, kui kasv ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale, ja mille puhul korrigeerimine ei ole vajalik. Seda lähenemisviisi on tutvustatud käesoleva jaotise lõpus.

### Kasvu suhtes korrigeerimine kasvu kiiruskonstandi mahalahutamisel põhineva meetodiga

Käesoleva standardmeetodi puhul naturaallogaritmatakse iga kala massi- ja pikkuse andmed ning massi või selle pöördväärtuse naturaallogaritm kantakse graafikule, mis väljendab kasvu sõltuvust ajast (päevades); katserühma(de) ja kontrollrühma andmeid käsitletakse eraldi. Omastamis- ja puhastumisetapi andmeid töödeldakse eraldi samal viisil. Üldjuhul on kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeerimisel asjakohasem kasutada kasvu kiiruskonstandi ( $k_g$ ) leidmiseks kogu katse vältel kogutud massiandmeid, kuid statistiliselt

<sup>(1)</sup> Tuleks tähele panna, et hinnangulise  $k_2$  usaldusväärsust ei kasutata bioakumuleerumise mudelis õigel viisil, kui seda näitajat vaadeldakse järjestikuse lähendamise meetodi kohasel  $k_1$  lähendamisel konstantsena. Sellest tulenevalt on BCFi usaldusväärsus üheaegse ja järjestikuse lähendamise mudeli puhul erinev.



▼ **M7**

olulised erinevused omastamisetapi ja puhastumisetapi iseloomustavate kasvu kiiruskonstantide vahel võivad viidata sellele, et tuleks kasutada puhastumisetapi kohta leitud kiiruskonstanti. Kokkupuutest tuleneva võimaliku mõju tuvastamiseks saab võrrelda veekaudse kokkupuute katses täheldatud üldist kasvukiirust katserühma(de)s ja kontrollrühmas.

Igas rühmas (katserühm(ad) ja kontrollrühm) arvutatakse vähimruutude meetodil iga üksiku kala andmetest, mitte päevastest keskvärtustest lähtuvalt standardsete statistikameetodite abil kalade massi (ja massi pöördväärtuse) naturaallogaritmide ja aja (päevades) lineaarne korrelatsioon nii kogu katse vältel kui ka omastamisetapis ja puhastumisetapis. Arvutatakse saadud sirgete tõusu iseloomustavate väärtuste hajuvus ja hinnatakse selle kaudu Studenti  $t$ -testi (või mitme kontsentratsiooni kasutamisel dispersioonanalüüsi) abil tõusude (kasvu kiiruskonstantide) erinevuse statistilist olulisust ( $p = 0,05$ ). Üldjuhul kasutatakse kasvu suhtes korrigeerimiseks eelistatavalt massiandmeid. Samal viisil töödeldud andmetest pikkuse kohta võib olla kasu kontrollrühma ja katserühma(de) võrdlemisel kokkupuutest tuleneva mõju suhtes. Kui massiandmete analüüsi käigus ei täheldata statistiliselt olulisi erinevusi, võib katserühma(de) ja kontrollrühma andmed ühte koondada ning arvutada üldisele lineaarsele korrelatsioonile vastava sirge tõusu näol kalade kasvu üldise kiiruskonstandi katses tervikuna ( $k_g$ ). Statistiliselt oluliste erinevuste ilmnemisel esitatakse kasvu kiiruskonstandi väärtus eraldi iga kalade rühma ja/või katsetapi kohta. Sel juhul tuleks igas rühmas leitud kiiruskonstanti kasutada asjaomase konkreetse rühma andmete korrigeerimiseks kasvust tingitud lahjenemise suhtes. Kui täheldatakse statistiliselt olulisi erinevusi omastamis- ja puhastumisetapi kiiruskonstantide vahel, tuleks kasutada puhastumisetapi andmete põhjal leitud kiiruskonstanti.

Arvutatud kasvu kiiruskonstandi ( $k_g$ , väljendatud päeva kohta) saab üldisest puhastumise kiiruskonstandist ( $k_2$ ) maha lahutada, et saada puhastumise kiiruskonstant  $k_{2g}$ .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{võrrand A5.27}]$$

Omastamise kiiruskonstandi jagamisel kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandiga saadakse kasvu suhtes korrigeeritud kineetiline BCF, mille tähis on  $BCF_{K_g}$  (või leitakse  $BMF_{K_g}$ ).

$$BCF_{K_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{võrrand A5.28}]$$

Kasvu suhtes korrigeeritud teguri  $BMF_{K_g}$  leidmiseks kasutatakse toidukaudse kokkupuute katses saadud kasvu kiiruskonstanti võrrandis A7.5 (vt 7. liide).

#### **Kasvu suhtes korrigeerimine massipõhise meetodiga**

Eespool kirjeldatud kasvu kiiruskonstandi mahalahutamise meetodi asemel võib kasutada järgmist alternatiivset meetodit, mille puhul kasvu suhtes korrigeerimine ei ole vajalik. See meetod tugineb puhastumisandmete massipõhisele kasutamisele lähtuvalt terve kala massist, mitte kontsentratsioonist.

Puhastumisetapis täheldatud kontsentratsioon kudedes (uuritava aine mass kala massiühiku kohta) teisendatakse uuritava aine massiks kala kohta: kontsentratsioon igas kalas viiakse tabelis (nt arvutipõhises tabelis) kokku asjaomase kala massiga ja iga kontsentratsioon korrutatakse vastava terve kala massiga, et saada uuritava aine mass kala kohta kõikides puhastumisetapi proovides.

Aine massi naturaallogaritmide väärtused kantakse tavapärasel viisil graafikule katse (puhastumisetapi) kulgu väljendava aja funktsioonina.

▼ M7

Veekaudse kokkupuute meetodi puhul leitakse omastamise kiiruskonstant tavapärasel viisil (vt jaotised 4 ja 6; tuleb tähele panna, et  $k_1$  arvutamisel tuleks kõvera lähendamise võrrandites kasutada „tavapärast“  $k_2$  väärtust) ja puhastumise kiiruskonstant eespool kirjeldatud andmete põhjal. Kuna saadud puhastumise kiiruskonstant põhineb aine massil terve kala kohta ega sõltu seega kasvust, tuleks selle tähisena kasutada  $k_2$  asemel  $k_{2g}$ -d.

#### 8. LIPIIDISALDUSE SUHTES NORMALISEERIMINE LÄHTUVALT LIPIIDISALDUSEST 5 % (ÜKSNES VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI PUHUL)

Veekaudse kokkupuute katsest leitud kineetilise ja stationaarset olekut iseloomustava BCFi väärtus tuleks lisaks esitada lähtuvalt standardsest kala lipiidisaldusest 5 % märgmassist, välja arvatud juhul, kui on võimalik tõendada, et uuritav aine akumuleerub peamiselt mujal kui rasvas (näiteks võib mõni perfluoritud aine seonduda valkudega). Kalades esinev kontsentratsioon või BCF tuleb ümber arvutada lähtuvalt lipiidisaldusest 5 % märgmassist. Kui igas proovivõtupunktis on nii uuritava aine kui ka lipiidide sisalduse mõõtmiseks kasutatud sama kala, tuleb iga mõõdetud kontsentratsiooni korreerida asjaomase konkreetse kala lipiidisalduse suhtes.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{võrrand A5.29}],$$

kus

$C_{f,L}$  on lipiidisalduse suhtes normaliseeritud kontsentratsioon kalas (mg/kg märgmassi alusel),

$L$  on lipiidide osakaal (märgmassi alusel) ja

$C_f$  on uuritava aine kontsentratsioon kalas (mg/kg märgmassi alusel).

Kui lipiidisaldust ei ole määratud kõikidel proovivõtmiseks valitud kaladel, kasutatakse BCFi normaliseerimiseks keskmist lipiidisaldust. Stationaarsetele olekule vastava BCFi puhul tuleks kasutada omastamisetapi lõpus uuritava ainega rühmas saadud tulemuste keskvaartust. Kineetilise BCFi normaliseerimise puhul on mõnel juhul õigustatud teistsuguse lähenemisviisi kasutamine, näiteks olukorras, kus lipiidisaldus on omastamis- või puhastamisetapi jooksul märkimisväärselt muutunud. Samas tuleks siiski alati kasutada söötmissrežiimi, millega hoitakse ära lipiidisalduse muutumine suurel määral.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{võrrand A5.30}],$$

kus

$BCF_{KL}$  on lipiidisalduse suhtes normaliseeritud kineetiline BCF (l/kg),

$L_n$  on lipiidide keskmine osakaal (märgmassi alusel) ja

$BCF_K$  on kineetiline BCF (l/kg).

#### KIRJANDUS

- (1) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Käesoleva lisa peatükk C.20 „Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse“.
- (3) Spacie, A., ja Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309–320.

▼ M7

- (4) Sijm, D. T. H. M., Verberne M. E., de Jonge, W. J., Pärt, P., ja Oppenhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.
- (5) Bintein, S., Devillers, J., ja Karcher, W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29–39.
- (6) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Taani Veekvaliteedi Instituut, Hørsholm, Taani.
- (7) Arnot, J. A., Meylan, W., Tunkel, J., Howard, P. H., Mackay, D., Bonnell, M., ja Boethling, R. S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168–1177.
- (8) OECD (2011). QSAR Toolbox 2.1. Veebruar 2011. Kätesaadav aadressil [http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en\\_2649\\_34379\\_42923638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html).
- (9) Branson, D. R., Blau, G. E., Alexander, H. C., ja Neely, W. B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785–792.
- (10) Ernst, W. (1985). Accumulation in aquatic organisms. Väljaandes: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Sheeman, P., *et al.* (toim.), John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA, lk 243–255.
- (11) Reilly, P. M., Bajramovic, R., Blau, G. E., Branson, D. R., ja Sauerhoff, M. W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614–622.
- (12) Hawker, D. W., ja Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Water Res.* 22: 701–707.
- (13) Konemann, H., ja van Leeuwen, K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere* 9: 3–19.

▼ **M7**

## 6. liide

**VEEKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI VÕRRANDITE OSA: MINIMEERITUD KATSEPLAAN**

Siin kirjeldatud lähenemisviisi puhul on lähtutud põhimõttest, et biokontsentratsiooniteguri võib täismahus katse tulemuste põhjal leida kas biokontsentratsioonitegurina statsionaarses olekus ( $BCF_{SS}$ ), mis väljendab kalakudedes esineva uuritava aine kontsentratsiooni ja vees esineva uuritava aine kontsentratsiooni suhet, või kineetilise biokontsentratsioonitegurina ( $BCF_K$ ), mis väljendab omastamise kiiruskonstandi  $k_1$  ja puhastumise kiiruskonstandi  $k_2$  suhet.  $BCF_K$  on kehtiv ka olukorras, kus omastamisetapis ei saavutata aine sisalduse puhul statsionaarset olekut, eeldusel, et omastamine ja puhastumine toimuvad ligikaudu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale.

Kui aine sisaldust kudedes ( $C_{f1}$ ) mõõdetakse kokkupuute lõpus ( $t_1$ ) ja uuesti ( $C_{f2}$ ) pärast teatava ajavahemiku möödumist ( $t_2$ ), võib puhastumise kiiruskonstandi ( $k_2$ ) hindamiseks kasutada 5. liites esitatud võrrandit A5.22.

Omastamise kiiruskonstandi  $k_1$  võib seejärel algebraliste tehete abil arvutada 5. liites esitatud võrrandist A5.23 (kus  $C_f$  on võrdne  $C_{f1}$ -ga ja  $t$  on võrdne  $t_1$ -ga) (1). Minimeeritud katseplaani alusel saadud kineetiline biokontsentratsioonitegur (selle tähis on  $BCF_{Km}$ , et eristada seda mõne muu meetodi kohaselt leitud kineetilisest biokontsentratsioonitegurist) on seega:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{võrrand A6.1}].$$

Kontsentratsioonandmeid või saadud tulemusi tuleks korrigeerida kasvust tingitud lahjenemise suhtes ja normaliseerida need lähtuvalt kala lipiidisisaldusest 5 %, nagu on kirjeldatud 5. liites.

Minimeeritud katseplaani alusel saadud  $BCF_{SS}$  on BCF, mis on arvutatud omastamisetapi lõpus lähtuvalt eeldusest, et on saavutatud statsionaarne olek. Viimast on võimalik üksnes eeldada, sest proovivõtupunktide arv ei ole selle tõendamiseks piisav.

$$\text{Minimeeritud katseplaani kohane } BCF_{SS} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{võrrand A6.2}],$$

kus

$C_{f - \text{minSS}}$  on kontsentratsioon kalas omastamisetapi lõpus eeldatavalt saavutatud statsionaarses olekus (mg/kg märgmassi alusel) ja

$C_{w - \text{minSS}}$  on kontsentratsioon vees omastamisetapi lõpus eeldatavalt saavutatud statsionaarses olekus (mg/l).

**KIRJANDUS**

- (1) Springer, T. A., Guiney, P. D., Krueger, H. O., ja Jaber, M. J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271–2280.

▼ **M7**

## 7. liide

**TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE MEETODI VÕRRANDITE OSA**

1. Näide sobiva kaubandusliku kalasööda koostisosade sisalduse kohta
2. Sööda rikastamise meetodite näited
3. Imendumistõhususe ja biokuhjumisteguri arvutamine
4. Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimine
5. Alghetke iseloomustava mõõdetud sisalduse (C0,m) ja eeldatava sisalduse (C0,d) vahelise erinevuse hindamine
6. Juhised uuritavate ainete kohta, millest puhastumine on väga kiire

**1. NÄIDE SOBIVA KAUBANDUSLIKU KALASÖÖDA KOOSTISOSADE SISALDUSE KOHTA**

Peamine koostisosa	Sisaldus kalajahus
Toorvalk	≤ 55,0 %
Toorrasv	≤ 15,0 % <sup>(1)</sup>
Toorkiud	≥ 2,0 %
Niiskus	≥ 12 %
Tuhk	≥ 8 %

<sup>(1)</sup> Mõnes piirkonnas võib kättesaadav olla üksnes selline kalasööt, mille lipiidisisaldus on esitatud ülemmäärast oluliselt väiksem. Sellisel juhul tuleks uuringus kasutada kättesaadavat väiksema lipiidisisaldusega sööta ja kohandada söötmisrežiimi, et tagada kalade püsimine tervena. Sööda lipiidisisaldust ei tohiks õli lisamisega kunstlikult suurendada.

**2. SÖÖDA RIKASTAMISE MEETODITE NÄITED****Üldnõuded**

Kontrollrühma sööt tuleks valmistada täpselt samal viisil kui rikastatud sööt, kuid ilma uuritava ainet.

Töödeldud söödas aine sisalduse kontrollimiseks tuleks rikastatud söödast võtta sobiva meetodiga kolm paralleelproovi ja mõõta saadud proovides uuritava aine sisaldus või radioaktiivsus. Tuleks tõendada, et analüütilise tuvastamise tõhusus on suur (> 85 %) ja proovidevaheline varieeruvus väike (aine sisaldus katse alguses võetud kolmes proovis ei tohiks keskvaartuse suhtes varieeruda rohkem kui ± 15 %).

Toidukaudse kokkupuute katses tuleks uuritava aine sisalduse määramiseks söödas võtta kolm söödaproovi katse nullpäeval ja omastamisetapi lõpus.

**Kalasööda valmistamine puhta vedela uuritava ainega**

Määratakse kindlaks soovitud nominaalne katsekonsentratsioon töödeldud kalasöödas, näiteks 500 µg uuritavat ainet grammi sööda kohta. Sobiv kogus (molaarmassi või eriradioaktiivsuse alusel) puhast uuritavat ainet lisatakse klaaspurgis või pöördaurusti kolvis teadaolevale kogusele kalasöödale. Kalasööda kogusest peaks jätkuma omastamisetapi lõpuni (tuleb võtta arvesse

▼ **M7**

ka vajadust suurendada söödakogust igal söötmiskorral, tulenevalt kalade kasvamisest). Uuritavat ainet ja kalasööta tuleks omavahel aeglase pööritamise teel õõ läbi segada (näiteks pöörleva segisti abil või pöördaurusti kolvis). Rikastatud sööta tuleks kuni kasutamiseni säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult).

**Kalasööda valmistamine kandeainena kasutatava maisi- või kalaõliga**

Tahke uuritav aine tuleks uhmis peeneks pulbriks hõõruda. Vedela uuritava aine võib lisada otse maisi- või kalaõlile. Uuritav aine lahustatakse teadaolevas koguses (nt 5–15 ml) maisi- või kalaõlis. Ainet sisaldav õli viiakse kadudeta sobiva suurusega pöördaurusti kolbi. Õlile aine lisamiseks kasutatud kolbi tuleks loputada kahe väikese alikvoodi õliga ja lisada need pöördaurusti kolbi, et tagada kogu lahustunud uuritava aine ülekandmine. Aine täieliku õlis lahustumise/dispergeerumise tagamiseks (või juhul, kui katses kasutatakse mitut uuritavat ainet) lisatakse kolbi mikrosegisti, kolb suletakse korgiga ja segu segatakse õõ läbi suurel kiirusel. Kolbi lisatakse katse jaoks sobiv kogus kalasööta (tavaliselt graanulite kujul) ja kolvi sisu ühtlaseks segamiseks pööratakse kolbi pidevalt vähemalt 30 minutit, kuid soovitatavalt õõ läbi. Seejärel säilitatakse rikastatud sööta sobivates tingimustes (nt jahutatult), et tagada uuritava aine püsivus söödas kuni selle kasutamiseni.

**Kalasööda valmistamine orgaanilise lahustiga**

Sobiv kogus uuritavat ainet (molaarmassi või eriradioaktiivsuse alusel), millest piisab soovitud sisalduse saavutamiseks, lahustatakse sobivas orgaanilises lahustis (nt tsükloheksaan või atsetoon; 10–40 ml või ka suurem kogus, kui seda nõuab rikastatava sööda kogus). Üks alikvoot selles lahuses või kogu lahus (osakaupa lisatuna) segatakse katse jaoks piisava koguse kalasöödaga, et saavutada vajalik aine nominaalne sisaldus. Sööda segamiseks uuritava ainega võib kasutada roostevabast terasest segamismõud, mis jäetakse koos äsja rikastatud kalasöödaga kaheks ööpäevaks laboratoorsesse tõmbekappi (sööta segatakse aeg-ajalt), et liigne lahusti saaks aurustuda, või pidevalt pöörlevat pöördaurusti kolbi. Liigse lahusti „ärapihutamiseks“ võib vajaduse korral kasutada õhu- või lämmastikujuga. Tuleks jälgida, et uuritav aine lahusti eemaldamise käigus ei kristalliseeruks. Rikastatud sööta tuleks kuni kasutamiseni säilitada tingimustes, milles uuritav aine on söödaga segatuna püsiv (nt jahutatult).

**3. IMENDUMISTÕHUSUSE JA BIOKUJUMISTEGURI ARVUTAMINE**

Imendumistõhususe arvutamiseks tuleks esmalt leida puhastumisetapi proovides mõõdetud kontsentratsioonide keskvaartuste põhjal üldise puhastumise kiiruskonstandi hinnanguline väärtus vastavalt 5. liite jaotisele 4 (tuleks kasutada järjestikuse analüüsi meetodit, st standardset lineaarset regressiooni). Söödatarbimise kiiruskonstant  $I$  ja omastamisetapi kestus  $t$  on teadaolevad katseparameetrid. Söödas määratud uuritava aine keskmine sisaldus  $C_{söö}$  on katse käigus mõõdetav muutuja. Uuritava aine sisaldus kalas omastamisetapi lõpus ( $C_{0,d}$ ) leitakse tavaliselt naturaallogaritmide kontsentratsiooni ja puhastumisetapi kulgu päevades väljendava aja vahelist sõltuvust kirjeldava sirge algordinaadi põhjal.

Aine imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus;  $\alpha$ ) arvutatakse järgmiselt:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{söö}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{võrrand A7.1}],$$

kus

$C_{0,d}$  on aine eeldatav sisaldus kalas puhastumisetapi alghetkel (mg/kg),

▼ M7

$k_2$  on üldine (kasvu suhtes korrigeerimata) puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta), mis on arvatud vastavalt 5. liite jaotises 3 esitatud võrranditele,

$I$  on söödatarbimise kiiruskonstant (sööda grammides grammi kala kohta päevas),

$C_{\text{sööt}}$  on aine sisaldus söödas (milligrammides sööda kilogrammi kohta) ja

$t$  on söötmissperioodi kestus (päevades).

Imendumistõhususe  $\alpha$  täpse väärtuse leidmiseks võib siiski olla vaja korrigeerida arvutustes kasutatavat söödatarbimise kiirust  $I$  kalade kasvu suhtes. Katses, kus kalade kasv omastamisetapis (mille vältel söödakogust ei muudeta, et pidada kinni kindlaksmääratud söötmissäärast) on märkimisväärne, muutub tegelik söödatarbimise kiirus omastamisetapi käigus väiksemaks kui kindlaksmääratud söötmissäär ning tegelik imendumistõhusus on sellest tulenevalt suurem. (Tuleb tähele panna, et BMFi arvutamise puhul ei ole see oluline, kuna võrrandite A7.1 ja A7.4 kombineerimisel taandub liige  $I$  välja.) Kasvust tingitud lahjenemise suhtes korrigeeritud keskmise söödatarbimise kiiruse  $I_g$  võib leida mitmel viisil, kuid üks otsene ja range viis on kasutada teadaolevat kasvu kiiruskonstanti ( $k_g$ ) katsealuste kalade massi hindamiseks omastamisetapi konkreetsel ajahetkel:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_s \cdot t} \quad [\text{võrrand A7.2}],$$

kus

$W_f(t)$  on kalade keskmine mass omastamisetapi  $t$ -ndal päeval ja

$W_{f,0}$  on kalade keskmine mass katse alguses.

Sel viisil saab hinnata kalade keskmist massi (vähemalt) viimasel kokkupuutepäeval ( $W_{f,\text{omastamise-lõpp}}$ ). Kuna söötmissäär on määratud kindlaks  $W_{f,0}$  alusel, saab kõnealuse kahe kehamassi väärtuse abil arvutada tegeliku söödatarbimise kiiruse igal omastamispäeval. Kasvu suhtes korrigeeritud keskmise söödatarbimise kiiruse  $I_g$  (sööda grammides grammi kala kohta päevas), mida kasutatakse omastamisetapis toimuva kiire kasvu puhul  $I$  asemel, saab seega arvutada järgmiselt:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{omastamise-lõpp}}} \quad [\text{võrrand A7.3}].$$

Pärast imendumistõhususe leidmist saab arvutada BMFi; selleks korrutatakse imendumistõhusus söödatarbimise kiiruskonstandiga  $I$  (või  $I_g$ , kui  $\alpha$  arvutamiseks on kasutatud seda konstanti) ning jagatakse saadud väärtus üldise puhastumise kiiruskonstandiga  $k_2$ :

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{võrrand A7.4}].$$

Samal viisil tuleks arvutada ka kasvu suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur, mille puhul lähtutakse kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstandist (see leitakse vastavalt 5. liite jaotisele 7). Kui  $\alpha$  leidmiseks on kasutatud  $I_g$ -d, tuleks siingi kasutada  $I$  asemel seda konstanti:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{võrrand A7.5}],$$

kus

$\alpha$  on imendumistõhusus (uuritava aine absorbeerumine soolestikus),

$k_2$  on üldine (kasvu suhtes korrigeerimata) puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta), mis on arvatud vastavalt 5. liite jaotises 3 esitatud võrranditele,

▼ **M7**

$k_{2g}$  on kasvu suhtes korrigeeritud puhastumise kiiruskonstant (päeva kohta) ja

$I$  on söödatarbimise kiiruskonstant (sööda grammides grammi kala kohta päevas).

Kasvu suhtes korrigeeritud poolväärtusaeg ( $t_{1/2}$ ) arvutatakse järgmiselt:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{võrrand A7.6}].$$

Aine toidust imendumise tõhusust saab hinnata ka aine jääkide määramisega omastamisetapi lineaarses osas (1.–3. omastamispäeval). Sel juhul leitakse aine imendumistõhusus ( $\alpha$ ) järgmiselt:

$$\alpha = \frac{C_f(t)}{I \times C_{sööet} \times t} \quad [\text{võrrand A7.7}],$$

kus

$C_f(t)$  on uuritava aine kontsentratsioon kalas ajahetkel  $t$  (mg/kg märgmassi alusel).

#### 4. LIPIIDISISALDUSE SUHTES KORRIGEERIMINE

Kui kõikides proovivõtupunktides on nii lipiidisisaldus kui ka kemikaali sisaldus määratud samal kalal, tuleks igas kalas mõõdetud aine sisaldust korrigeerida asjaomase kala lipiidisisalduse alusel ja kanda lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud naturaalogaritmitud kontsentratsioonandmed graafikule päevades väljendatud puhastumisaja funktsioonina, et leida  $C_{0,d}$  ja  $k_2$ . Seejärel saab arvutada imendumistõhususe (võrrand A7.1) lipiidisisalduse alusel; selleks kasutatakse näitaja  $C_{sööet}$  puhul lipiidisisaldusest lähtuvat väärtust (st  $C_{sööet}$  korrutatakse lipiidide keskmise osakaaluga söödas). Järgnevalt saab võrrandite A7.4 ja A7.5 abil otse arvutada lipiidisisalduse (ja kasvust tingitud lahjenemise) suhtes korrigeeritud BMFi.

Muul juhul leitakse lipiidide keskmine massiosa kalades ja söödas nii katserühmas kui ka kontrollrühmas (sööda ja kontrollrühma kalade puhul kasutatakse tavaliselt kokkupuute alguses ja lõpus saadud andmeid, katserühma kalade puhul aga üksnes kokkupuute lõpus saadud andmeid). Mõne katse vältel võib kalade lipiidisisaldus oluliselt suureneada; sel juhul on asjakohasem kasutada katsealuste kalade keskmist lipiidisisaldust, mis on arvatud kokkupuute lõpus ja puhastumise lõpus mõõdetud väärtuste põhjal. Üldjuhul tuleks kummagi lipiidide osakaalu näitaja leidmiseks kasutada üksnes katserühma andmeid.

Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise tegur ( $L_C$ ) arvutatakse järgmiselt:

$$L_C = \frac{L_f}{L_{sööet}} \quad [\text{võrrand A7.8}],$$

kus  $L_f$  ja  $L_{sööet}$  on lipiidide keskmine osakaal vastavalt kalades ja söödas.

Lipiidisisalduse suhtes korrigeerimise teguri abil leitakse lipiidisisalduse suhtes korrigeeritud biokuhjumistegur ( $BMF_L$ ):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \quad [\text{võrrand A7.9}].$$

#### 5. ALGHETKE ISELOOMUSTAVA MÕÕDETUD SISALDUSE ( $C_{0,M}$ ) JA EELDATAVA SISALDUSE ( $C_{0,D}$ ) VAHELISE ERINEVUSE HINDAMINE

Alghetke iseloomustavat mõõdetud sisaldust ( $C_{0,m}$ ) ja eeldatavat sisaldust ( $C_{0,d}$ ) tuleks omavahel võrrelda. Nende näitajate suur omavaheline sarnasus viitab puhastumisparameetrite leidmiseks kasutatud esimest järku reaktsiooni mudeli sobivusele.



## ▼ M7

Mõnes katses võidakse täheldada märkimisväärset erinevust alghetke iseloomustava eeldatava väärtuse  $C_{0,d}$  ja mõõtmistulemuste keskvaartuse  $C_{0,m}$  vahel (vt käesoleva katsemeetodi punkti 159 viimane alapunkt). Kui  $C_{0,d}$  on väga palju väiksem kui  $C_{0,m}$  ( $C_{0,d} \ll C_{0,m}$ ), võib see erinevus viidata seedimata rikastatud sööda esinemisele soolestikus. Seda võib katseliselt kontrollida väljalõigatud seedekulgla eraldi analüüsimise teel, kui omastamisetapi lõpus on proovide jaoks võetud ja säilitatud täiendav arv terveid kalu. Vastasel juhul ning kui puhastumisetapi andmete lineaarse regressiooni puhul kasutatud statistiliselt usaldusväärsest võõrväärtuste testist nähtub, et puhastumisetapi esimeses proovis mõõdetud sisaldus on ekslikult suur, võib olla asjakohane viia lineaarne regressioon  $k_2$  leidmiseks läbi ilma puhastumisetapi esimese kontsentratsioonipunktita. Kui sellise lineaarse regressiooni määramatus on oluliselt väiksem ja on selge, et puhastumiskineetika vastab ligikaudselt esimest järku reaktsiooni kineetikale, võib olla sobiv kasutada saadud  $C_{0,d}$  ja  $k_2$  väärtust imendumistõhususe arvutamiseks. Katseprotokollis tuleks esitada sellekohane ammendav põhjendus. Samuti on võimalik, et puhastumine ei toimu vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale. Kui see on tõenäoline (st naturaallogaritmide andmed näivad järgivat lineaarse regressiooni sirge asemel kõverjoont), on  $k_2$  ja  $C_{0,d}$  arvutuslik väärtus ilmselt vale ning tuleks kasutada biostatistiku abi.

Kui  $C_{0,d}$  on väga palju suurem kui mõõdetud väärtus ( $C_{0,d} \gg C_{0,m}$ ), võib see viidata sellele, et ainest puhastumine on väga kiire (st proovivõtupunktide andmete puhul toimub lähenemine analüüsimeetodi määramispiirile puhastumisetapi väga varases järgus; vt allpool jaotis 6), et puhastumiskineetika kaldub kõrvale esimest järku reaktsiooni kineetikast, et  $k_2$  ja  $C_{0,d}$  leidmiseks kasutatud lineaarne regressioon ei ole läbi viidud õigesti või et katse mõnes proovivõtupunktis esines sisalduse mõõtmisel probleeme. Sellisel juhul tuleks lineaarse regressiooni graafiku lähemal uurimisel kindlaks teha, kas mõni kontsentratsioonipunkt on määramispiiril või selle lähedal, kas esineb võõrväärtusi ja kas andmepunktid järgivad selgelt kõverjoont (see viitab muud kui esimest järku reaktsiooni kineetikale), ning tuua see katseprotokollis esile. Iga järgnevat hinnanguliste väärtuste täpsuse suurendamiseks uuesti läbi viidavat lineaarse regressiooni tuleks kirjeldada ja põhjendada. Kui täheldatakse olulist kõrvalekaldumist esimest järku reaktsiooni kineetikast, on  $k_2$  ja  $C_{0,d}$  arvutuslik väärtus ilmselt vale ning tuleks kasutada biostatistiku abi.

## 6. JUHISED UURITAVATE AINETE KOHTA, MILLEST PUHASTUMINE ON VÄGA KIIRE

Nagu on selgitatud käesoleva katsemeetodi punktis 129, võib mõnest ainest puhastumine olla nii kiire, et usaldusväärse  $k_2$  ja alghetke iseloomustava kontsentratsiooni  $C_{0,d}$  leidmine ei ole võimalik, kuna aine ei ole puhastumisetapi väga varases järgus võetud proovides (st alates puhastumisetapi teisest proovist) praktiliselt enam määratav (selle sisalduseks märgitakse määramispiiri). Kõnealust olukorda täheldati käesoleva katsemeetodi kontrollimiseks tehtud laboritevahelises võrdlusuuringus benso[a]püreeni puhul ning see on dokumenteeritud meetodi valideerimisaruandes. Sellisel juhul ei ole lineaarne regressioon usaldusväärne ja selle abil saadav  $C_{0,d}$  hinnanguline väärtus on ebareaalselt suur ning sellest tulenevalt on näilik imendumistõhusus palju suurem kui 1. Sellises olukorras on võimalik arvutada  $k_2$  ja maksimaalse BMFi konservatiivne hinnanguline väärtus.

Konstandi  $k_2$  väärtuse hindamiseks lineaarse regressiooni teel (lähtuvalt naturaallogaritmide kontsentratsiooniandmete sõltuvusest ajast) kasutatakse puhastumisetapi neid andmepunkte, kus sisaldus oli mõõdetav, ja esimest sellist punkti, millest alates aine ei olnud enam määratav (selle sisalduseks loeti määramispiiri). Sellisel juhul kasutatakse tõenäoliselt üksnes kahte (nt puhastumisetapi 1. ja 2. proovivõtupäeva) andmepunkti, mille alusel saab hinnata  $k_2$  väärtust vastavalt 5. liites esitatud võrrandile A5.22. Leitud hinnangulist  $k_2$  väärtust saab kasutada imendumistõhususe hindamiseks vastavalt võrrandile A7.1, kus  $C_{0,d}$  väärtus asendatakse mõõdetud sisaldusega

**▼ M7**

alghetkel ( $C_{0,m}$ ), juhul kui hinnanguline  $C_{0,d}$  on ilmselgelt palju suurem kui katses olnuks võimalik saavutada. Kui  $C_{0,m}$  ei ole mõõdetav, tuleks kasutada määramispiiri kalakudedes. Kui mõnel juhul leitakse sellise arvutuse tulemusena, et  $\alpha > 1$ , loetakse imendumistõhususe väärtuseks 1 ehk halvimalle olukorrale vastav väärtus.

Seejärel võib võrrandi A7.4 alusel arvutada  $BMF_K$  maksimaalse hinnangulise väärtuse, mille esitamisel tuleks kasutada tähist „palju väiksem kui“ ( $\ll$ ). Näiteks katse puhul, kus söötismäär on 3 %, puhastumise poolväärtusaeg on lühem kui 3 päeva ja  $\alpha$  väärtus on vastavalt halvimalle olukorrale 1, on  $BMF_K$  tõenäoline väärtus väiksem kui umbes 0,13. Tulenevalt sellise hinnangulise näitaja otstarbest ja asjaolust, et kõnealune väärtus on oma olemuselt konservatiivne, ei ole vaja seda kasvust tingitud lahjenemise ega kalade ja sööda lipiidisisalduse suhtes korrigeerida.

▼ M7

## 8. liide

**LÄHENEMISVIISID BCF-DE EELDATAVA HINNANGULISE VÄÄRTUSE LEIDMISEKS TOIDUKAUDSE KOKKUPUUTE KATSEST SAADUD ANDMETE PÕHJAL**

Käesolev katsemeetod hõlmab toidukaudse kokkupuute meetodit selliste ainete bioakumuleerumise uurimiseks, mille puhul ei saa praktikas kasutada veekaudse kokkupuute meetodit. Veekaudse kokkupuute meetodiga leitakse biokontsentratsioonitegur, toidukaudse kokkupuute meetodiga aga saadakse otseselt teavet söömisest tuleneva võimaliku biokuhjumise kohta. Paljudes kemikaalide ohutust käsitlevates süsteemides (näiteks riskihindamisel ja ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise süsteemis) nõutakse veekaudse biokontsenteerumise andmete esitamist. Seega on vaja leida toidukaudse kokkupuute katsest saadud andmete põhjal hinnanguline biokontsentratsioonitegur, mis on võrreldav veekaudse kokkupuute meetodi kohases katses leitud näitajaga<sup>(1)</sup>. Käesolevas liites on vaadeldud lähenemisviise selle saavutamiseks; samal ajal ollakse teadlikud sellistele hinnangutele omastest puudustest.

Toidukaudses katses mõõdetakse ainekust puhastumist, et leida puhastumise kiiruskonstant  $k_2$ . Kui olemasolevate andmete põhjal saab leida omastamise kiiruskonstandi, mis kirjeldab olukorda, kus kalad on puutunud uuritava ainega kokku vee kaudu, on võimalik arvutada hinnanguline kineetiline BCF.

Uuritava ainega vee kaudu kokkupuutumist iseloomustava omastamise kiiruskonstandi hinnanguline väärtus sõltub paljudest eeldustest, mis kõik mõjutavad kõnealuse hinnanguga seotud määramatust. Peale selle eeldatakse sellisel viisil BCFi hindamise puhul, et üldine puhastumiskiirus (mida muu hulgas mõjutavad sellised tegurid nagu jaotumine organismis ja konkreetsed puhastumisprotsessid) ei sõltu kokkupuutemeetodist, millega saavutatakse uuritava aine akumuleerumine organismis.

Kõnealuse hindamist võimaldava lähenemisviisi puhul vajalikud põhieeldused võib kokku võtta järgmiselt.

Toidukaudsele omastamisele järgnev puhastumine toimub asjaomase aine puhul samal viisil kui veekaudsele kokkupuutele järgnev puhastumine.

Omastamine veest toimub vastavalt esimest järku reaktsiooni kineetikale.

Sõltuvalt omastamise hindamiseks kasutatavast meetodist:

- on omastamine korreleeritav ainult kalade massiga,
- on omastamine korreleeritav ainult aine jaotuskoeffitsiendiga süsteemis oktanool/vesi,
- on omastamine korreleeritav nii kalade massi kui ka süsteemis oktanool/vesi täheldatavat aine jaotuskoeffitsienti hõlmavate kombineeritud andmetega,
- on tegelikult veekaudse kokkupuute katses omastamist mõjutada võivate tegurite, näiteks aine bioaadavuse, seadmetele adsorbeerumise, molekuli suuruse
- jms mõju väike.

Kõige olulisem aga on eeldus, et omastamise hindamise meetodi väljatöötamiseks kasutatav andmebaas (õppeandmestik) on asjaomase aine suhtes representatiivne.

Mitmes avalikest allikatest kättesaadavas artiklis on kirjeldatud võrrandeid, mis väljendavad kalas lõpuste kaudu toimuva veest omastamise seost aine jaotuskoeffitsiendiga süsteemis oktanool/vesi, kala massiga (1–4), mahuga ja/või lipiidisaldusega, membraani läbimise / imendumise tõhususega (5, 6) või kala hingamismahuga minutis (7), või mille puhul kasutatakse aine lenduvusel/massibilansil põhinevat lähenemisviisi (8–10). Selliseid meetodeid on kõnealuses kontekstis

<sup>(1)</sup> Looduslikus veekeskkonnas toimub kokkupuute väga hüdrofoobsete ainetega kõige suuremal määral tõenäoliselt toidu tarbimise kaudu, mistõttu hinnanguline BCF ei kajasta täielikult sellise aine võimaliku bioakumuleerumise määra.

▼ **M7**

üksikasjalikult hinnatud Crookes ja Brooke (11). Selles kontekstis sisaldab kasulikkude teavet ka toidu kaudu omastamisest tuleneva bioakumuleerumise modelleerimist käsitlev Barberi artikkel (12), kuna see hõlmab ka lõpuste kaudu omastamise kiirust käsitlevatest mudelitest tulenevaid täiendusi. Nimetatud aspektile on keskendutud ka 2004. aasta toidukaude kokkupuute katsemetodi taustdokumendi (13) ühes osas.

Enamik kõnealustest mudelitest näivad olevat välja töötatud piiratud mahuga andmebaaside põhjal. Mudelite puhul, mille väljatöötamisel aluseks võetud andmebaaside kohta on olemas üksikasjalik teave, näib olevat kasutatud selliseid aineid, mis on sageli sarnase struktuuriga või kuuluvad sarnasesse funktsionaalrühma (nt kloororgaanilised ühendid). See suurendab katsespetsiifiliste tegurite, näiteks katseliigi, temperatuuri jms kõrval veelgi määramatust asjaomase mudeli kasutamisel kõnealustest ainetest erinevat liiki ainete omastamise kiiruskonstandi hindamiseks.

Olemasolevaid meetodeid käsitlevas ülevaates (11) on esile toodud, et ükski meetod ei ole „õigem“ kui mõni teine. Seepärast tuleks kasutatava mudeli valimist selgelt põhjendada. Kui on olemas mitu meetodit, mille kasutamist saab põhjendada, võib olla mõistlik esitada omastamise hindamise eri meetoditega saadud mitu  $k_1$  (ja sellest tulenevalt BCFi) hinnangulist väärtust või  $k_1$  (ja BCFi) väärtuste vahemik. Eri tüüpi mudelite ja nende väljatöötamiseks kasutatud andmetike vahelistest erinevustest tulenevalt ei ole eri viisil saadud hindamistulemuste keskväärtuse arvutamine siiski kohane.

Mõni teadlane on seisukohal, et selliseid hinnangulisi BCFi väärtusi on vaja korrigeerida biosaadavuse suhtes, et võtta arvesse aine adsorbeerumist lahustunud orgaanilisele süsinikule veekaude kokkupuute tingimustes ning viia sellega asjaomane hinnanguline väärtus vastavusse veekaude kokkupuute katsete tulemustega (nt viited 13 ja 14). Selline korrigeerimine ei pruugi aga olla asjakohane, kui võtta arvesse, et veekaude kokkupuute katses halvimalle olukorrale vastava (st aine biosaadava ja lahuses mõõdetud fraktsiooni suhet kajastava) hinnangulise väärtuse saamiseks vajalik lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus on väike. Väga hüdrofoobsete ainete puhul võib lõpuste kaudu omastamist piirata passiivse difusiooni kiirus lõpusepinna lähedal; sellisel juhul on võimalik, et kõnealuse korrigeerimisega kajastatakse seda mõju, mitte olukorda, mille jaoks nimetatud korrigeerimine on ette nähtud.

Soovitatakse keskenduda meetoditele, mille sisendandmed on siin kirjeldatud toidukaude kokkupuute meetodi kohaselt uuritavate ainete puhul hõlpsalt kättesaadavad (st log  $K_{OW}$ , kalade mass). Võib kasutada muid meetodeid, mis nõuavad keerukamaid sisendandmeid, kuid selleks võib olla vaja teha katses lisamõõtmisi või hankida uuritava aine või asjaomase kalaliigi kohta üksikasjalikku teavet, mis ei pruugi olla laialdaselt kättesaadav. Peale selle võib mudeli valimist mõjutada mudeli valideerituse tase ja kasutusvaldkond (eri meetodite võrdlev ülevaade on esitatud viites 11).

Tuleks meeles pidada, et saadud hinnanguline  $k_1$  ja BCFi väärtus on ebatäpsed ning aine bioakumuleerumise määra ülevaate saamiseks võib olla vaja vaadelda neid tõendite kaalukusel põhineva lähenemisviisi raames koos leitud BMFi ja ainet iseloomustavate parameetritega (nt molekuli suurus). Kõnealuste parameetrite tõlgendamine ja kasutamine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust.

## KIRJANDUS

- (1) Sijm, D. T. H. M., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1993). The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1–14.
- (2) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., Pärt, P., ja Opperhuizen, A. (1994). Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325–341.
- (3) Sijm, D. T. H. M., Verberne, M. E., de Jonge, W. J., Pärt P., ja Opperhuizen, A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharm.* 131: 130–135.

▼ M7

- (4) Barber, M. C. (2003). A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963–1992.
- (5) Opperhuizen, A. (1986). Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. Väljaandes: Aquatic Toxicology and Environmental Fate. STP 921, Poston, T. M., ja Purdy, R. (toim.), USA Materjalide Katsetamise Ühing, Philadelphia, PA, USA, lk 304–315.
- (6) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (7) Thomann, R. V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699–707.
- (8) Hendriks, A. J., van der Linde, A., Cornelissen, G., ja Sijm, D. T. H. M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399–1420.
- (9) Campfens, J., ja Mackay, D. (1997). Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577–583.
- (10) Arnot, J. A., ja Gobas, F. A. P. C. (2003). A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337–345.
- (11) Crookes, M., ja Brooke, D. (2010). Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Aruande kavand. Environment Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber, M. C. (2008). Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755–777.
- (13) Anonüümne autor (2004). Background document to the fish dietary study protocol. Uute ja olemasolevate kemikaalide tehnilise komitee püsivate, bioakumuleerivate ja toksiliste ainete töörühmale esitatud dokument.
- (14) Gobas, F., ja Morrison, H. (2000). Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. Väljaandes: Handbook of property estimation methods for chemicals. Boethling, R. S., ja Mackay, D. (toim.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, lk 189–231.

**▼B****C.14. NOORKALADE KASVUKATSE****1. MEETOD**

Käesolev kasvu toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 215 (2000).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva katse eesmärk on hinnata kemikaalidega pikaajalise kokkupuute mõju noorkalade kasvule. See põhineb meetodil, mis töötati välja ja mida on võrreldud laboritevaheliselt (1, 2) Euroopa Liidu piires, et hinnata kemikaalide mõju noorte vikerforellide (*Oncorhynchus mykiss*) kasvule läbivoolutingimustes. Võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike. Näiteks on saadud kogemusi sebrakala (*Danio rerio*) (3, 4) ja jaapani riisikalaga (*Oryzias latipes*) (5, 6, 7) tehtud kasvukatsetest.

Vt ka üldise sissejuhatus C osa.

**1.2. MÕISTED**

**LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, vähim toimet avaldav kontsentratsioon)** – madalaim uuritud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse võrreldes kontrolliga aine märgatavat mõju ( $p < 0,05$ ). Siiski peavad kõik uuritavad kontsentratsioonid, mis on suuremad kui LOEC, omama kahjulikku mõju, mis on võrdne või suurem kui LOEC korral täheldatud mõju.

**NOEC (No Observed Effect Concentration – katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon)** – uuritav kontsentratsioon, mille väärtus jääb vahetult alla LOEC väärtuse.

**EC<sub>x</sub>** – käesolevas katsemeetodis uuritava aine kontsentratsioon, mis põhjustab x % muutuse kala kasvukiiruses võrreldes kontrollkatsetega.

**Laadimisnorm** – kalade märgmass vee ruumala kohta.

**Loomkoormus** – kalade arv vee ruumala kohta.

**Üksikute kalade kasvu erikiirus** – väljendab ühe üksiku kala kasvukiirust selle esialgse kaalu alusel.

**Kasvu keskmistatud erikiirus mahutis** – väljendab mahutis oleva populatsiooni keskmist kasvukiirust ühe kontsentratsiooni piires.

**Kasvu pseudoerikiirus** – väljendab individuaalset kasvukiirust võrrelduna mahutis oleva populatsiooni keskmise esialgse kaaluga.

**▼B**

## 1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ekspponentsiaalses kasvufaasis olevad noorkalad kaalutakse ja asetatakse katsekambritesse, kus nad eelistatult läbivoolutingimustes või, kui see ei ole võimalik, siis sobivates poolstaatilistes (staatiline – uuendamine) tingimustes puutuvad kokku vees lahustatud uuritava aine paljude subletaalsete kontsentratsioonidega. Katse kestab 28 päeva. Kalu toidetakse iga päev. Toiduratsioon põhineb kalade esialgsel kaalul ja selle võib ümber arvutada pärast 14. päeva. Katse lõppedes kaalutakse kalad uuesti. Mõju kasvukiirusele analüüsitakse regressioonimudeli abil eesmärgiga määrata kindlaks kontsentratsioon, mis põhjustaks kasvukiiruses  $x$  % muutuse, st  $EC_x$  (nt  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  või  $EC_{30}$ ). Alternatiivina võib neid andmeid võrrelda ka kontrollväärtustega, et määrata kindlaks vähim toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja seega ka täheldatavat toimet mitte-avaldav kontsentratsioon (NOEC).

## 1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt katsemeetod C.1), eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud kõnealuse katse jaoks, peaksid olema kättesaadavad. See tähendab, et on teada uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ja olemas on usaldusväärne analüütiline meetod aine kvantifitseerimiseks uuritavates lahustes teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega ja olemas on avastamispiir.

Kasulik teave on sealhulgas struktuurivalem, aine puhtus, püsivus vees ja valguse käes,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  ja kiire biolagunduvuse katse tulemused (vt katsemeetod C.4).

## 1.5. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

- kontroll-looma(de) suremus ei tohi katse lõpus ületada 10 %;
- kalade keskmine kaal kontrollrühma(de)s peab olema piisavalt suurenenud, et võimaldada avastada kasvukiiruse juures oluliseks peetav minimaalne muutus. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul peab kalade keskmine kaal kontrollrühmades suureneva 28 päeva jooksul vähemalt poole võrra (st 50 %) nende esialgsest kaalust; nt esialgne kaal: 1 g/kala (= 100 %), lõplik pärast 28. päeva:  $\geq 1,5$  g/kala ( $\geq 150$  %);
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest (ASV) kogu katse jooksul;
- vee temperatuur ei tohi mis tahes ajal katse jooksul katsekambrites erineda rohkem kui  $\pm 1$  °C ja see tuleks säilitada 2 °C piires katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (1. liide).

## 1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Seadmed

Tavalised laboratooriumiseadmed, eeskätt järgmised:

- hapniku- ja pH-mõõturid;

**▼B**

- seadmed vee kareduse ja leelisuse kindlaksmääramiseks;
- asjakohased temperatuuri reguleerimise ja eelistatavalt pideva monitooringu seadmed;
- keemiliselt inertsest materjalist soovitatud laadimisnormi ja loomkoormuse jaoks piisava suurusega mahutid (vt punkti 1.8.5 ja 1. liidet);
- sobiva täpsusega kaalud (st täpsus kuni  $\pm 0,5$  %).

**1.6.2. Vesi**

Uuringus võib kasutada mis tahes sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema katseperioodi jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, siiski ei tohiks see katse jooksul muutuda rohkem kui  $\pm 0,5$  pH-ühikut. Soovitatav vee karedus on üle 140 mg/l (väljendatuna CaCO<sub>3</sub>-na). Et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (nt moodustades uuritava aine kompleksi), tuleb vaheaegade järel võtta analüüsimiseks proove. Raskmetallid (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), enamik anioone ja katioone (nt Ca, Mg, Na, K, Cl ja SO<sub>4</sub>), pestitsiidid (nt fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus), kogu orgaanilise süsiniku ja heljuva tahke aine sisaldus tuleks määrata näiteks iga kolme kuu järel, kui lahjendamiseks kasutatav vesi teatakse olevat suhteliselt püsiva kvaliteediga. Kui vähemalt ühe aasta jooksul on tõestatud püsiv vee kvaliteet, võib neid määramisi teha harvemini ja intervalle pikendada (nt iga kuue kuu järel). 2. liites on esitatud mõned lahjendamiseks kasutatava vee nõuetekohased keemilised omadused.

**1.6.3. Uuritavad lahused**

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse ette põhilahust lahjendades.

Põhilahust tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamise lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne).

Lahustite või dispergantide (solubiliseerivate ainete) kasutamine võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla teatud juhtudel nõutav. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülsulfoksiid, dimetüülformamiid ja trietüleen-glükool. Sobivad dispergandid on näiteks Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metüülselluloos ja HCO-40. Kergesti biolagunduvate ainete (nt atsetoon) ja/või väga lenduvate ainete kasutamisel tuleb olla ettevaatlik, sest need võivad põhjustada probleeme bakterite kasvu tõttu läbivooluga katsetes. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju kalade kasvule ega märgatavat negatiivset mõju noorkaladele, mida saab täheldada ainult lahustiga tehtava kontrollkatse abil.



**▼B**

Läbivooluga katsete puhul tuleb kasutada süsteemi, mis pidevalt jaotab ja lahjendab uuritava aine põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaallahjendusseade, küllastus seadmega süsteem), et viia katsekambritesse sisse erinevad kontsentratsioonid. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu uuringu jooksul. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav vee eemaldumiskiirus katse jooksul 6 liitrit grammi kala kohta päevas (vt punkti 1.8.2.2).

Poolstaatiliste (uuendamiskatsete puhul sõltub keskkonna uuendamine uuritava aine püsivusest, kuid vett soovitatakse uuendada iga päev. Kui esialgsetes püsivuskatsetes (vt punkti 1.4) ei ole uuritava aine kontsentratsioon uuendamise perioodil stabiilne (st on väljaspool 80–120 % nimiväärtuse ulatust või langeb alla 80 % esialgselt määratud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda läbivoolukatse kasutamist.

#### 1.6.4. Liigi valimine

Käesoleva katse puhul soovitatakse kasutada vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), kuna enamik kogemusi on saadud selle liigi laboritevahelise võrdluse kaudu (1, 2). Siiski võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike, kuid katsemenetlust võib olla tarvis kohandada, et oleks tagatud sobivad katsetingimused. Näiteks on olemas kogemused ka sebrakala (*Danio rerio*) (3, 4) ja jaapani riisikalaga (*Oryzias latipes*) (5, 6, 7). Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

#### 1.6.5. Kalade pidamine

Katsealused kalad tuleb valida ühest populatsioonist, eelistatavalt samast pesakonnast, mida on hoitud vähemalt kaks nädalat enne katset sellistes veekvaliteedi ja valgustustingimustes, mis sarnanevad katsete kasutatavatele. Kalade päevane toiduratsioon peaks moodustama vähemalt 2 % kehakaalust ja eelistatavalt 4 % kehakaalust päevas kogu pidamisperioodi ja katse jooksul.

Pärast 48tunnise kohanemisperioodi lõppu registreeritakse suremus ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

- kui suremus on suurem kui 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: lükatakse kogu partii kõrvale;
- kui suremus on populatsioonist 5–10 %: lastakse kaladel aklimatiseeruda veel seitse päeva; kui nende järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, lükatakse kogu partii kõrvale;
- kui suremus on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 % populatsioonist: võetakse partii vastu.

Kalad ei tohiks saada haiguste ravi kaks nädalat enne katset ega katse ajal.

**▼ B**

## 1.7. KATSE KAVANDAMINE

„Katse kavandamine” on seotud uuritavate kontsentratsioonide arvu ja vahemike, iga kontsentratsioonitaseme jaoks mahutite arvu valiku ja kalade arvu valikuga mahuti kohta. Ideaaljuhul tuleks katse kavandada vastavalt

- uuringu eesmärkidele;
- kasutatava statistilise analüüsi meetodile;
- katsevahendite olemasolule ja maksumusele.

Eesmärkide aruanne peaks võimaluse korral määratlema statistilise võimsuse, millega antud erinevus (nt kasvukiiruses) tuleb tuvastada, või alternatiivina täpsus, millega tuleb määrata  $EC_x$  (nt  $x = 10, 20$  või  $30$  ja eelistatavalt mitte alla  $10$ ). Ilma selleta ei ole võimalik uuringu suurus kindlalt määratleda.

Tähtis on mõista, et plaan, mis on optimaalne (võimaldab ressursse kõige paremini ära kasutada) ühte statistilise analüüsi meetodit kasutades, ei ole ilmtingimata optimaalne teise jaoks. Seega ei ole soovitatav plaan LOEC/NOEC kindlaksmääramiseks sama, mida soovitakse regressioonanalüüsi korral.

Enamikul juhtudel eelistatakse regressioonanalüüsi dispersioonanalüüsile põhjustel, mida on käsitlenud Stephan ja Rogers (8). Siiski, kui ei ole leitud sobilikku regressioonimudelit ( $r^2 < 0,9$ ), tuleks kasutada NOEC/LOEC.

## 1.7.1. Regressioonanalüüsi kavandamine

Regressioonanalüüsi kasutava katse kavandamisel tuleb silmas pidada järgmisi tähtsaid asjaolusid:

- toimiv kontsentratsioon (nt  $EC_{10, 20, 30}$ ) ja see kontsentratsioonivahemik, mis pakub uuritava aine toime seisukohalt huvi, peaksid kindlasti olema kaetud katses kasutatavate kontsentratsioonidega. Täpsus, millega saab hinnata toimivaid kontsentratsioone, on suurim siis, kui toimiv kontsentratsioon paikneb kasutatud kontsentratsioonivahemiku keskel. Katse esialgse vahemiku leidmiseks võib olla kasulik katses kasutatavate sobivate kontsentratsioonide valimisel;
- selleks, et võimaldada rahuldavat statistilist modelleerimist, peaks katses kasutama vähemalt ühte kontrollmahutit ja viit erinevate kontsentratsioonidega lisamahutit. Solubiliseeriva aine kasutamisel tuleks lisaks katseseeriale kasutada ka ühte kontrollkatset, kus kasutatakse solubiliseerivat ainet kõige suuremas uuritud kontsentratsioonis (vt punkte 1.8.3 ja 1.8.4);
- kasutada võib sobilikku geomeetrilist või logaritmilist jada (9) (vt 3. liidet). Eelistada tuleb uuritavate kontsentratsioonide logaritmilist jaotust;

**▼B**

- kui kasutatakse rohkem kui kuut mahutit, tuleks lisamahuteid kasutada kas selleks, et võimaldada dubleerimist või jaotada need ära kontsentratsioonivahemike vahel, et võimaldada lähedasem vahemik tasemete vahel. Need mõlemad meetmed on võrdselt soovitatavad.

### 1.7.2. **Dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamine NOEC/LOEC määramise kavandamisel**

Eelistatavalt peaksid olema dubleerivad mahutid iga kontsentratsiooni jaoks ja statistiline analüüs tuleks teha mahuti tasandil (10). Ilma dubleerivate mahutiteta ei tohi lubada mahutite vahel mingit varieerivust peale selle, mis on põhjustatud üksikutest kaladest. Siiski, kogemus on näidanud (10), et mahutitevaheline varieerivus oli võrreldes mahutisisesse (st kaladevahelise) varieerivusega uuritud juhtumi korral väga väike. Seetõttu on statistilise analüüsi tegemine üksikute kalade põhjal suhteliselt aktsepteeritavaks alternatiiviks.

Tavapäraselt kasutatakse katses vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetriselises jadas, mille tegur eelistatavalt ei ületa 3,2.

Üldiselt, kui katsete tegemisel kasutatakse dubleerivaid mahuteid, peaks dubleerivate kontrollmahutite arv ja seega ka kalade arv olema kaks korda suurem iga uuritava kontsentratsiooni korral olevast arvust (12, 13, 14). Vastupidi, kui dubleerivaid mahuteid ei kasutata, peaks kontrollrühmas olevate kalade arv olema sama, mis iga uuritava kontsentratsiooni korral.

Kui ANOVA analüüs peab põhinema pigem mahutite kui üksikute kalade kohta käivaltel andmetel (mis eeldaks kas iga kala märgistamist või kasvu pseudoerikiiruse kasutamist (vt punkti 2.1.2)), peab dubleerivaid mahuteid olema piisavalt, et oleks võimalik kindlaks määrata sama uuritava kontsentratsiooniga mahutite korral saadud tulemuste standardhälvet. See tähendab, et vigasid puudutav vabadu-astme arv dispersioonanalüüsis peaks olema vähemalt 5 (10). Kui dubleeritakse ainult kontrollkatseid, on oht, et vea varieeruvus moondu- b, sest see võib suurene- da koos kõnealuse kasvukiiruse kesk- väärtusega. Kuna kasvukiirus kontsentratsiooni suurenedes tõenäoliselt aeglustub, toob see endaga kaasa varieerivuse liiga suureks hindamise.

## 1.8. KATSE KÄIK

### 1.8.1. **Katsealuste kalade valik ja kaalumine**

Tähtis on minimeerida kalade kaalu varieerumine katse alguses. 1. liites esitatakse erinevate liikide sobivad suuruste vahemikud, mida soovitatatakse käesolevas katses kasutada. Katses kasutatava terve kalapartii üksikute kalade kaal katse alguses peaks ideaaljuhul olema vahemikus  $\pm 10\%$  aritmeetilisest keskmisest kaalust ja igal juhul ei tohiks see ületada 25%. Soovitatav on varem kaaluda kalade näidispartii, et arvutada välja keskmine kaal.

**▼B**

Põhipopulatsiooni ei tohiks toita 24 tundi enne katse algust. Seejärel tuleks kalad valida välja juhuslikult. Kasutades üldanesteetikumi (nt 100 mg/l trikaiinmetaansulfonaati (MS 222) sisaldavat vesilahust, mis on neutraliseeritud kahe osa naatriumvesinikkarbonaadi lisamisega ühe osa MS 222 kohta), kaalutakse kalad üksikult märjalt (kuivaks pühituna) 1. liites toodud täpsusega. Kalad, kelle kaal on ettenähtud piirides, tuleks katsesse võtta ja jagada ära juhuslikult katseanumate vahel. Kalade kogu märgmass igas katsemahutis tuleks protokollida. Nii anesteetikumide kasutamine kui ka kalade käitlemine (sealhulgas kuivatamine ja kaalumine) võib põhjustada stressi ja vigastusi noorkaladele, eriti väiksema suurusega liikidele. Seetõttu tuleks noorkalu käidelda äärmise ettevaatlikkusega, et vältida katseloomadele stressi tekitamist ja nende vigastamist.

Kalad kaalutakse uuesti katse 28. päeval (vt punkti 1.8.6). Siiski, kui peetakse vajalikuks toiduratsioon ümber arvutada, võib kalu uuesti kaaluda ka katse 14. päeval (vt punkti 1.8.2.3). Kalade suuruse muutuste määramiseks võib kasutada ka teist meetodit, näiteks fotografeerimist, mille põhjal saab kohandada toiduratsioone.

## 1.8.2. **Kokkupuutetingimused**

### 1.8.2.1. *Kestus*

Katse kestus on  $\geq 28$  päeva.

### 1.8.2.2. *Laadimisnormid ja loomkoormused*

On oluline, et laadimisnorm ja loomkoormus sobiksid kasutatavale katseliigile (vt 1. liidet). Kui loomkoormus on liiga suur, põhjustab ülekoormus stressi, mis omakorda aeglustab kasvamise kiirust ja võib põhjustada haigestumist. Kui see on liiga väike, võib see põhjustada territoriaalset käitumist, mis omakorda võib mõjutada kasvu. Igal juhul peaks laadimisnorm olema piisavalt väike, et õhustamiseta säilitada lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis moodustab vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav laadimisnorm 16 forelli (kaaluga 3–5 g) 40 liitris. Soovitav vee eemaldumiskiirus katse jooksul on 6 liitrit grammi kala kohta päevas.

### 1.8.2.3. *Söötmine*

Kalu tuleks sööta sobiva toiduga (1. liide) piisaval määral, et esile kutsuda aktsepteeritavat kasvukiirust. Hoolt tuleb kanda mikroobide kasvu vältimise ja vee hägustumise eest. Vikerforelli puhul vastab 4 %ne päevane kaaluüve tõenäoliselt nendele tingimustele (2, 15, 16, 17). Päevase ratsiooni võib jagada kaheks võrdseks portsjoniks ja anda kaladele kaks korda päevas, vähemalt viietunnise vahega. Ratsioon põhineb kalade esialgsel kogukaalul iga katseanuma kohta. Kui kalad kaalutakse uuesti 14. päeval, arvutatakse ratsioon ümber. Kalu ei tohiks toita 24 tundi enne kaalumist.

**▼B**

Söömata toit ja väljaheited tuleks eemaldada katseanumast iga päev, puhastades hoolikalt iga mahuti põhja imedes.

**1.8.2.4. Valgus ja temperatuur**

Fotoperiood ja veetemperatuur peaksid olema sobivad katseliigile (1. liide).

**1.8.3. Uuritavad kontsentratsioonid**

Tavaliselt nõutakse uuritava aine viit kontsentratsiooni hoolimata uuringu kavast (vt punkti 1.7.2). Eelnevad teadmised uuritava aine toksilisuse kohta (nt akuutsest katsest ja/või vahemiku määramise uuringutest) peaks aitama välja valida sobivad uuritavad kontsentratsioonid. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgem uuritav kontsentratsioon ei tohiks ületada aine lahustuvuspiiri vees.

Kui põhilahuse valmistamisel kasutatakse solubiliseerivat ainet, ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peaks eelistatavalt olema sama kõikides katseanumates (vt punkti 1.6.3). Siiski tuleks tarvitusele võtta kõik meetmed, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

**1.8.4. Kontrollimised**

Lahjendamiseks kasutatava vee kontrollimiste arv sõltub uuringu kavast (vt punkte 1.7–1.7.2). Kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleks seda kontrollida sama arv kordi kui vett.

**1.8.5. Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

Katse jooksul määratakse uuritava aine kontsentratsioonid korrapärase ajavahemike tagant (vt allpool).

Läbivoolukatsetes tuleb kontrollida lahusti ja mürkaine põhilahuse voolukiiruseid kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu katse jooksul. Kui eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioonid on  $\pm 20$  % nimiväärtusest (st vahemikus 80–120 %; vt punkte 1.6.2 ja 1.6.3), soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid uuritavaid kontsentratsioone katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega. Katse puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku  $\pm 20$  % nimiväärtusest (uuritava aine püsivusandmete põhjal), on vajalik analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, kuid järgides sama režiimi.

Poolstaatilistes (uuendamis)katsetes, kus eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku  $\pm 20$  % nimiväärtusest, soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid kontsentratsioone kohe pärast valmistamist ja vahetult enne uuendamist uuringu alguses ja seejärel iga nädal. Katsete puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku  $\pm 20$  % nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, järgides sama režiimi, mida kasutatakse püsivamate ainete puhul.

**▼B**

On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Siiski, kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20\%$  nimiväärtusest või esialgselt mõõdetud kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimi- või mõõdetud väärtustel.

Proove võib olla vaja filtreerida (nt kasutades 0,45  $\mu\text{m}$  suuruseid poore) või tsentrifuugimist. Tsentrifugimine on soovitatav menetlus. Siiski, kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtreerimine aktsepteeritud.

Katse jooksul tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, pH-d ja temperatuuri kõikides katseanumates. Kontrollkatsetes ja suurima kontsentratsiooniga anumates mõõdetakse vee kogukaredust, leelisust ja soolsust (kui see on oluline). Lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja soolsust (kui see on oluline) tuleb mõõta minimaalselt kolm korda (katse alguses, keskel ja lõpus). Poolstaatiliste katsete puhul soovitatakse lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõta sagedamini, eelistatavalt enne ja pärast iga vee uuendamist või vähemalt kord nädalas. pH tuleks määrata staatilistes uuendamise katsetes iga vee uuendamise alguses ja lõpus ning vähemalt kord nädalas läbivooluga katsetes. Karedust ja leelisust tuleks mõõta üks kord iga katse ajal. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

#### 1.8.6. **Vaatlused**

Kaal: katse lõpus tuleb ära kaaluda kõik ellujäänud kalad märgmassi (kuivaks pühituna) saamiseks kas rühmana katseanuma kaupa või üksikult. Üksikute loomade kaalumisele, mis eeldab, et kõik kalad oleksid märgistatud, eelistatakse kaalumist katseanuma kaupa. Individuaalkaalu mõõtmise korral üksikute kalade kasvu erikiiruse kindlaksmääramiseks peaks olema valitud selline märgistamismeetod, mis väldiks loomadele stressi tekitamist (sobida võivad külmmärgistamise alternatiivid, nt peene värvilise õngenööri kasutamine).

Kalad tuleks katseperioodi jooksul üle vaadata iga päev ja mis tahes välised anomaaliad (nagu verejooks, värvimuutus) ja ebanormaalne käitumine kirja panna. Suremus tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei asendata, sest laadimisnorm ja loomkoormus on piisavad, et vältida mahutis olevate kalade arvu muutuse mõju kasvule. Siiski tuleb kohandada söödartsiooni.

## 2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

### 2.1. **TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Katse kavandamisel ja analüüsimisel soovitatakse kaasata statistikut, kuna käesolev katsemeetod võimaldab märkimisväärset varieerumist eksperimentaalses plaanis, näiteks katsekambrite arvus, uuritavate kontsentratsioonide arvus, kalade arvus jne. Pidades silmas uuringu kavandamises olevaid võimalusi, ei ole siin antud konkreetseid juhi- seid statistiliste menetluste kohta.

**▼ B**

Kasvukiirusi ei tuleks arvutada välja nende katseanumate kohta, milles suremus ületab 10 %. Siiski tuleks suremuse määr registreerida kõikide uuritavate kontsentratsioonide kohta.

Mis meetodit ka ei kasutata andemete analüüsimisel, keskseks kontseptsiooniks on kasvu erikiirus  $r$  aegade  $t_1$  ja  $t_2$  vahel. Seda võib väljendada erinevalt, sõltuvalt sellest, kas kõik kalad on märgistatud või mitte, või kas on tarvis keskmist väärtust mahuti kohta.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kus

$r_1$  = üksikute kalade kasvu erikiirus

$r_2$  = keskmine kasvu erikiirus mahutis

$r_3$  = kasvu pseudoerikiirus

$w_1, w_2$  = ühe konkreetse kala kaal vastavalt ajahetkedel  $t_1$  ja  $t_2$

$\log_e w_1$  = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi alguses

$\log_e w_2$  = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi lõpus

$\log_e W_1$  =  $w_1$  väärtuste logaritmid keskmine kalade kohta mahutis uuringuperioodi alguses

$\log_e W_2$  =  $w_2$  väärtuste logaritmid keskmine kalade kohta mahutis uuringuperioodi lõpus

$t_1, t_2$  = aeg (päevades) uuringuperioodi alguses ja lõpus

$r_1, r_2, r_3$  võib välja arvutada perioodi 0–28 päeva kohta ja vajaduse korral (st kui on tehtud mõõtmised 14. päeval) ka perioodide 0–14 ja 14–28 päeva kohta.

### 2.1.1. Regressioonanalüüsi tulemused (kontsentratsioon – vastuse modelleerimine)

Käesolev analüüsimeetod sobib esitama sobivat matemaatilist sõltuvust kasvu erikiiruse ja kontsentratsiooni vahel ja seega võimaldab kindlaks määrata  $EC_X$ , st mis tahes nõutava  $EC$  väärtuse. Käesoleva meetodi kasutamisel ei ole  $r$  arvutamine üksiku kala jaoks ( $r_1$ ) vajalik ja selle asemel võib analüüs põhineda keskmisel  $r$  väärtusel ( $r_2$ ) mahuti kohta. Eelistatud on viimane meetod. See on samuti sobivam väiksemate liikide kasutamise korral.

Mahuti keskmised spetsiifilised kasvu kiirused ( $r_2$ ) tuleks j joonestada graafiliselt kontsentratsiooniga suhestatuna, selleks et jälgida kontsentratsiooni-reaktsiooni suhet.

**▼B**

$r_2$  ja kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse väljendamiseks tuleks valida sobiv mudel ja selle valikut tuleb toetada sobiva põhjendusega.

Kui ellujäänud kalade arv on erinevates mahutites erinev, peab mudeli sobitamisel kasutama kas lihtsaid või mittelineaarseid kaalutud mudeleid, mis võimaldavad kasutada erineva suurusega rühmasid.

Mudeli sobitamise meetod peab võimaldama hinnangu andmist näiteks  $EC_{20}$ -le ja selle dispersioonile (kas standardviga või usaldusvahemik). Graafik sobitatud mudeli kohta tuleks andmete suhtes esitada nii, et mudeli sobivus oleks ilmne (8, 18, 19, 20).

### 2.1.2. Tulemuste analüüs LOEC kindlaksmääramiseks

Kui katse sisaldab endas mahutite dubleerimist kõikidel kontsentratsioonitasanditel, peaks LOEC kindlaksmääramine põhinema mahutit iseloomustava keskmise kasvu erikiiruse (vt punkti 2.1) dispersioonanalüüsil (ANOVA), millele järgneb sobiv meetod (nt Dunnett'i või Williamsi katse (12, 13, 14, 21) iga kontsentratsiooni keskmise  $r$ -väärtuse võrdlemiseks kontrollkatsete keskmise  $r$ -väärtusega eesmärgiga kindlaks määrata madalaim kontsentratsioon, mille jaoks see erinevus on oluline 0,05 tõenäosuse tasemel. Kui parameetriliste meetodite eeldatavad nõuded ei ole täidetud –normaaljaotusest erinev jaotus (nt Shapiro-Wilki katse) või heterogeenne dispersioon (Barletti katse) –, tuleks kaaluda andmete teisen-damist homogeenseteks dispersioonideks enne ANOVA analüüsi või kaalutud ANOVA tegemist.

Kui katses ei dubleerita mahuteid igal kontsentratsioonitasemel, on mahutitel põhinev ANOVA vähetundlik või ei ole seda võimalik teha. Sellisel juhul oleks vastuvõetavaks kompromissiks võtta ANOVA aluseks üksikute kalade kasvu pseudoerikiirused  $r_3$ .

Iga uuritava kontsentratsiooni  $r_3$  keskväärtust võib seejärel võrrelda kontrollkatsete  $r_3$  keskväärtusega. Seejärel võib kindlaks määrata LOEC nii nagu varem. Tuleb tunnistada, et kõnealune meetod ei võimalda mingil moel võtta arvesse suuremat mahutitevahelist varieeruvust kui see, mis on põhjustatud üksikute kalade vahelisest varieeruvusest, ega taga kaitset selle eest. Siiski on kogemus näidanud (8), et mahutitevaheline varieerivus oli väga väike võrreldes mahutisisesega (st kaladevahelise) varieerivusega. Kui analüüs ei hõlma üksikuid kalu, tuleb esitada võõrväärtuste identifitseerimise meetod ja õigustus selle kasutamiseks.

## 2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud mürkaine kontsentratsioonid on analüütilise meetodi avastamispiiri lähedal või kui poolstaatilistes katsetes on uuritava aine kontsentratsioon enne uuendamist väiksem kui värskest valmistatud lahuses.

## 2.3. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.



**▼B**

- 2.3.1. **Uuritav aine:**
- füüsikaline loomus ning olulised füüsikalis-keemilised omadused;
  - keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus ja uuritava aine kvantifitseerimiseks kasutatav analüütiline meetod (vajaduse korral).
- 2.3.2. **Katsealused liigid:**
- võimaluse korral teaduslik nimi;
  - liin, suurus, tarnija, mis tahes eelnev ravi jms
- 2.3.3. **Katsetingimused:**
- kasutatav katsemenetlus (nt poolstaatiline/uuendav, läbivool, laadimine, loomkoormus jne);
  - uuringu kava (nt katseanumate arv, uuritavad kontsentratsioonid ja dubleerivad anumad, kalade arv anuma kohta);
  - põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleb esitada ka selle kontsentratsioon);
  - uuritavate kontsentratsioonide nimiväärtused, uuritavas anumas mõõdetud keskvärtused ja nende standardhälbed ja nende saamismeetod ning tõendid selle kohta, et need mõõtmised vastavad uuritava aine kontsentratsioonide tegelikus lahuses;
  - lahjendamiseks kasutatava vee omadused: pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdetakse), kogu orgaaniline süsinik, suspendeeritud tahked ained, katsekeskkonna soolsus (kui mõõdetakse) ja mis tahes muud tehtud mõõtmised;
  - vee kvaliteet katseanumas: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
  - üksikasjalik teave söötmise kohta (nt toidu (toitude) liik, päritolu, antav kogus ja sagedus).
- 2.3.4. **Tulemused:**
- tõendid selle kohta, et kontrollkatsete korral kehtis valiidsuskriteerium, ning andmed mis tahes kontsentratsiooni korral esineva suremuse kohta;
  - kasutatud statistilise analüüsi meetodid, dubleerimisel või kaladel põhinev statistika, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite õigustus;
  - andmetabelid üksikute ja keskmiste kalakaalude kohta 0-, 14. (kui mõõdeti) ja 28. päeval, keskmise kasvu erikiiruse kohta mahutis või kasvu pseudoerikiiruse väärtused (vastavalt olukorrale) perioodide 0–28 päeva või võimaluse korral 0–14 ja 14–28 kohta;
  - statistilise analüüsi tulemused (st regressioonanalüüs või ANOVA) eelistatavalt tabelite ja graafikute kujul ning LOEC ( $p = 0,05$ ) ja NOEC või  $EC_x$  võimaluse korral koos vastavate standardvigadega;

**▼B**

— kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad mõjud, mida on põhjustanud uuritav aine.

## 3. VIITED

- 1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.
- 2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- 3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pp. 1855–1870.
- 4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pp. 157–164.
- 5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- 6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, pp. 287–297.
- 7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- 8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328–338.
- 9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.
- 10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- 11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- 12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.* 50, pp. 1096–1121.
- 13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.

**▼B**

- 14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pp. 103–117.
- 15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, pp. 123-133.
- 16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, pp. 33–41.
- 17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Testbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- 18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, pp. 1485–1494.
- 19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- 20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC<sub>p</sub> approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- 21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp. 510–531.

## 1. liide

## KATSETEKS SOOVITATAVAD KALALIIGID JA SOBIVAD KATSETINGIMUSED

Liik	Soovitav katse-temperatuuri vahemik (°C)	Fotoperiood (tundides)	Soovitav vahemik kala algkaalu jaoks (g)	Nõutav mõõtmistäpsus	Laadimisnorm (g/l)	Loomkoormus (liitri kohta)	Sõöt	Katse kestus (päevades)
<b>Soovitavad liigid:</b>								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	12,5–16,0	12–16	1–5	lähima 100 mg-ni	1,2–2,0	4	Kaubanduslik lõhelaste kalamaimude kuivtoit	≥ 28
<b>Teised hästi dokumenteeritud liigid:</b>								
<i>Danio rerio</i> Sebrakala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–10	Elustoit ( <i>Brachionus Artemia</i> )	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–20	Elustoit ( <i>Brachionus Artemia</i> )	≥ 28

**▼B**

## 2. liide

**MÕNED AKTSEPTEERITAVA LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA  
VEE KEEMILISEDOMADUSED**

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked ained (mikroosakestena)	< 20 mg/l
Kogu orgaaniline süsinik	< 2 mg/l
Ammoniaak (ioniseerimata)	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja poluklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites oleva kloori kogusisaldus	< 25 ng/l



## 3. liide

## Toksilisuse uuringuks sobivate kontsentratsioonide logaritmilised jadad (9)

Veerg (kontsentratsioonide arv 100 ja 10 või 10 ja 1 vahel) (*)						
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

(\*) Veerust võib valida viiest (või enamast) järjestikusest kontsentratsioonist koosneva jada. Kontsentratsioonidevahelised keskpunktid veerus (x) leitakse veerus (2x + 1). Loetletud väärtused võivad esindada kontsentratsioone, mida väljendatakse protsendina mahu või massi kohta (mg/l või µg/l). Väärtusi võib vajaduse korral korrutada või jagada 10 mis tahes astmega. 1. veergu võiks kasutada juhul, kui määramatus toksilisuse taseme kohta on suur.

**▼ B**

**C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV  
LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE**

**▼ M9**

See katsemeetod on välja jäetud, kuna seda ei peeta kemikaalide ökotoksikoloogiliste omaduste kohta määruse (EÜ) nr 1907/2006 alusel teabe saamiseks enam sobivaks. Asjaomase lõppnäitaja puhul kohaldatavad katsemeetodid on esitatud 0. osa tabelis 3.

**▼B****C.16. MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 213 (1998).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide suukaudse akuutse toksilisuse hindamiseks täiskasvanud töomesilaste abil.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse suukaudse toksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga on tõenäoline. Akuutse suukaudse toksilisuse uuring tehakse selleks, et määrata kindlaks pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilastele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilastele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt, ja mis põhinevad järjestikusel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli-ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

**1.2. MÕISTED**

**Akuutne suukaudne toksilisus** – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi suukaudset manustamist.

**Doos** – tarbitud uuritava aine kogus. Doosi väljendatakse uuritava aine massina ( $\mu\text{g}$ ) katselooma kohta ( $\mu\text{g}/\text{mesilane}$ ). Tegelikku doosi iga mesilase kohta ei saa välja arvutada, kuna mesilasi söödetakse kollektiivselt, kuid kindlaks on võimalik teha keskmine doos (kogu tarbitud uuritava aine/mesilaste arv ühes puuris).

**LD<sub>50</sub> (letaalse doosi mediaan), suukaudne** – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib suukaudsel manustamisel põhjustada surma 50 %-l isenditest. LD<sub>50</sub> väärtus avaldatakse uuritava aine mikrogrammides ( $\mu\text{g}$ ) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritava aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

**Suremus** – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

**1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Täiskasvanud töomesilased (*Apis mellifera*) viiakse kokku sahharoosilahuses dispergeeritud uuritava aine erinevate doosidega. Seejärel söödetakse mesilastele sama toitu ilma uuritava aineta. Suremus registreeritakse iga päev vähemalt 48 tunni jooksul ja võrreldakse kontrollkatsetes saadud väärtustega. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on katse kestust sobiv maksimaalselt 96 tunnini pikendada. Tulemusi analüüsitakse, et arvutada välja LD<sub>50</sub> väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.



**▼ B**

## 1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;

— toksilisuse standard LD<sub>50</sub> vastab kõnealusele vahemikule.

## 1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.5.1. Mesilaste kogumine

Kasutada tuleks sama tõugu noori töomesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida uuringu tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival“ (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainetega, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

## 1.5.2. Pidamis- ja söötmingimused

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roosteabast terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavad puupuure jms. Eelitatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta. Katsepuuri suurus peaks olema sobiv mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril  $25 \pm 2$  °C. Kogu katse jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemisemenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi, võib teha (päeva)valguses. Toiduks kasutatakse sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti). Pärast nimetatud uuritava doosi andmist tuleks toitu anda *ad libitum*. Toitmissüsteem peaks võimaldama registreerida toidu manustamise iga puuri kohta (vt punkti 1.6.3.1). Kasutada võib klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetri).

## 1.5.3. Mesilaste ettevalmistamine

Kogutud mesilased jagatakse juhuvaliku alusel katsepuuridesse, mille paigutus katseruumis on juhuslik.

**▼B**

Mesilastele võib toitu mitte anda kuni 2 tundi enne katse algust. Mesilastele soovitatakse enne aine mõjule allutamist toitu mitte anda, et kõik mesilased oleksid katse alguses seedekulgla sisu mõttes võrdses olukorras. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

#### 1.5.4. Dooside ettevalmistamine

Kui uuritav aine on veega segunev ühend, võib selle disperseerida kohe 50 % sahharoosilahuses. Tehniliste valmististe ja madala veelahustuvusega ainete korral võib kasutada kandeaineid, näiteks orgaanilised lahustid, mesilastele vähemürgised emulgaatorid või dispergandid (nt atsetoon, dimetüülformamiid, dimetüülsulfoksiid). Kandeaine kontsentratsioon sõltub uuritava aine lahustuvusest ja see peaks olema sama kõikide uuritavate kontsentratsioonide korral. Siiski on üldiselt sobiv kandeainekontsentratsioon 1 % ja seda ei tohiks ületada.

Tuleks valmistada sobivad kontroll-lahused, st kui uuritava aine lahustamiseks kasutatakse lahustit või disperganti, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: vesilahust ja sahharoosilahust, milles lahusti/kandeaine kontsentratsioon on sama mis doseerimislahustes.

### 1.6. KATSE KÄIK

#### 1.6.1. Katse- ja kontrollrühmad

Uuritavate dooside ja duplikaatide arv peaks vastama statistiliste nõuetele LD<sub>50</sub> kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD<sub>50</sub> jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb lahendusaste ja doseeritavate kontsentratsioonide arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos vs suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja doseerimiseks sobivad kontsentratsioonid.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast. Lisaks katseseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiit, milles igaühes on 10 mesilast. Kontrollpartiitid peaksid olema ka kasutatavate lahustite/kandeainete jaoks (vt punkti 1.5.4).

#### 1.6.2. Toksilisuse standard

Katseseerias peaks olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD<sub>50</sub> väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igaühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetooat, mille peroraalse LD<sub>50</sub> dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,35 µg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

**▼B****1.6.3. Kokkupuude****1.6.3.1. Doseerimine**

Igale mesilaste katserühmale tuleb anda 100–200 µl 50 % sahharoosi vesilahust, mis sisaldab sobivas kontsentratsioonis uuritavat ainet. Suuremat ruumala on vaja vähelahustuvate, madala toksilisusega või valmistises madala kontsentratsiooniga toodete korral, sest siis tuleb sahharoosilahuses kasutada suuremaid koguseid. Rühma kohta manustatud töödeldud toidu hulka tuleb jälgida. Pärast tarbimist (tavaliselt 3–4 tunni jooksul) tuleb toiteseade eemaldada puurist ja asendada teisega, mis sisaldab ainult sahharoosilahust. Sahharoosilahuseid antakse seejärel *ad libitum*. Mõningate ühendite puhul võib suure kontsentratsiooniga uuritavatest doosidest keeldumine põhjustada selle, et toitu tarbitakse vähe või üldse mitte. Töödeldud toit, mida ei ole tarbitud maksimaalselt 6 tunni jooksul, tuleks asendada ainult sahharoosilahusega. Tarbitud töödeldud toidu hulka tuleks hinnata (nt järelejäänud töödeldud toidu ruumala/massi mõõtmine).

**1.6.3.2. Kestus**

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi alates uuritava lahuse asendamisest ainult sahharoosi sisaldava lahusega. Kui suremus tõuseb jätkuvalt rohkem kui 10 % pärast esimest 24 tundi, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini, eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

**1.6.4. Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast katse algust ja seejärel 24. ja 48. tunnil (st pärast doseerimist). Kui osutub vajalikuks pikendatud vaatlusperiood, tuleks edasisi hindamisi teha 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini, eeldusel et suremus kontrollkatsetes ei ületa 10 %.

Rühma kohta manustatud toidu hulk tuleb kindlaks määrata. Töödeldud ja töötlemata toidu tarbimismäärade võrdlemine antud 6 tunni jooksul võib anda teavet töödeldud toidu maitsevuse kohta.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

**1.6.5. Piirsalduskatse**

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD<sub>50</sub> on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatsed, tarbitud töödeldud toidu koguse hindamine ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

**▼B****2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. ANDMED**

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärts, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Doosi-reaktsiooni sõltuvused koostatakse iga soovitatava vaatlusaja kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid ( $LD_{50}$ ) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). Kui töödeldud toit ei ole täielikult tarbitud, tuleks kindlaks määrata tarbitud uuritava aine doos rühma lõikes.  $LD_{50}$  tuleks avaldada uuritava aine  $\mu\text{g}$ -des mesilase kohta.

**2.2. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

**2.2.1. Uuritav aine:**

- füüsikaline loomus ning olulised füüsikalise-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);
- keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

**2.2.2. Katsealused liigid:**

- teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;
- teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, eelneva ravi jms kohta.

**2.2.3. Katsetingimused:**

- katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;
- pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;
- põhi- ja katselahuste valmistamismeetodid (kui kasutatakse lahustit, tuleb esitada ka selle nimetus ja kontsentratsioon);
- katse kavandamine, nt kasutatavad uuritavad kontsentratsioonid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;
- katse kuupäev.

**▼B**2.2.4. **Tulemused:**

- kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;
- lähteandmed: suremus iga doosi lõikes igal vaatlushetkel;
- doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;
- LD<sub>50</sub> väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;
- LD<sub>50</sub> kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;
- suremus kontrollrühmades;
- muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju, nt kõrvalekalded mesilaste käitumises (kaasaarvatud uuritavast doosist keeldumine), toidu tarbimise määr töödeldud ja töötlemata rühmades;
- mis tahes kõrvalekalle siinkirjeldatud katsemenetlustest ja muu oluline teave.

3. **VIITED**

- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.
- 2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119–125.
- 3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99–113.
- 4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265–267.

**▼B****C.17. MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 214 (1998).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide akuutse kontakttoksilisuse hindamiseks täiskasvanud töomesilastele.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse kontakttoksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui on tõenäoline mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga. Akuutse kontakttoksilisuse katse tehakse selleks, et kindlaks määrata pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilastele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilastele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt ja mis põhinevad järjestikulisel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli- ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

**1.2. MÕISTED**

**Akuutne kontakttoksilisus** – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi pealekandmist.

**Doos** – pealekantava uuritava aine kogus. Doosi väljendatakse uuritava aine massina ( $\mu\text{g}$ ) katselooma kohta ( $\mu\text{g}/\text{mesilane}$ ).

**LD<sub>50</sub> (letaalse doosi mediaan) kontakti korral** – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib kontaktmanustamisel põhjustada surma 50 % isenditest. LD<sub>50</sub> väärtust väljendatakse uuritava aine mikrogrammides ( $\mu\text{g}$ ) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritava aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

**Suremus** – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

**1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Täiskasvanud töomesilased (*Apis mellifera*) viiakse kokku sobivas kandeaines lahustatud uuritava aine erinevate doosidega, kandes need otse rindkerele (tilkadena). Katse kestus on 48 tundi. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on sobiv katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini. Suremust registreeritakse iga päev ja võrreldakse kontrollrühmas saadud väärtustega. Tulemused analüüsitakse, et arvutada välja LD<sub>50</sub> väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.

**▼B**

## 1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;

— toksilisuse standard LD<sub>50</sub> vastab kõnealusele vahemikule.

## 1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.5.1. Mesilaste kogumine

Kasutada tuleks sama tõugu noori töomesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud, sama tõugu jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida katse tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival“ (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainetega, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms, nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

## 1.5.2. Pidamis- ja söötmingimused

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roostevasest terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavaid puupuure jms. Katsepuuride suurus peaks olema vastavauses mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi. Eelistatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril 25 + 2 °C. Kogu uuringu jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemismenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi võib teha (päeva)valguses. Toiduks tuleks kasutada sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti) ja seda tuleks anda katse jooksul ad libitum, kasutades mesilaste toiteseadet. Selleks võib olla klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetrini).

## 1.5.3. Mesilaste ettevalmistamine

Pärast kogumist võib mesilased uuritava aine pealepanemiseks tuimestada süsinikdioksiidi või lämmastikuga. Kasutatava tuimasti kogus ja kokkupuuteaeg tuleks hoida minimaalsena. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

## 1.5.4. Dooside ettevalmistamine

Uuritav aine tuleb peale kanda kandeaines oleva lahusega, st orgaanilises lahustis või vesilahuses, mis sisaldab mürgavat ainet. Orgaanilise lahustina eelistatakse atsetooni, kuid kasutada võib ka teisi mesilastele vähemürgiseid orgaanilisi lahusteid (nt dimetüülformamiidi, dimetüülsulfoksiidi). Vees dispergeeritud valmistise ja orgaanilistes kandelahustites mittelahustuvate väga polaarsete orgaaniliste ainete lahuseid on lihtsam kasutada siis, kui need on valmistatud müügiloleva mürgava aine (nt Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween) lahjas lahuses.

**▼B**

Valmistada tuleks sobivad kontroll-lahused, st kui kasutatakse lahustit või disperganti uuritava aine lahustamiseks, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: üks, milles kasutatakse vett ja teine milles kasutatakse lahustit/disperganti.

## 1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. **Katse- ja kontrollrühmad**

Dooside ja uuritud duplikaatide arv peaks vastama statistilistele nõuetele LD<sub>50</sub> kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD<sub>50</sub> jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb dooside arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos vs suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja sobivaid doose.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast.

Lisaks katseseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiit, milles igäühes on 10 mesilast. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit või märgavat ainet, tuleb kasutada lahusti või märgava aine kohta kolme täiendavat kontrollpartiit, milles igäühes on 10 mesilast.

1.6.2. **Toksilisuse standard**

Katseseerias peab olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD<sub>50</sub> väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igäühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetooat, mille kontaktse LD<sub>50</sub> dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,30 µg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

1.6.3. **Kokkupuude**1.6.3.1. *Doseerimine*

Tuimestatud mesilastele kantakse uuritavat ainet peale individuaalselt. Mesilased määratakse juhuvaliku alusel erinevatele uuritavatele doosidele allutatavatesse rühmadesse ja kontrollrühmadesse. Iga mesilase rindkere selgmisele küljele määratakse peale mikroaplikaatoriga 1 µl uuritavat ainet sobivas kontsentratsioonis sisaldavat lahust. Kasutada võib ka muid koguseid, kui see on õigustatud. Pärast pealekandmist jagatakse mesilased katsepuuridesse ja neile antakse sahharoosilahust.

1.6.3.2. *Kestus*

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi. Kui suremus tõuseb 24 ja 48 tunni vahel rohkem kui 10 %, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.



**▼B****1.6.4. Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast doseerimist ja seejärel 24. ja 48. tunnil. Kui osutub vajalikuks vaatlusperioodi pikendada, tuleks teha edasisi hindamisi 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

**1.6.5. Piirsalduskatse**

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD<sub>50</sub> on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatsed ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

**2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. ANDMED**

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärts, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Sõltuvuse doos-reaktsioon koostatakse iga soovitava vaatlusaja (st 24. h, 48. h ja kui kasutatakse, siis ka 72. h ja 96. h) kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid (LD<sub>50</sub>) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). LD<sub>50</sub> tuleks avaldada uuritava aine µg-des mesilase kohta.

**2.2. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

**2.2.1. Uuritav aine:**

— füüsikaline loomus ning füüsikalised-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);

— keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

**2.2.2. Katsealused liigid:**

— teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;

— teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, celneva ravi jms kohta.

**▼B****2.2.3. Katsetingimused:**

- katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;
- pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;
- uuritava aine manustamise meetodid, nt kasutatud kandelahus, pealekantud uuritava lahuse ruumala, kasutatud tuimasti;
- katse kavandamine, nt kasutatud uuritavad doosid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava doosi ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;
- katse kuupäev.

**2.2.4. Tulemused:**

- kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;
- lähteandmed: suremus iga uuritud kontsentratsiooni kohta igal vaatlushetkel;
- doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;
- LD<sub>50</sub> väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;
- LD<sub>50</sub> kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;
- suremus kontrollrühmades;
- muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju ja mesilaste mis tahes ebatavalised reaktsioonid;
- mis tahes kõrvalekalded siinkirjeldatud katsemeetodi menetlustest ja muu oluline teave.

**3. VIITED**

- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.
- 2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. *Journal of Apicultural Research* 22, pp. 119-125.
- 3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, pp. 99–113.
- 4) Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Jour. Econ. Entomol.* 18, pp. 265–267.

**▼B****C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII TASAKAALUSTAMISE MEETODIT****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 106 mulla adsorptsiooni/desorptsiooni määramiseks, kasutades partii tasakaalustamise meetodit (2000).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev meetod võtab arvesse nii laboritevahelist võrdlust, adsorptsioonikatse tegemise jaoks mulla valikut puudutavat seminari (1, 2, 3, 4) kui ka riiklikul tasandil olemasolevaid juhiseid (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Adsorptsiooni-/desorptsiooniuringutest saadakse vajalikku teavet kemikaalide liikuvuse ja jaotumise kohta biosfääri maa-, vee- ja õhukihtides (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Seda teavet võib kasutada näiteks selleks, et prognoosida või hinnata kemikaalide lagunemist (22, 23), muundumist või organismide poolt omastamist (24), leostumist läbi mullakihtide (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), lenduvust mullast (21, 29, 30) või uhtumist maapinnalt looduslikku vette (18, 31, 32). Adsorptsiooni puudutavaid andmeid võib kasutada võrdlemiseks ja modelleerimiseks (19, 33, 34, 35).

Kemikaali jagunemine mulla- ja vesifaasi vahel on keeruline protsess, mis sõltub paljudest erinevatest teguritest: aine keemilisest iseloomust (12, 36, 37, 38, 39, 40), mulla omadustest (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) ja kliimateguritest, nagu näiteks sademed, temperatuur, päikesevalgus ja tuul. Seega ei saa kemikaali mullal toimuva adsorptsiooniprotsessiga seotud paljusid erinevaid nähtusi ja mehhanisme täielikult määratleda lihtsustatud laboratoorse mudeli, näiteks käesoleva meetodi abil. Olenemata sellest, et käesoleva meetodiga ei ole võimalik katta kõiki keskkonnas võimalikke juhtusid, annab see siiski väärtuslikku teavet kemikaali adsorptsiooni olulisuse kohta keskkonnale.

Vt ka üldist sissejuhatust.

**1.2. REGULEERIMISALA**

Selle meetodi eesmärk on kindlaks määrata kemikaalide adsorptsioon/desorptsioon mullas. Eesmärk on saada sorptsiooniväärtus, mida saab kasutada jaotumuse prognoosimiseks erinevates keskkonnatingimustes; selleks määratakse kindlaks kemikaali tasakaalulised adsorptsioonitegurid erinevatele muldadele mullaomaduste funktsioonina (nt orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH). Võimalikult laia konkreetse aine ja looduslike muldade vastastikuse mõju hõlmamiseks tuleb kasutada erinevaid mullatüüpe.

Käesolevas meetodis tähendab adsorptsioon kemikaali kinnitumisprotsessi mulla pinnale; selles ei eristata erinevaid adsorptsiooniprotsesse (füüsikaline ja keemiline adsorptsioon) ega selliseid protsesse nagu pindkatalüüsitud lagunemine, koguadsorptsioon või keemiline reaktsioon. Mulla tekitatud kolloidosakestes (läbimõõduga < 0,2 µm) toimunud adsorptsiooni ei võeta arvesse.

**▼ B**

Mullaparameetrid, mida peetakse adsorptsiooni puhul kõige tähtsamateks, on: orgaanilise süsiniku sisaldus (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), savisisaldus ja mullastruktuur (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) ning pH ioniseerivate ühendite jaoks (3, 4, 42). Muud mulla parameetrid, mis võivad mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni, on efektiivne katioonide neelamismahutavus (ECEC), amorfse raua ja alumiiniumoksiidide sisaldus, eriti vulkaaniliste ja troopiliste muldade puhul (4), ja samuti eripindala (49).

Katse eesmärk on määrata kemikaali adsorptsioon erinevates mullatüüpides, millel on erinev orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH. See koosneb kolmest tasemest:

**1. tase:** eelkatse, et teha kindlaks:

- mulla/lahuse suhe;
- adsorptsiooni tasakaaluoleku püstutamise aeg ja adsorbeerunud uuritava aine kogus tasakaaluolekus;
- uuritava aine adsorbeerumine katseanumate pindadel ja uuritava aine püsivus katseperioodi jooksul.

**2. tase:** sõeluuring: adsorptsiooni uuritakse viie erineva mullatüübi puhul, kasutades adsorptsioonikineetikat ühel kontsentratsioonil ja määrates jaotustegurid  $K_d$  ja  $K_{oc}$ .

**3. tase:** Freundlichi adsorptsiooniisotermide määramine, et oleks võimalik määrata kontsentratsiooni mõju mullas toimuva adsorptsiooni ulatusele.

Desorptsiooniuring, kasutades desorptsioonikineetikat/Freundlichi desorptsiooniisotermide (1. liide).

## 1.3. MÕISTED JA ÜHIKUD

Tähis	Mõiste	Ühikud
$A_{t_i}$	adsorptsiooniprotsent ajahetkel $t_i$	%
$A_{eq}$	adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus	%
$m_s^{ads}(t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajavaheühikus $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g}$
$m_0$	uuritava aine mass katseklaasis adsorptsioonikatse alguses	$\mu\text{g}$
$m_m^{ads}(t_i)$	uuritava aine mass, mõõdetud alikvoosis ( $v_a^A$ ) ajahetkel $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g}$
$m_{soil}$	mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina	g

## ▼ B

Tähis	Mõiste	Ühikud
$C_{st}$	aine põhilahuse massikontsentratsioon	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_0$	mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel $t_i$	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_0$	adsorptsioonikatse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi esialgne ruumala	$\text{cm}^3$
$V_a^A$	alikuubi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse	$\text{cm}^3$
$K_d$	adsorptsiooni jaotustegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{om}$	orgaanilise ainese suhtes normaliseeritud jaotustegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{ads}$	Freundlichi adsorptsioonitegur	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichi eksponent	
$D_{t_i}$	desorptsiooniprotsent ajahetkel $t_i$	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	ilmne desorptsioonitegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{des}$	Freundlichi desorptsioonitegur	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	mullast ajavahemikus $\Delta t_i$ desorbeerunud uuritava aine mass	$\mu\text{g}$
$m_m^{des}(eq)$	aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g}$
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa pärast ajavahemiku $\Delta t_i$ möödumist	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^A$	osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g}$
$C_s^{des}(eq)$	mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g g}^{-1}$

## ▼ B

Tähis	Mõiste	Ühikud
$C_{aq}^{des}(eq)$	uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga kokku puutuva vesifaasi koguruumala	$\text{cm}^3$
$V_R$	adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M $\text{CaCl}_2$ lahusega	$\text{cm}^3$
$V_a^D$	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil ajahetkel (i) võetud alikvoodi ruumala	$\text{cm}^3$
$V_{ra}i^D$	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse desorptsioonikineetika ruumala (paralleelmeetod)	$\text{cm}^3$
$V_r^F$	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus	$\text{cm}^3$
MB	massitasakaal	%
$m_E$	mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	$\mu\text{g}$
$V_{rec}$	adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala	$\text{cm}^3$
$P_{ow}$	jaotustegur oktanool/vesi	
pKa	dissotsiatsioonikonstant	
$S_w$	lahustuvus vees	$\text{g l}^{-1}$

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine lahuste teadaolevad ruumalad, märgistamata või radiomärgistatud, teadaolevate kontsentratsioonidena 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -s lisatakse teadaoleva kuivmassiga mullaproovidele, mis on eeltasakaalustatud 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -s. Segu segatakse piisava aja jooksul. Seejärel eraldatakse mullasuspensioonid tsentrifuugimise ja soovi korral filtreerimise teel ning analüüsitakse vesifaasi. Mullaproovile adsorbeerunud uuritava aine kogus arvutatakse algselt lahuses esinenud uuritava aine koguse ja katse lõpus järelejäänud uuritava aine koguse vahena (kaudne meetod).

Alternatiivina võib adsorbeerunud uuritava aine koguse määrata ka otse mullaanalüüsi teel (otsene meetod). Menetlust, mis sisaldab mulla astmelist eraldamist sobiva lahustiga, soovitatakse siis, kui aine kontsentratsiooni vahet lahuses ei ole võimalik täpselt määrata. Sellised juhud on näiteks: uuritava aine adsorptsioon katseanuma pinnale, uuritava aine ebastabiilsus katse tegemise jooksul, nõrk adsorptsioon, mis põhjustab lahuses vaid väikese kontsentratsioonimuutuse; ja tugev adsorptsioon, mis põhjustab madala kontsentratsiooni, mida ei ole võimalik täpselt määrata. Radiomärgistatud aine kasutamisel võib mulla eraldamise ära jätta, kui tehakse mullafaasi analüüs, kasutades põlemist ja vedelikstintillatsiooniloendust. Vedelikstintillatsiooniloendus on siiski mittespetsiifiline tehnika, millega ei saa teha vahet lähteainetel ja muundatud toodetel, seepärast tuleks seda kasutada ainult siis, kui uuritav aine on püsiv kogu uuringu jooksul.

**▼B**

## 1.5. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Soovitatakse kasutada märgistamata uuritavaid aineid, mille koostis on teada ja mille puhtusaste on eelistatavalt vähemalt 95 %, või radio-märgistatud uuritavaid aineid, mille koostis ja radioaktiivsete isotoopide puhtusaste on teada. Kui märgistusainete poolestusaeg on lühike, tuleks kohaldada lagunemise korrigeerimist.

Enne adsorptsiooni-desorptsioonikatse tegemist peab uuritava aine kohta olema kättesaadav järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (A.6);
- b) aururõhk (A.4) ja/või Henry konstant;
- c) abiootiline lagunemine: hüdrolüüs pH funktsioonina (C.7);
- d) jaotustegur (A.8);
- e) kiire biolagunduvus (C.4) või aeroobne ja anaeroobne muundumine mullas;
- f) ioniseerivate ainete pKa;
- g) otsene fotolüüs vees (st UV-Vis absorptsioonispekter vees, kvant-saagis) ja fotodegradatsioon mullas.

## 1.6. KATSE KASUTATAVUS

Katset kasutatakse keemiliste ainete puhul, mille kohta on olemas piisava täpsusega analüüsimeetod. Uuritava aine püsivus katse jooksul on tähtis parameeter, mis võib mõjutada tulemuste usaldatavust, eriti kui kasutatakse kaudset meetodit. Seega tuleb aine püsivust kontrollida eeluuringuga; kui katse tegemise jooksul tuvastatakse muundumine, soovitatakse põhiuuringu tegemiseks kasutada nii mulla- kui ka vesifaasi analüüsi.

Raskused võivad tekkida siis, kui katse tegemisel kasutatakse madala veelahustuvusega uuritavaid aineid ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ) või suure laenguga aineid, kuna kontsentratsiooni vesifaasis ei ole võimalik analüütiliselt mõõta piisava täpsusega. Sellisel juhul tuleb võtta lisameetmeid. Juhised selliste probleemide korral käitumiseks esitatakse käesoleva meetodi asjakohastes jagudes.

Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleb hoolitseda selle eest, et uuringu jooksul ei tekiks kadusid.

## 1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. **Seadmed ja keemilised reaktiivid**

Harilik laboratooriumivarustus, eelkõige järgmine.

- a) Katseklaasid või anumad katsete tegemiseks. On oluline, et katseklaasid või anumad:
  - sobiksid vahetult tsentrifuugi, et minimeerida käitlemisest ja ümberpaigutamisest tuleneda võivaid vigu;
  - oleksid tehtud inertsest materjalist, mis muudab uuritava aine adsorbeerumise nende pinnal minimaalseks.

**▼B**

- b) Raputi: ripraputi või samalaadne seade; raputi peab raputamise ajal hoidma mulda suspensioonis.
- c) Tsentrifuug: eelistatavalt suure kiirusega, nt tsentrifugaaljõuga > 3 000 g, reguleeritava temperatuuriga, võimeline eemaldama vesilahusest osakesi, mille läbimõõt on suurem kui 0,2 µm. Konteinerid peavad raputamise ja tsentrifugimise jooksul olema suletud, et vältida ainete lenduvust ja veekadu; korkidele tekkiva adsorbeerumise minimeerimiseks tuleb kasutada deaktiveeritud korke, näiteks Teflon®iga kaetud keeratavad korgid.
- d) Pole kohustuslik: filtreerimisese; poorsusega 0,2 µm, steriilsed ja ühekordselt kasutatavad filtrid. Eriti tähelepanelikult tuleks valida filtri materjal, et vältida uuritava aine kadu selsesse; nõrgalt lahustuvate uuritavate ainete korral ei soovitata kasutada orgaanilist filtrimaterjali.
- e) Analüüsivahendid, mis sobivad uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõtmiseks.
- f) Laboratooriumiahi, mis on suuteline säilitama temperatuuri 103–110 °C.

#### 1.7.2. Mulla iseloomustamine ja valik

Mulda tuleks iseloomustada kolme parameetri abil, mida peetakse enamasti vastutavaks adsorptsioonimahtuvuse eest: orgaaniline süsinik, savisisaldus ja mullastruktuur ning pH. Nagu juba nimetatud (vt „Reguleerimisala”), võivad ka muud mulla füüsikalise-keemilised omadused mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni ja neid tuleks sellisel juhul arvestada.

Mulla iseloomustamisel on kasutatavad meetodid väga olulised ja need võivad tulemusi märkimisväärselt mõjutada. Seetõttu soovitatakse mulla pH-d mõõta 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahuses (st lahuses, mida kasutatakse adsorptsiooni-/desorptsioonikatses) vastava ISO meetodi (ISO-10390-1) kohaselt. Samuti soovitatakse teised olulised mulla omadused määrata vastavalt standardmeetoditele (nt ISO „Handbook of Soil Analysis”); see võimaldab kasutada sorptsiooniandmete analüüsi, tuginedes ülemaailmselt standarditud mullaparametritele. Mõned olemasolevate mulla analüüsimise ja iseloomustamise standardmeetodite juhised on esitatud viidetes (50–52). Mulla katsemetodite kalibreerimiseks soovitatakse kasutada võrdlusmulda.

Juhised muldade valimiseks adsorptsiooni-/desorptsioonikatsete jaoks esitatakse tabelis 1. Seitse väljavalitud mulda hõlmavad erinevaid parasvöötme mullatüüpe. Ioniseeruvate uuritavate ainete jaoks peavad väljavalitud mullad hõlmama laia pH vahemikku, et oleks võimalik hinnata aine adsorptsiooni ioniseeritud ja ioniseerimata vormides. Juhised selle kohta, mitut erinevat mulda katse erinevates etappides kasutada, on esitatud punktis 1.9 „Katse käik”.

Kui eelistatakse teisi mullatüüpe, tuleks neid iseloomustada samade parameetritega ja neil peaks olema samalaadne omaduste varieeruvus nagu tabelis 1 kirjeldatud tüüpidel, isegi kui need ei vasta täpselt kriteeriumidele.





Tabel 1

**Juhised mullaproovide valimiseks adsorptsiooni-desorptsiooni jaoks**

Mullatüüp	pH-vahemik (0,01 M CaCl <sub>2</sub> lahuses)	Orgaanilise süsiniku sisaldus (%)	Savisisaldus (%)	Mulla struktuur <sup>(1)</sup>
1	4,5–015,5	1,0–2,0	65–80	savi
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	gleistunud saviliiv
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	ladestunud saviliiv
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	saviliiv
5	< 4,0–6,0 <sup>(2)</sup>	< 0,5–1,5 <sup>(2)</sup> , <sup>(3)</sup>	< 10–15 <sup>(2)</sup>	saviliivane liiv
6	> 7,0	< 0,5–1,0 <sup>(2)</sup> , <sup>(3)</sup>	40–65	gleistunud saviliiv/savi
7	< 4,5	> 10	< 10	liiv/saviliivane liiv

<sup>(1)</sup> Vastavalt FAO ja US süsteemile (85).

<sup>(2)</sup> Vastavad muutujad peaksid eelistatavalt jääma esitatud vahemikku. Kui sobivat mullamaterjali on siiski raske leida, aktsepteeritakse ka märgitud miinimumist väiksemaid väärtusi.

<sup>(3)</sup> Mullad, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on alla 0,3 %, võivad häirida orgaanilise aine sisalduse ja adsorptsiooni vahelist korrelatsiooni. Seetõttu on soovitatav kasutada muldasid, mille minimaalne orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,3 %.

**1.7.3. Mullaproovide kogumine ja ladustamine**
**1.7.3.1. Kogumine**

Ei soovitata mingeid konkreetseid proovivõtmise tehnikaid ega vahendeid; proovivõtmise tehnika sõltub uuringu eesmärgist (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Arvestada tuleks järgmist:

- a) vajalik on üksikasjalik teave väliplatsi ajaloo kohta; see sisaldab asukohta, taimkatet, pestitsiidide ja/või väetiste kasutamist, bioloogilisi lisandeid või juhuslikku reostust. Tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6) vastavalt proovivõtmise ala kirjeldusele;
- b) proovivõtukohta tuleb määratleda vastavalt UTM-ile (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) või geograafilistele koordinaatidele; see võimaldab tulevikus konkreetset mulda uuesti koguda või aidata määratleda mulda erinevates riikides kasutatavate erinevate klassifitseerimissüsteemide alusel. Samuti tuleks koguda ainult A-kihist kuni 20 cm sügavuselt. Eriti mullatüübi nr 7 korral, kui mullas esineb O<sub>h</sub>-kiht, tuleks see lisada proovile.

Mullaproovid tuleks transportida konteinerites ja sellistel temperatuuritingimustel, mis tagavad, et mulla esialgsed omadused märkimisväärselt ei muutu.

**▼B**1.7.3.2. *Ladustamine*

Eelistatakse mulda, mis on värskelt proovivõtualalt võetud. Ainult siis, kui see ei ole võimalik, võib mulda ladustada toatemperatuuril ja seda tuleks hoida õhukuivana. Ladustamisega ei piirata, kuid üle kolme aasta ladustatud mulda tuleks enne kasutamist uuesti analüüsida orgaanilise süsiniku sisalduse, pH ja katioonide neelamismahutavuse (CEC) suhtes.

1.7.3.3. *Mullaproovide käitlemine ja ettevalmistamine uuringuks*

Muld kuivatatakse õhu käes toatemperatuuril (eelistatavalt vahemikus 20–25 °C). Kogused tuleks jaotada võimalikult ettevaatlikult, nii et mulla struktuur muutuks nii vähe kui võimalik. Muld sõelutakse kuni osakeste suuruseni  $\leq 2$  mm; sõelumisprotsessi puhul tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6). Soovitatakse hoolikat homogeneenimist, sest see suurendab tulemuste reprodutseeritavust. Iga mulla niiskusesisaldus määratakse kindlaks kolme alikvoodiga, mida kuumutatakse temperatuuril 105 °C, kuni märgatavat massimuutust enam ei esine (ligikaudu 12 tundi). Kõikide arvutuste puhul tähendab mulla mass ahjukuiva massi, st mulla massi, mis on korrigeeritud niiskusesisaldusega.

1.7.4. **Uuritava aine mullale lisamiseks ettevalmistamine**

Uuritav aine lahustatakse 0,01 M CaCl<sub>2</sub> destilleeritud või deioniseeritud vee lahuses; CaCl<sub>2</sub> lahust kasutatakse kui vesilahuse faasi, et parandada tsentrifugimist ja minimeerida katioonide neelamist. Põhilahuse kontsentratsioon peaks eelistatavalt olema kolm suurusjärku kõrgem kui kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See lävi kaitseb mõõtmise täpsust vastavalt käesolevas meetodis kasutatavale meetodikale; lisaks sellele peaks põhilahuse kontsentratsioon olema allpool uuritava aine lahustuvuse piiri vees.

Põhilahus tuleks eelistatavalt ette valmistada vahetult enne selle lisamist mullaproovidele ja seda tuleks hoida suletuna pimedas temperatuuril 4 °C. Hoiuaeg sõltub uuritava aine püsivusest ja selle kontsentratsioonist lahuses.

Ainult halvasti lahustuvate ainete puhul ( $S_w < 10^{-4}$  g l<sup>-1</sup>) võib osutada vajalikuks kasutada sobivat solubiliseerivat ainet, kui uuritavat ainet on raske lahustada. See solubiliseeriv aine: a) peaks segunema veega, nagu näiteks metanool või atsetonitril; b) selle kontsentratsioon ei tohiks ületada 1 % põhilahuse koguruumalast ja peaks moodustama alla selle määra uuritava aine lahuses, mis puutub kokku mullaga (eelistatavalt alla 0,1 %); ja c) ei tohiks olla pindaktiivne aine ega osaleda solvolüüsis uuritavate kemikaalidega. Solubiliseeriva aine kasutamine tuleks sätestada ja uuringuaruandes ära põhjendada.

Teine võimalus halvasti lahustuvate ainete jaoks on uuritava aine lisamine uuritavasse süsteemi süstitavate portsjonite kaupa: uuritav aine lahustatakse orgaanilises lahustis, selle alikvoot lisatakse mullast ja 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusest destilleeritud või deioniseeritud veest koosnevasse süsteemi. Orgaanilise lahusti sisaldus vesifaasis tuleks hoida võimalikult madalal, tavaliselt mitte üle 0,1 %. Spaikimine orgaanilisest lahusest võib mõjutada negatiivselt mahu reprodutseeritavust. Seega on võimalik täiendava vea esinemine, kui uuritava aine ja kaaslahusti kontsentratsioonid ei ole samad kõikides katsetes.

**▼B**

## 1.8. ADSORPTSIOONI-/DESORPTSIOONIKATSE TEGEMISE EELDUSED'

1.8.1. **Analüüsimeetod**

Kõige tähtsamad parameetrid, mis võivad mõjutada sorptsiooni määramise täpsust, on nii lahuse-kui adsorptsioonifaaside analüüsimisel kasutatava analüüsimeetodi täpsus, uuritava aine püsivus ja puhtus, sorptsiooni tasakaaluoleku püstitamine, lahuse kontsentratsioonimuutuse suurus, mulla/lahuse suhe ja muutused mulla struktuuris tasakaaluprotsessi jooksul (35, 59–62). 2. liites esitatakse mõningad näited täpsust puudutavate küsimuste kohta.

Kasutatud analüüsimeetodi usaldusväärsust tuleb kontrollida sellises kontsentratsioonivahemikus, mis võib tõenäoliselt esineda uuringu käigus. Uuringu läbiviija võib vabalt välja töötada sobiva meetodi koos asjakohase täpsuse, kordustäpsuse, reprodutseeritavuse, avastamispiiride ja regenereeritavusega. Juhised sellise uuringu tegemiseks antakse allpool kirjeldatud katsega.

Sobiv ruumala 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahust, nt 100 cm<sup>3</sup>, segatakse 4 tunni jooksul mulla kogusega (nt 20 g), mille adsorptsioonivõime on kõrge, st millel on kõrge süsiniku- ja savisisaldus; need kogused ja ruumalad võivad varieeruda sõltuvalt analüüsi tingimustest, kuid alguspunkti on sobiv mulla/lahuse suhe 1:5. Segu tsentrifuugitakse ja vesifaasi võib filtreerida. Viimasele lisatakse teatav ruumala uuritava aine põhilahust, et saavutada nominaalne kontsentratsioon selles kontsentratsioonivahemikus, mis võib katse käigus tõenäoliselt esineda. See ruumala ei tohiks olla suurem kui 10 % vesifaasi lõplikust ruumalast, et võimalikult vähem muuta tasakaaluolekueelse lahuse omadusi. Lahust analüüsitakse.

Tuleb teha ka üks pimekatse ainult mulla ja CaCl<sub>2</sub> lahusega (ilma uuritava ainet), et oleks võimalik kontrollida analüüsimeetodist tulenevaid artefakte ja pinnasest põhjustatud maatriksefekte.

Analüüsimeetodid, mida võib kasutada sorptsiooni määramiseks, on gaasikromatograafia (GLC), kõrgsurvedelikkromatograafia (HPLC), spektromeetria (nt GC/massispektromeetria, HPLC/massispektromeetria) ja vedeliktsintillatsiooniloendus (radiomärgistatud ainete puhul). Kasutatavast analüüsimeetodist sõltumata loetakse sobivaks, kui taastumine jääb vahemikku 90–110 % nominaalväärtusest. Selleks, et võimaldada pärast jaotamist tulemust kindlaks määrata ja hinnata, peavad analüüsimeetodi avastamispiirid olema vähemalt kaks suurusjärku allpool nominaalset kontsentratsiooni.

Adsorptsiooniuringute tegemisel kasutatava analüüsimeetodi omadustel ja avastamispiiridel on katsetingimuste kindlaksmääramisel oluline roll ja need mõjutavad kogu katse tulemusi. Kõnealuse meetodiga järgitakse üldiseid katsete tegemise reegleid ja sellega antakse soovitusd ning juhtnõõrid alternatiivsete lahenduste jaoks, kui analüüsimeetod ja laboratoorsed võimalused jäävad kitsaks.

## ▼B

## 1.8.2. Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine

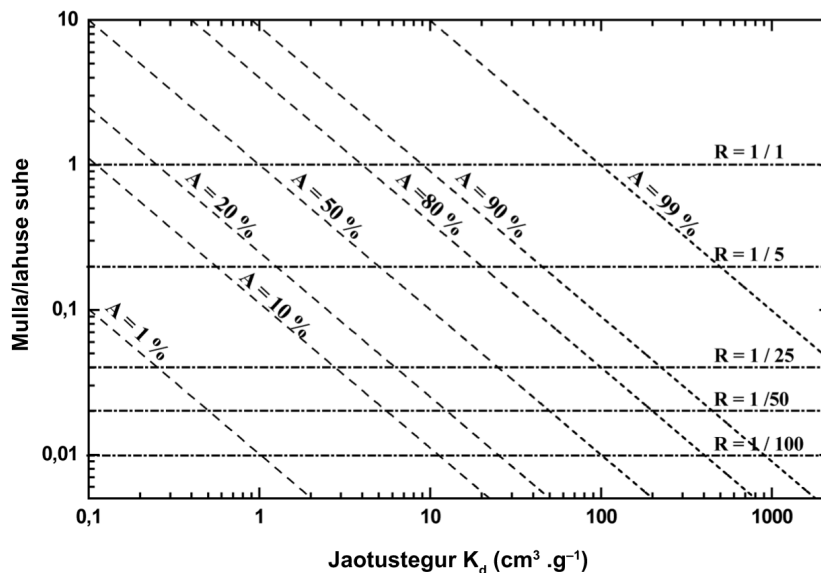
Sobivate mulla/lahuse suhete valik sorptsiooniuringute jaoks sõltub jaotustegurist  $K_d$  ja soovitud suhtelisest adsorptsioonimäärast. Aine kontsentratsiooni muutus lahuses määrab ära adsorptsiooni võrrandil põhinevate määramiste statistilise täpsuse ja analüüsimetodi piiri kemikaali kindlaksmääramisel lahuses. Seetõttu on üldises praktikas kasulik keskenduda mõnele fikseeritud suhtele, mille puhul adsorbeerumise protsent on üle 20 % ja soovitatavalt > 50 % (62), hoolitsedes samal ajal selle eest, et uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis oleks selle täpselt määramiseks piisavalt kõrge. See on eriti oluline siis, kui adsorptsiooniprotsent on kõrge.

Otstarbekas lähenemine sobivate mulla/vee suhete valimiseks põhineb  $K_d$  väärtuse hindamisel kas eeluuringute käigus või kindlaksmääratud hindamistehnikate abil (3. liide). Seega võib sobiva suhte valimine põhineda  $K_d$  funktsioonina esitatud mulla/lahuse suhte graafiku põhjal fikseeritud adsorptsiooniprotsentidel (joonis 1). Selles graafikus eeldatakse, et adsorptsioonivõrrand on lineaarne. <sup>(1)</sup> Kasutatav sõltuvus saadakse  $K_d$  avaldise (4) teisendamisel võrrandi (1) vormi:

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

Või selle logaritmilise vormi eeldades, et  $R = m_{\text{soil}}/V_0$  ja  $A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$ :

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



**Joonis 1.** Mulla/lahuse suhete ja  $K_d$  vaheline suhe uuritava aine erinevate adsorptsiooniprotsentide juures.

<sup>(1)</sup>  $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

**▼B**

Joonisel 1 esitatakse vajalikud mulla/lahuse suhted  $K_d$  funktsioonina erinevate adsorptsiooniastmete jaoks. Näiteks kui mulla/lahuse suhe on 1:5 ja  $K_d$  on 20, esineb ligikaudu 80 %ne adsorptsioon. Selleks, et sama  $K_d$  korral saada 50 %st adsorptsiooni, tuleb kasutada suhet 1:25. Käesolev lähenemisviis sobivate mulla/lahuse suhete valimiseks võimaldab uurijal paindlikult eksperimendi vajadustega arvestada.

Raskemini käsitletavad olukorrad on sellised, kus kemikaali adsorptsioon on väga tugev või nõrk. Madala adsorptsiooni korral on soovitatav kasutada mulla ja lahuse vahekorda 1:1, kuigi mõnede väga orgaanilist tüüpi muldade puhul võib suspensiooni saamiseks osutada vajalikuks väiksem suhe. Lahuses väikeste kontsentratsioonimuutuste määramiseks kasutatava analüüsimeetodi korral tuleb olla ettevaatlik, vastasel korral võib adsorptsiooni määramine olla ebatäpne. Teisest küljest, kui jaotustegurid  $K_d$  on väga kõrged, võib mulla/lahuse suhe tõusta kuni 1:100, et lahusesse jääks märkimisväärne kogus kemikaali. Siiski tuleb hoolitseda korraliku segamise eest ning süsteemile tuleb tasakaalu püstitamiseks anda piisavalt aega. Alternatiivseks lähenemiseks selliste ekstreemsete juhtudega tegelemisel, kui sobiv analüüsimeetod puudub, on prognoosida  $K_d$  väärtus, kasutades selliseid hindamistehnikaid, mis põhinevad näiteks  $P_{ow}$  väärtustel (3. liide). See võiks olla eriti kasulik nõrgalt adsorbeeruvate/polaarsete kemikaalide korral, mille  $P_{ow} < 20$ , ja lipofiilsete/väga sorbeeruvate kemikaalide korral, mille  $P_{ow} > 104$ .

## 1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**

Kõik katsed tehakse toatemperatuuril ja võimaluse korral konstantse temperatuuri juures, mis jääb vahemikku 20–25 °C.

Tsentrifugimisega peaks olema võimalik eraldada lahusest suuremad kui 0,2 µm suurused osakesed. Selle väärtusega tähistatakse väikseimat tahke osakese suurust ja see on piirväärtuseks tahkete ja kolloidosakeste vahel. Tsentrifugimise tingimuste kindlaksmääramise juhised esitatakse 4. liites.

Kui tsentrifugimisega ei ole võimalik tagada suuremate kui 0,2 µm suuruste osakeste eraldamist, tuleks kasutada tsentrifugimise ja 0,2 µm suurusega filtreid kasutava filtreerimise kombinatsiooni. Need filtrid peaksid olema tehtud sobivast inertsest materjalist, et vältida uuritava aine kadu nendesse. Igal juhul tuleks tõestada, et filtreerimise jooksul ei esine uuritava aine kadu.

1.9.2. **1. tase – eeluuring**

Eeluuringu eesmärk on esitatud jaos „Reguleerimisala”. Juhised sellise uuringu ettevalmistamiseks esitatakse allpool kirjeldatud katsega.

1.9.2.1. *Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine*

Kasutatakse kahte mullatüüpi ja kolme mulla/lahuse suhet (kuus katset). Ühel mullatüübil on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus ja madal savisisaldus ning teisel on madal orgaanilise süsiniku sisaldus ja kõrge savisisaldus. Soovitatakse järgmisi mulla/lahuse suhteid:

— 50 g mulda ja 50 cm<sup>3</sup> uuritava aine vesilahust (suhe 1/1);

**▼B**

— 10 g mulda ja 50 cm<sup>3</sup> uuritava aine vesilahust (suhe 1/5);

— 2 g mulda ja 50 cm<sup>3</sup> uuritava aine vesilahust (suhe 1/25).

Minimaalne mulla kogus, mida võib katses kasutada, sõltub laboratooriumi võimalustest ja kasutatavate analüüsimeetodite võimelisusest. Siiski soovitatakse kasutada vähemalt 1 g ja eelistatavalt 2 g, et uuringu tulemused oleksid usaldusväärsed.

Ühte kontrollproovi, milles on ainult uuritav aine 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahuses (ilma mullata), käideldakse täpselt samamoodi kui katsesüsteemigi, et kontrollida uuritava aine püsivust CaCl<sub>2</sub> lahuses ja selle võimalikku adsorptsiooni katseanumate seintele.

Ühele pimekatsele sama koguse mullaga ja lahuse koguruumalaga 50 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub> (ilma uuritava aineta) tehakse sama menetlus. See toimib taustkontrollina analüüside jooksul, et avastada häirivad ained või saastunud mullad.

Kõiki katseid, sealhulgas kontrollid ja pimekatsed, tuleks teha vähemalt kaks korda. Uuringu jaoks ettevalmistatavate proovide koguarvu võib arvutada vastavalt kasutatavale meetodikale.

Eeluuringu ja põhiuuringu meetodid on üldiselt samad, erandid on vajaduse korral mainitud.

Õhu käes kuivatatud mullaproovid tasakaalustatakse, raputades neid koos minimaalselt 45 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusega terve öö (12 tundi) enne katse tegemise päeva. Hiljem lisatakse teatav kogus uuritava aine põhilahust, et saada lõplikuks mahuks 50 cm<sup>3</sup>. Lisatava põhilahuse maht a) ei tohiks ületada 10 % vesifaasi lõplikust 50 cm<sup>3</sup> suurusest mahust, et tasakaalustamiseelse lahuse omadused muutuksid võimalikult vähe, ja b) peaks olema eelistatavalt selline, et mullaga kokku puutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon (C<sub>0</sub>) on analüüsimeetodi avastamispiiriga võrreldes vähemalt kaks suurusjärku kõrgem; see lävi võimaldab mõõtmisi täpselt teha isegi tugeva adsorptsiooni esinemise korral (> 90 %) ja hiljem määratleda adsorptsiooniisotermid. Samuti soovitatakse võimaluse korral, et aine esialgne kontsentratsioon (C<sub>0</sub>) ei oleks suurem kui pool selle lahustuvuse piirist.

Allpool esitatakse näide põhilahuse kontsentratsiooni (C<sub>st</sub>) arvutamise kohta. Eeldatakse, et avastamispiir on 0,01 µg cm<sup>-3</sup> ja adsorptsioon 90 %; seega peaks mullaga kokkupuutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon olema eelistatavalt 1 µg cm<sup>-3</sup> (kaks suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir). Eeldades, et lisatakse maksimaalne soovitatud põhilahuse ruumala, st 5–45 cm<sup>3</sup> 0,01 M CaCl<sub>2</sub> tasakaalulahust (= 10 % põhilahust vesifaasi 50 cm<sup>3</sup> kogumahu), millega põhilahuse kontsentratsioon peaks olema 10 µg cm<sup>-3</sup>; see on kolm suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir.

Vesifaasi pH tuleks mõõta enne ja pärast mullaga kokkupuutumist, kuna sellel on tähtis osa kogu adsorptsiooniprotsessis, eriti ioniseerivate ainete korral.

**▼B**

Segu raputatakse adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Tasakaaluoleku püstitumise aeg muldade lõikes erineb suuresti sõltuvalt kemikaalist ja mullast; tavaliselt piisab 24 tunnist (77). Eeluuringus võib proovid koguda järjest 48tunnise segamisperioodi jooksul (näiteks 4., 8., 24. ja 48. tunnil). Siiski tuleks analüüsiajad määrata paindlikult, et võtta arvesse laboratooriumi töögraafikut.

Uuritava aine analüüsimiseks vesilahuses on kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jadameetod. Tuleks rõhutada, et kuigi paralleelmeetod on eksperimentaalselt töömahukam, on tulemuste matemaatiline töötlemine lihtsam (5. liide). Siiski jäetakse kasutatava meetodi valik katse läbiviijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

- a) Paralleelmeetod: valmistatakse ette nii palju sama mulla/lahuse suhtega proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse adsorptsioonikineetikat uurida. Pärast tsentrifuugimist ja soovi korral pärast filtreerimist regenereeritakse esimese katseklaasi vesifaas võimalikult täielikult ja mõõdetakse nt 4 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 8. tundi, kolmanda oma pärast 24. tundi jne.
- b) Jadameetod: iga mulla/lahuse suhte kohta valmistatakse ette ainult üks kordusproov. Kindlaksmääratud ajavahemike vahel tsentrifuugitakse segu faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Kui pärast tsentrifuugimist kasutatakse filtreerimist, peavad laboratooriumil olema vahendid väikeste vesialikvootide filtreerimiseks. On soovitatav, et võetud alikvootide koguruumala ei ületaks 1 % lahuse koguruumalast, et mulla/lahuse suhe ei muutuks märkimisväärselt ning adsorptsiooniks olemasoleva soluudi mass ei väheneks uuringu kestel.

Adsorptsiooniprotsent  $A_t$  arvutatakse igal ajahetkel ( $t_i$ ) nominaalse esialgse kontsentratsiooni alusel ja proovivõtmise hetkel ( $t_i$ ) mõõdetud kontsentratsiooni korrigeeritakse vastavalt pimekatse  $A_t$  väärtusele. Tasakaaluolekule vastava platoo määramiseks koostatakse graafikud teljestikus aeg (5. liites joonis 1) <sup>(1)</sup>. Samuti arvutatakse välja  $K_d$  väärtus tasakaaluolekus. Selle  $K_d$  väärtuse põhjal valitakse jooniselt 1 välja sobivad mulla/lahuse suhted nii, et adsorptsiooniprotsent on üle 20 % ja eelistatavalt > 50 % (61). Kõik graafikutes kasutatavad võrrandid ja põhimõtted on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ning 5. liites.

#### 1.9.2.2. Adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise aja ja tasakaaluolekus adsorbeerunud uuritava aine koguse määramine

Nii nagu juba mainitud, võimaldavad graafikud teljestikus  $A_t$  or  $C_{aq}^{ads}$  – aeg hinnata adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist ja adsorbeerunud uuritava aine kogust selles. 5. liites esitatud joonised 1 ja 2 on selliste graafikute näidisteks. Tasakaaluoleku püstitumise aeg on see aeg, mida süsteem vajab tasakaaluolekule vastava platoo saavutamiseks.

<sup>(1)</sup> Tasakaaluolekule vastava platoo püstitumise hindamiseks võib kasutada ka graafikuid, mis kirjeldavad vesifaasis oleva uuritava aine kontsentratsiooni  $C_{aq}^{ads}$  ja aja suhet (vt 5. lisa joonist 2).

**▼B**

Kui mõne konkreetse mulla puhul saavutatakse tasakaaluolekule vastava platoo asemel pidev kontsentratsiooni tõus, võib see olla tingitud segavatest teguritest, nagu näiteks biolagundamine või aeglane hajumine. Biolagundamist võib näidata, korrates katset steriliseeritud mullaprooviga. Kui tasakaaluolekule vastavat platood ei saavutata ka selle prooviga, peaks katse läbiviija otsima muid nähtusi, mis võiksid olla seotud antud uuringuga; seda võib teha asjakohaste katsetingimuste muutmisega (temperatuur, raputamise ajad, mulla/lahuse suhted). Jäetakse katse tegija otsustada, kas jätkata uuringut, kuigi tasakaaluolek võib jääda püstitumata.

### 1.9.2.3. *Adsorptsioon katseanuma pinnal ja uuritava aine püsivus*

Mõningat teavet uuritava aine adsorptsiooni kohta katseanuma pinnal ning püsivuse kohta on võimalik tuletada kontrollproove analüüsides. Kui tuvastatakse kontsentratsiooni kahanemine, mis ületab analüüsimetodi standardvea, võib olla tegu abiootilise lagunemise ja/või adsorptsiooniga katseanuma pinnale. Neid kahte nähtust on võimalik eristada nii, et anuma seinad pestakse põhjalikult sobiva lahusti teadaoleva ruumalaga ja pesemislahuses analüüsitakse uuritava aine kogust. Kui adsorptsiooni katseanuma pinnal ei täheldata, tähistab kontsentratsiooni vähenemine abiootilist ebastabiilsust. Kui tuvastatakse adsorptsioon, tuleb katseanuma materjal ära vahetada. Siiski ei või käesoleva katsega katseanuma pinnale adsorbeerumise kohta saadud teavet otse ekstrapoleerida mulla/lahuse katsele. Mulla olemasolu mõjutab seda adsorptsiooni.

Lisateavet uuritava aine püsivuse kohta on võimalik tuletada, määrates esialgse massitasakaalu aja jooksul. See tähendab, et uuritav aine määratakse vesifaasis, mullaproovides ja katseanuma seintel. Lisatud uuritava kemikaali massi ja vesifaasis oleva uuritava kemikaali masside ja mullast ning katseanuma seintelt saadud ekstraktide summa vaheline erinevus on võrdne alanenud ja/või lendunud ja/või mitteekstraheerunud massiga. Massitasakaalu määramiseks peab adsorptsiooni tasakaaluolek püstituma katse tegemise aja jooksul.

Massitasakaal määratakse mõlema mulla ning ka iga mulla korral ühe muld/lahuse suhte jaoks, mille korral on vaesustumine suurem kui 20 % ning eelistatavalt > 50 % tasakaaluolekuga võrreldes. Kui suhte leidmise katse lõpetatakse koos vesifaasist 48 tunni pärast võetud proovi analüüsimisega, eraldatakse faasid tsentrifuugimisega ja soovi korral filtreerides. Vesifaas regenereeritakse niipalju kui võimalik ja mullale lisatakse sobivat ekstrahanti (ekstraktsiooniteguriga vähemalt 95 %), et uuritavat ainet ekstraheerida. Soovitatakse vähemalt kahte järjestikust ekstraheerimist. Määratakse uuritava aine kogus mullas ja katseanuma ekstraktides ja arvutatakse massitasakaal (võrrand 10, „Andmed ja aruandlus”). Kui see on alla 90 %, käsitatakse uuritavat ainet ebapüsivana uuringuks kuluva aja jooksul. Siiski võib uuringut jätkata, võttes arvesse uuritava aine ebapüsivust; sellisel juhul soovitatakse põhiuuringus analüüsida mõlemat faasi.



**▼B**

## 1.9.2.4. 2. tase – adsorptsioonikineetika ühel uuritava aine kontsentratsioonil

Kasutatakse viit mulda, mis on valitud tabelist 1. Nende viie mulla hulka on soovitatav lisada võimaluse korral mõned või kõik eeluuringu kasutatud mullad. Sellisel juhul ei tule 2. taset korrata eeluuringu kasutatud muldade puhul.

Tasakaalu saavutamise aeg, mulla/lahuse suhe, mullaproovi mass, mullaga kokkupuutuva vesifaasi ruumala ja uuritava aine kontsentratsioon lahuses valitakse vastavalt eeluuringu tulemustele. Analüüs tuleks teha eelistatavalt siis, kui kokkupuutest on möödunud ligikaudu 2, 4, 6, 8 (võimaluse korral ka 10) ja 24 tundi; raputamise aega võib pikendada maksimaalselt 48 tunnini juhul, kui kemikaal tasakaalu saavutamiseks suhte leidmise tulemuste alusel on vaja rohkem aega. Siiski võib analüüsiageadesse suhtuda paindlikult.

Iga katse (üks muld ja üks lahus) tehakse vähemalt kask korda, et määrata kindlaks tulemuste varieerumine. Iga katse kohta tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusest ilma uuritava ainetähtsuse ja selle mass ja ruumala peavad olema katses kasutatavatega identsed. Kontrollproovile, milles on ainult uuritava aine 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus, et pakkuda kaitset ootamatuste vastu.

Adsorptsiooniprotsent arvutatakse igal A<sub>t</sub> ja/või A<sub>Δt</sub> (vastavalt vajadusele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Arvutatakse ka jaotustegur K<sub>d</sub> tasakaaluolekus ning orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K<sub>oc</sub> (mittepolaarsete orgaaniliste kemikaalide puhul).

## Adsorptsioonikineetika uuringu tulemused

Lineaarne K<sub>d</sub> väärtus on üldiselt täpne sorptsioonilise käitumise kirjeldamiseks mullas (35, 78) ja väljendab kemikaalide loomulikku liikuvust mullas. Näiteks kemikaale, mille K<sub>d</sub> ≤ 1 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, peetakse üldiselt kergesti liikuvateks. Sarnaselt on MacCall *et al.* (16) välja töötanud K<sub>oc</sub> väärtustel põhineva liikuvuse klassifikatsiooniskeemi. Lisaks on olemas leostumise klassifikatsiooniskeemid, mis põhinevad K<sub>oc</sub> ja DT-50 suhtel<sup>(1)</sup> (32, 79).

Vastavalt veaanalüüsi uuringutele (61) ei ole samuti võimalik täpselt määrata K<sub>d</sub> väärtusi, mis on alla 0,3 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> vesifaasi vähenenud kontsentratsiooni alusel, isegi siis, kui kasutatakse kõige soovitatavat (täpsuse seisukohast) mulla/lahuse suhet, st 1:1. Sellisel juhul soovitatakse analüüsida nii mulla kui ka lahuse faasi.

<sup>(1)</sup> DT-50: aeg, mille jooksul 50 % uuritavast ainest on hajunud.

**▼B**

Seoses eelnevate märkustega soovitatakse kemikaali adsorptsioonilist käitumist ja selle võimalikku liikuvust mullas käsitlevat uuringut jätkata, määrates nendes süsteemides Freundlichi adsorptsiooniisotermid, mille jaoks on võimalik  $K_d$  täpselt määrata, kasutades käesolevas katsemeetodis järgitud katseprotokoll. Täpne määramine on võimalik, kui  $K_d$  ja mulla/lahuse suhte korrutis on  $> 0,3$ , siis kui määramine põhineb kontsentratsiooni langusele vesifaasil (kaudne meetod), või  $> 0,1$ , siis kui analüüsitakse mõlemat faasi (otsene meetod) (61).

1.9.2.5. *3. tase – adsorptsiooniisotermid ja desorptsioonikineetika/desorptsiooniisotermid*

1.9.2.5.1. *Adsorptsiooniisotermid*

Kasutatakse viit uuritava aine kontsentratsiooni, mis hõlmavad soovitatavalt kahte suurusjärku; nende kontsentratsioonide valimisel tuleks võtta arvesse lahustuvust vees ja sellest tulenevaid vesilahuse tasakaalukontsentratsioone. Iga mulla kohta tuleks säilitada sama mulla/lahuse suhe kogu uuringu jooksul. Adsorptsioonikatse tehakse vastavalt eespool kirjeldatule, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord ajahetkel, mil on vaja saavutada tasakaal, nagu on määratletud eespool 2. taseme juures. Määratakse lahuse tasakaalukontsentratsioonid ja arvutatakse adsorbeerunud kogus uuritava aine vähenemise alusel lahuses või otsese meetodi abil. Adsorbeerunud mass mulla ühikumassi kohta esitatakse uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni funktsioonina (vt „Andmed ja aruandlus”).

Adsorptsiooniisotermide katse tulemused

Siiani esitatud matemaatilistest adsorptsioonimudelitest on Freundlichi isoterm üks kõige sagedamini kasutatav adsorptsiooniprotsessi kirjeldamise mudel. Üksikasjalikum teave adsorptsioonimudelite tõlgendamise ja olulisuse kohta on esitatud viidetes (41, 45, 80, 81, 82).

**Märkus.** Tuleb märkida, et erinevate ainete  $K_F$  väärtuste (Freundlichi adsorptsioonitegur) võrdlemine on võimalik ainult siis, kui need  $K_F$  väärtused on väljendatud samades ühikutes (83).

1.9.2.5.2. *Desorptsioonikineetika*

Käesoleva katse eesmärk on uurida, kas kemikaal on mullal adsorbeerunud pöördvalt või mittepöördvalt. See teave on oluline, sest desorptsiooniprotsessil on samuti tähtis osa kemikaali käitumises välitingimustes asuvas mullas. Lisaks on desorptsiooniandmed kasulikuks sisendiks leostumist kirjeldava arvutiga modelleerimise puhul ja lahustunud aineid sisaldava äravoolusimulatsiooni korral. Desorptsiooniuringu puhul soovitatakse allpool kirjeldatud uuring teha iga süsteemi kohta, mille kohta oli eelneva adsorptsioonikineetika katse käigus võimalik määrata täpne  $K_d$ .

Nagu adsorptsioonikineetika katse puhul, on ka desorptsioonikineetika katse tegemiseks kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jada-meetod. Kasutatava meetodi valik jäetakse katse tegijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

**▼B**

- a) Paralleelmeetod: iga mulla kohta, mis valitakse desorptsiooniuringu tegemiseks, valmistatakse ette sama mulla/lahuse suhtega nii palju proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse desorptsioonikineetikat uurida. Eelistatavalt tuleks kasutada samasid ajavahe-  
mikke, mida kasutati adsorptsioonikineetika katses; siiski võib kogu aeg vajaduse korral pikeneda, et süsteem jõuaks desorptsiooni tasakaaluoleku püstitamiseni. Iga katse (üks muld, üks lahuse) korral tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusest ilma uuritava aineta ja selle mass ja ruumala peavad olema identsed katses kasutatavatega. Kontrollproovile, milles on uuritav aine 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus. Kõiki mulla ja lahuse segusid raputatakse kuni adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni (nagu on määratletud eespool 2. taseme juures). Seejärel eraldatakse faasid tsentrifuugimise teel ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusega, milles ei ole uuritavat proovi, ja uusi segusid raputatakse uuesti. Esimese katseklaasi vesifaas regenereeritakse nii täielikult kui võimalik ja mõõdetakse hiljem, nt 2 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 4. tundi, kolmanda oma pärast 6. tundi jne, kuni desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.
- b) Jadameetod: pärast adsorptsioonikineetika katset tsentrifuugitakse segu ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahusega, milles ei ole uuritavat ainet. Uut segu raputatakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Selle aja jooksul tsentrifuugitakse segu kindlaksmääratud ajavahemike järel faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Iga individuaalse alikvoodi ruumala peaks olema kogumahust alla 1 %. Segule lisatakse sama ruumala värsket 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahust mulla/lahuse suhte säilitamiseks ja raputamine jätkub järgmise ajavahemikuni.

Desorptsiooniprotsent arvutatakse igal ajahetkel ( $D_t$ ) ja/või ajavahe-  
mikul ( $D_t$ ) (vastavalt uuringu vajadustele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Samuti arvutatakse  $K_{des}$  desorptsioonitegur tasakaaluolekus. Kõik kasutatavad võrrandid on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ja 5. liites.

#### Desorptsioonikineetika katse tulemused

Teljestik desorptsiooniprotsent ( $D_t$ ) ja adsorptsiooniprotsendi  $A_t$  –  
aeg koostatud graafikute abil on võimalik hinnata adsorptsiooniprotsessi pööratavust. Isegi kui desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kulub kaks korda rohkem aega kui adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks ja kogu desorptsioon on üle 75 % adsorbeerunud kogusest, loetakse adsorptsiooni pöörduvaks.

#### 1.9.2.5.3. Desorptsiooniisotermid

Freundlichi desorptsiooniisotermid määratakse muldades, mida on kasutatud adsorptsiooniisotermide katses. Desorptsioonikatse tehakse punktis „Desorptsioonikineetika” kirjeldatud viisil, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord desorptsiooni tasakaaluolekus. Arvutatakse desorbeerunud uuritava aine kogus. Mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine kogus desorptsiooni tasakaaluolekus esitatakse uuritava aine tasakaalukonsentratsiooni funktsioonina lahuses (vt „Andmed ja aruandlus” ja 5. liidet).

**▼ B****2. ANDMED JA ARUANLUS**

Analüüsi andmed esitatakse tabelina (vt 6. liidet). Esitatakse individuaalsed mõõtmised ja arvatud keskmised. Adsorptsiooniisotermid esitatakse graafiliselt. Arvutused tehakse allpool kirjeldatud viisil.

Uuringu tegemisel arvestatakse, et 1 cm<sup>3</sup> vesilahuse mass on 1 g. Mulla/lahuse suhet võib väljendada nii massiprotsendi (w/w) kui ka mahuprotsendi (w/vol) ühikutes sama arvu abil.

**2.1. ADSORPTSIOON**

Adsorptsiooni  $A_{t_i}$  määratletakse kui mullal adsorbeerunud aine protsenti katse alguses olemasolevast kogusest vastavalt katsetingimustele. Kui uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt anuma seinale, arvutatakse  $A_{t_i}$  igal ajahetkel  $t_i$  vastavalt järgmisele võrrandile:

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

kus:

$A_{t_i}$  = adsorptsiooniprotsent ajahetkel  $t_i$  (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel  $t_i$  (µg);

$m_0$  = uuritava aine mass katseklaasis katse alguses (µg).

Üksikasjalik teave adsorptsiooniprotsendi  $A_{t_i}$  arvutamise kohta paralleel- ja jadameetodite kasutamise korral on esitatud 5. liites.

Jaotustegur  $K_d$  on mullafaasis oleva aine sisalduse ja vesifaasis oleva aine massikontsentratsiooni vaheline suhe katsetingimustes, kui adsorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.

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

kus:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg g<sup>-1</sup>);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg cm<sup>-3</sup>). See kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtusi;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

$m_{\text{soil}}$  = mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina (g);

$V_0$  = mullaga kokkupuutuva vesifaasi esialgne ruumala (cm<sup>3</sup>).

$A_{\text{eq}}$  ja  $K_d$  vaheline suhe saadakse võrrandist:

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

**▼ B**

kus:

$A_{eq}$  = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus, %

Orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur  $K_{oc}$  seob jaotusteguri  $K_d$  mullaproovi orgaanilise süsiniku sisaldusega:

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

kus:

$\%OC$  = orgaanilise süsiniku protsent mullaproovis ( $\text{g}^{-1}$ ).

$K_{oc}$ -tegur esindab ühtset väärtust, mis iseloomustab peamiselt mitte-polaarsete orgaaniliste kemikaalide jaotumist mullas või sademes oleva orgaanilise süsiniku ja vee vahel. Nende kemikaalide adsorptsioon viiakse korrelatsiooni tahke sorbeeriva orgaanilise aine sisaldusega (7); seega sõltuvad  $K_{oc}$  väärtused humiinosakeste eriomadustest, mille sorptsioonivõime on sõltuvalt päritolust, tekkest jne märkimisväärselt erinev.

#### 2.1.1. Adsorptsiooniisotermid

Freundlichi adsorptsiooniisotermide võrrand seob adsorbeerunud uuritava aine koguse uuritava aine kogusega lahuses tasakaaluolekus (võrrand 8).

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

Võrrand (8) on Freundlichi adsorptsioonivõrrand:

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

või lineaarsena:

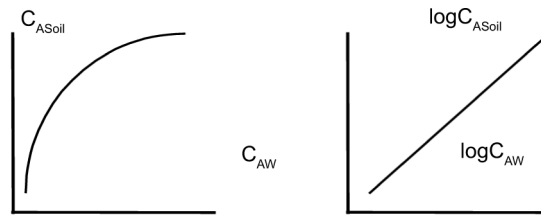
$$\log C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{ads}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (9)$$

kus:

$K_F^{\text{ads}}$  = dimensiooni  $\text{cm}^3 \text{ l/m g}^{-1}$

$n$  = regressioonikonstant;  $1/n$  on tavaliselt vahemikus 0,7–1,0, mis näitab, et sorptsiooni puudutavad andmed on sageli natuke mittelineaarsed.

Joonistatakse võrrandid 8 ja 9 ning arvutatakse  $K_F^{\text{ads}}$  ja  $1/n$  väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 9. Arvutatakse ka logaritmivõrrandi korrelatsioonikordaja  $r^2$ . Selliste graafikute näited esitatakse joonisel 2.

▼ B

**Joonis 2.** Freundlichi adsorptsioonigraafik, normaalne ja lineaarne.

### 2.1.2. Massitasakaal

Massitasakaalu (MB) määratletakse kui pärast adsorptsiooniuringut analüütiliselt regenereeritava aineprotsendi suhet aine nominaalsesse kogusesse uuringu alguses.

Andmete töötlemine erineb, kui lahusti lahustub vees täielikult. Veest lahustuva lahusti korral võib kohaldada punktis „Desorptsioon” kirjeldatud andmete töötlemist, et kindlaks määrata lahusti ekstraheerimise abil regenereeritud aine kogus. Kui lahusti veeslahustuvus on väiksem, tuleb regenereeritava kogus mõõta.

Massitasakaal MB adsorptsiooni jaoks arvutatakse järgmiselt: eeldatakse, et tegur ( $m_E$ ) vastab mullast ja katseanuma seintelt orgaanilise lahusti abil ekstraheeritud uuritavate kemikaalide masside summale:

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

kus:

MB = massitasakaal (%)

$m_E$  = mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis väljutatud uuritava aine kogumass ( $\mu\text{g}$ )

$C_0$  = mullaga kokku puutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )

$V_{rec}$  = adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala ( $\text{cm}^{-3}$ ).

### 2.2. DESORPTSIOON

Desorptsiooni (D) määratletakse desorbeerunud uuritava aine protsendina eelnevalt adsorbeerunud aine koguse suhtes katsetingimustes:

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

kus:

$D_{t_i}$  = desorptsiooniprotsent ajahetkel  $t_i$  (%);

**▼ B**

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$  = mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ ).

Üksikasjalik teave, kuidas arvutada desorptsiooniprotsenti  $D_{\text{f}}$  paralleel- ja jadameetodite korral, on esitatud 5. liites.

Ilmne desorptsioonitegur ( $K_{\text{des}}$ ) on katsetingimustes mullafaasi jäänud aine sisalduse ja vesilahuses desorbeerunud aine massikontsentratsiooni vaheline suhe, kui desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud:

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

kus:

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

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

$V_{\text{T}}$  = desorptsioonikineetika uuringu jooksul mullaga kokku puutuva vesifaasi koguruumala ( $\text{cm}^3$ ).

Juhised  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  arvutamiseks esitatakse 5. liites pealkirja „Desorptsioon” all.

Märkus

Kui eelnev adsorptsiooniuring tehti paralleelmeetodiga, peetakse võrrandis (12) toodud ruumala  $V_{\text{T}}$  sama suureks kui  $V_0$ .

### 2.2.1. Desorptsiooniisotermid

Freundlichi desorptsiooniisotermide võrrand seob mullale jääva adsorbeerunud uuritava aine sisalduse uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses desorptsiooni tasakaaluolekus (võrrand 16).

Iga katseklaasi kohta arvutatakse mullale jääv adsorbeerunud aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus järgmiselt:

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

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  määratletakse

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}} (\mu\text{g}) \quad (14)$$

kus:

$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = mulda jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

**▼ B**

$m_{\text{aq}}^{\text{A}}$  = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ )

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ ):

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left( \frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_{\text{r}}^{\text{F}}$  = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus ( $\text{cm}^3$ );

$V_{\text{R}}$  = adsorptsiooni tasakaaluoleku saavutamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  lahusega ( $\text{cm}^3$ ).

Võrrand (16) on Freundlichi desorptsioonivõrrand:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

või lineaarsena:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

Kus:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$  = Freundlichi desorptsioonitegur;

$n$  = regressioonikonstant;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$  = aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ).

Võib joonestada võrrandid 16 ja 17 ning arvutada  $K_{\text{F}}^{\text{des}}$  ja  $1/n$  väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 17.

Märkus

Kui Freundlichi adsorptsiooni või desorptsiooni eksponent  $1/n$  on võrdne ühega, võrduvad siduvad Freundlichi adsorptsiooni ja desorptsiooni konstandid ( $K_{\text{F}}^{\text{ads}}$  ja  $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ ) adsorptsiooni või desorptsiooni tasakaalukonstantidega (vastavalt  $K_{\text{d}}$  ja  $K_{\text{des}}$ ), ning  $C_{\text{s}}$  vs  $C_{\text{aq}}$  graafikud on lineaarsed. Kui eksponendid ei võrdu ühega, on graafikud teljestikus  $C_{\text{s}}$  vs  $C_{\text{aq}}$  mittelineaarsed ning adsorptsiooni ja desorptsioonikonstandid erinevad isothermide erinevates kohtades.

### 2.2.2. Katsearuanne

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

- kasutatud mullaproovide täielik identifitseerimine, sealhulgas:
- geograafiline viide asukohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- proovivõtu kuupäev;



**▼B**

- kasutusviis (nt põllumajandusmaa, mets jne);
- proovivõtu sügavus;
- liiva/saviliiva/savi sisaldus;
- pH väärtused (0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahuses);
- orgaanilise süsiniku sisaldus;
- orgaanilise ainese sisaldus;
- lämmastiku sisaldus;
- C/N suhe;
- kationide neelamismahutavus (mmol/kg);
- kogu teave mullaproovide kogumise ja ladustamise kohta;
- vajaduse korral kogu oluline teave uuritava aine adsorptsiooni/-desorptsiooni tõlgendamiseks;
- viited iga parameetri määratlemisel kasutatud meetoditele;
- vajaduse korral teave uuritava aine kohta;
- katsete temperatuur;
- tsentrifuugimise tingimused;
- uuritava aine analüüsimisel kasutatud menetlus;
- uuritava aine põhilahuse ettevalmistamisel solubiliseeriva aine kasutamise põhjendus;
- vajaduse korral arvutustes tehtud paranduste selgitamine;
- andmed vastavalt tabeli vormile (6. liide) ja graafilisele esitlemisele;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitavad uuringu tulemusi tõlgendada.

3. **VIITED**

- 1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.
- 2) Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.
- 3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- 4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).
- 5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

**▼B**

- 6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- 7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ( $K_{oc}$ ) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- 8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- 9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- 11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- 12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils”, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- 13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena” in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83–122.
- 14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments” in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31–44.
- 15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media”. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29–35.
- 16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis”, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- 17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil”. Weeds, 13, pp. 185–190.
- 18) Rhodes R. C, Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils”. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524–528.
- 19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil” in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- 20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides”, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901–932.

**▼ B**

- 21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils”. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.
- 22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil”. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269–273.
- 23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, pp. 45–52.
- 24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides”. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961–971.
- 25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, pp. 247–258.
- 26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143–154.
- 27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- 28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732–210.
- 29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49–143.
- 30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, pp. 37–44.
- 31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- 32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339–357.
- 33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils”. J. of Soil Sci., 28, pp. 340–350.
- 34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils”. Pest. Sci., 11, pp. 389–395.
- 35) Green R. E., and Karickhoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling”, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80–101,
- 36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure”. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572–576.

**▼B**

- 37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. *J. Agri. Food Chem.*, 17, pp. 667–668.
- 38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. *Nature*, 223, 1288.
- 39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. *J. Agric. Food Chem.*, 29, pp. 1050–1059.
- 40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. *J. Agric. Food Chem.*, 32, pp. 243–246.
- 41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. *Residue Rev.*, 32, pp. 29–92.
- 42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Romberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32 pp. 222–234.
- 43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. *Chemosphere* 10, pp. 833–846.
- 44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. *Environ. Toxicol. Safety* 21, pp. 1–17.
- 45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals” in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49–143.
- 46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. *Weed Sci.* 19: pp. 67–69.
- 47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. *Weed Science*, Vol. 23, pp. 454–457.
- 48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field runoff between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- 50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- 51) Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- 52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

**▼ B**

- 53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- 54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- 55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- 56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- 57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- 58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements”. *Soil Sci. Am. Proc.* 34, pp. 353–354.
- 60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”. *Soil Sci.*, pp. 109–138.
- 61) Boesten, J. J. T. I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”. *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31–41.
- 62) Boesten, J. J. T. I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106”. *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.*
- 63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”. *Weed Res.* 21, pp. 227–231.
- 64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”. *J. Environ. Qual.*, 10(3), pp. 382–386.
- 65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227–231.
- 66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments”. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297–312.
- 67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, 16(1), pp. 109–116.
- 68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
- 69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

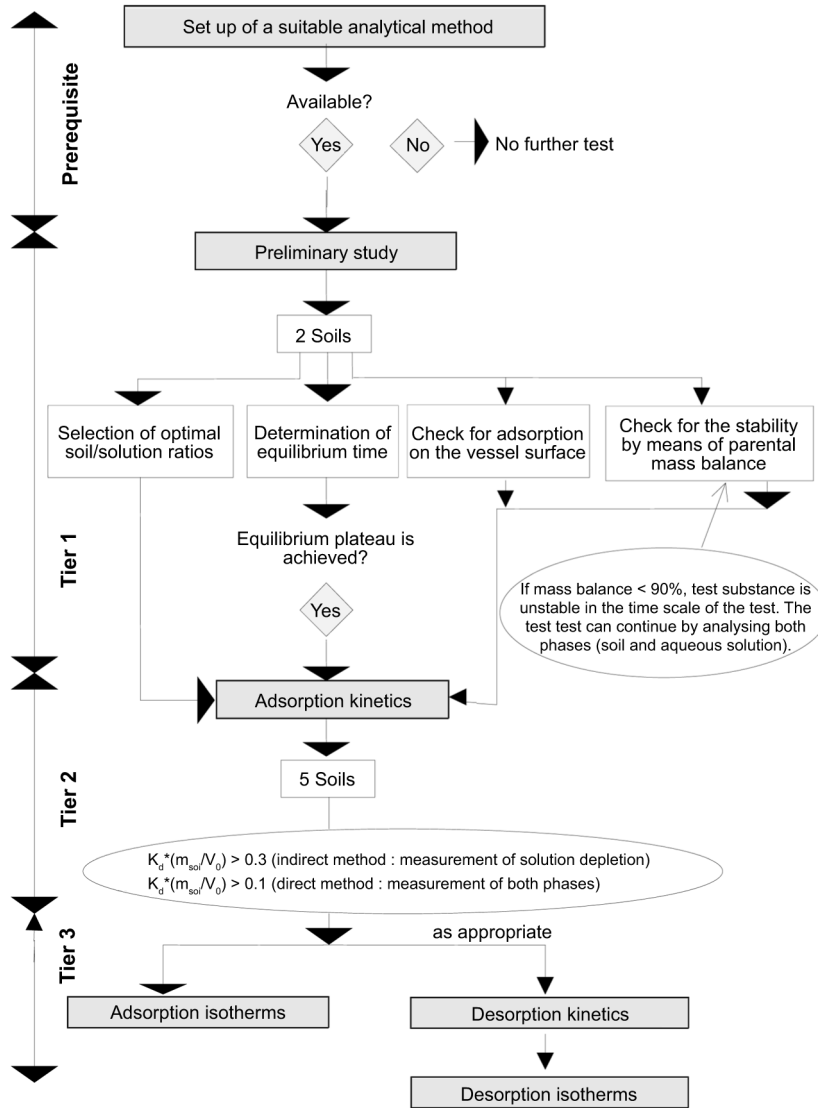
▼B

- 70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. *Science*, Vol. 206, pp. 831–832.
- 71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), „Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38–42.
- 72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833–846.
- 73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité”. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319–322.
- 74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493–2504.
- 75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373–1384.
- 76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. *Chemosphere* 27 (12), pp. 2341–2352.
- 77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29–36.
- 78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- 79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- 80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms” in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14–32.
- 81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D., (1960), „Studies in adsorption: XL A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. *J. Chem. Soc.*, pp. 3973–93.
- 82) Calvet R., Terce M., and Arvien J. C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”. *Ann. Agron.* 31: pp. 239–251.
- 83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation”, *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- 84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption”, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
- 85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

▼B

1. liide

## Katse skeem



## ▼B

## 2. liide

ANALÜÜSIMETODI TÄPSUSE JA KONTSENTRATSIOONIMUUTUSE  
MÕJU ADSORPTSIOONITULEMUSTE TÄPSUSELEAmount of soil  $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$ Volume of solution  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$ 

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$R_{\ddagger}$	$K_{\text{d}}^*$	$R_{\ddagger}$
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	<b>FOR A = 9 %</b>							
	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	<b>FOR A = 55 %</b>							
	50,0	0,500	true value	60,0	6,00	true value	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	<b>FOR A = 99 %</b>							
	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}. K_{\text{d}} = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

 $m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mass of the test substance in the soil phase at equilibrium,  $\mu\text{g}$ ; $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mass of the test substance in the aqueous phase at equilibrium,  $\mu\text{g}$ ; $C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = content of the test substance in the soil phase at equilibrium,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mass concentration of the test substance in the aqueous phase at equilibrium,  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ;R = analytical error in the determination of the  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ; $R_{\ddagger}$  = calculated error due to the analytical error R.



## ▼B

## 3. Liide

**K<sub>d</sub> HINDAMISE TEHNIKAD**

1. Hindamistehnikad võimaldavad ennustada K<sub>d</sub> väärtusi, mis põhinevad korrelatsioonil, näiteks P<sub>ow</sub> väärtustega (12, 39, 63–68), veelahustuvust puudutavate andmetega (12, 19, 21, 39, 68-73) või polaarset puudutavate andmetega, mis on saadud pöördfaasilise HPLC kasutamisel (74-76). Tabelites 1 ja 2 esitatud K<sub>oc</sub> ja K<sub>om</sub> väärtused on arvatud nendest võrranditest ja seega K<sub>d</sub> kaudselt võrranditest:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Nende korrelatsioonide kontseptsioon põhineb kahel eeldusel: 1) aine adsorptsiooni mõjutab peamiselt just mullas olev orgaaniline aines; ja 2) kaasatud interaktsioonid on peamiselt mittepolaarsed. Seetõttu 1) ei saa neid korrelatsioone kasutada täielikult või teatud ulatuses polaarsete ainete puhul ja 2) juhtudel, kui mullas esineva orgaanilise ainese sisaldus on väga väike (12). Lisaks, kuigi on avastatud rahuldavad korrelatsioonid P<sub>ow</sub> ja adsorptsiooni vahel (19), ei saa sama öelda veelahustuvuse ja adsorptsiooni ulatuse vahelise suhte kohta (19, 21); siiani on sellealased uuringud väga vasturääkivad.
3. Mõned näited adsorptsiooniteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist ja suhtest vees lahustuvusse on esitatud vastavalt tabelites 1 ja 2.

Tabel 1

**Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 12, 68.**

Ained	Korrelatsioonid	Autorid
Asendatud karbamiidid	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromaatsed klooritud ained	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaatsed süsivesinikud	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Tabel 2

**Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja vees lahustuvuse vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 68, 69.**

Ühendid	Korrelatsioonid	Autorid
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaatsed, aromaatsed klooritud ained	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α-naftool	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Tsükliilised, alifaatsed aromaatsed ained	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Erinevad ühendid	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)



## 4. liide

## ARVUTUSED TSENTRIFUUGIMISTINGIMUSTE MÄÄRAMISEKS

1. Tsentrifuugimisaeg saadakse vastavalt järgmisele valemile, eeldades et osakesed on kerakujulised:

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Lihtsustamise eesmärgil kirjeldatakse kõiki parameetreid SI-välistes ühikutes (g, cm).

kus:

$\omega$  = pöörlemisagedus (=  $2 \pi$  rpm/60), rad s<sup>-1</sup>;

rpm = pööret minutis;

$\eta$  = lahuse viskoossus, g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;

$r_p$  = osakese raadius, cm;

$\rho_s$  = mulla tihedus, g cm<sup>-3</sup>;

$\rho_{aq}$  = lahuse tihedus, g cm<sup>-3</sup>;

$R_t$  = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitorus oleva lahuse pinnani, cm;

$R_b$  = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitoru põhjani, cm;

$R_b - R_t$  = mulla/lahuse segu pikkus tsentrifuugitorus, cm.

Üldiselt kasutatakse täieliku eraldumise tagamiseks arvatud aegade kahekordistamist.

2. Võrrandit 1 on võimalik veel lihtsustada, kui oletada, et lahuse viskoossus ( $\eta$ ) ja tihedus ( $\rho_{aq}$ ) on võrdsed vee viskoossuse ja tihedusega temperatuuril 25 °C; seega,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$  g s<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ja  $\rho_{aq} = 1,0$  g, cm<sup>-3</sup>.

Seega saadakse tsentrifuugimisaeg võrrandiga 2:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

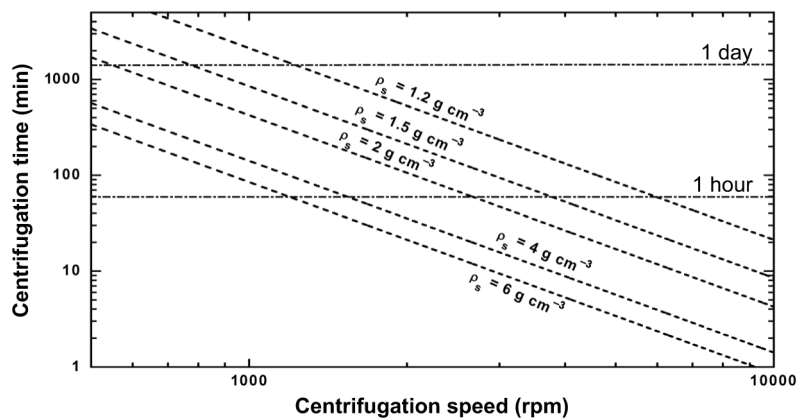
3. Võrrandist 2 ilmneb, et tsentrifuugimistingimuste, st aja (t) ja kiiruse (rpm) määratlemisel on tähtsad kaks parameetrit, et saavutada konkreetse suurusega osakeste jagunemine (meie puhul 0,1  $\mu$ m raadiusega): 1) mulla tihedus ja 2) segu pikkus tsentrifuugitorus ( $R_b - R_t$ ), st vahemaa, mille mullaosake läbib lahuse pinnalt toru põhjani; on selge, et fikseeritud ruumala korral sõltub segu pikkus torus toru raadiuse ruudust.
4. Joonisel 1 on näidatud, kuidas tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aeg (t) varieerub erinevate mulla tiheduste ( $\rho_s$ ) (joonis 1a) ja tsentrifuugitorus oleva segu erinevate pikkuste vahel (joonis 1b). Joonisel 1a on selgesti näha mulla tiheduse mõju; näiteks klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 240 minutit, kui mulla tihedus on 1,2 g/cm<sup>3</sup>, ja vaid 50 minutit, kui tihedus on 2,0 g/cm<sup>3</sup>. Samamoodi näitab joonis 1b, et klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 50 minutit, kui segu pikkus on 10 cm, ja vaid 7 minutit, kui pikkus on 1 cm. Siiski on tähtis leida optimaalne suhe võimalikult väikest pikkust nõudva tsentrifuugimise ja pärast tsentrifuugimist katse tegija poolt võimalikult lihtsalt faaside eraldamise vahel.

▼ **B**

5. Lisaks, kui määratakse katsetingimused mulla/lahuse faaside eraldamiseks, on tähtis arvestada võimaliku kolmanda „pseudofaasi”, kolloidide olemasolu. Nendel osakestel, mille suurus on alla  $0,2 \mu\text{m}$ , võib olla tähtis mõju kogu aine adsorptsioonimehhanismile mulla suspensioonis. Kui tsentrifuugitakse eespool kirjeldatud viisil, jäävad kolloidid vesifaasi ja neid analüüsitakse koos vesifaasiga. Seega jääb teave nende mõju kohta saamata.

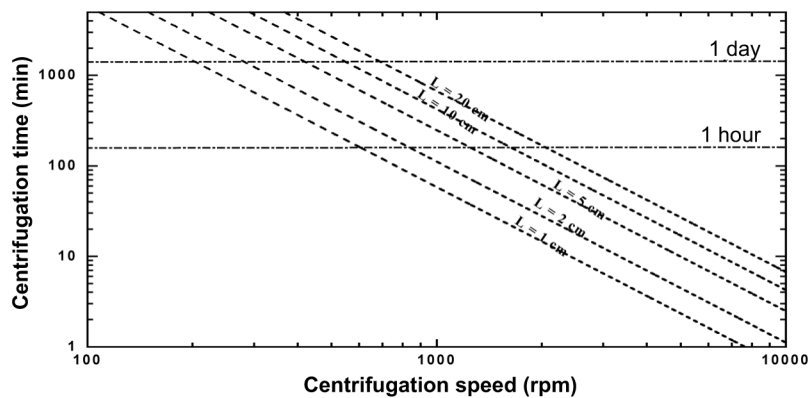
Kui uuringut tegeval laboratooriumil on ultratsentrifuugimise või ultrafiltrereerimise võimalused, võib aine adsorptsiooni/desorptsiooni mullas uurida põhjalikumalt, kaasa arvatud teave aine adsorptsiooni kohta kolloididele. Sellisel juhul tuleks kasutada ultratsentrifuugimist  $60\,000 \text{ rpm/min}$  või ultrafiltrereerimist, kui filtri poorsus on  $100\,000$  daltonit, et eraldada järgmised kolm faasi: muld, kolloidid ja lahus. Katsearuannet tuleks samuti vastavalt muuta, et kõigis kolmes faasis ainet analüüsida.

Joonis 1a.



Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate mullatiheduste puhul ( $\rho_s$ ).  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ja  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  temperatuuril  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Joonis 1b.



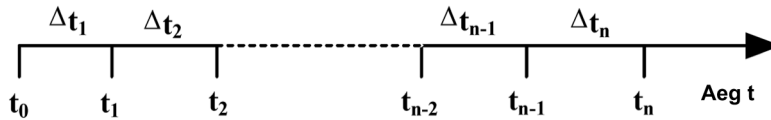
Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate pikkuste puhul tsentrifuugimistorus ( $R_b - R_t$ ) =  $L$ ;  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  temperatuuril  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ja kui  $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

**▼ B**

## 5. liide

**ADSORPTSIOONI A (%) JA DESORPTSIOONI D (%) ARVUTAMINE**

Menetluse ajagraafik on järgmine:



Kõikide arvutuste puhul eeldatakse, et uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt konteineri seintele.

**ADSORPTSIOON A (A %)**a) *Paralleelmeetod*

Adsorptsiooniprotsent arvutatakse iga katseklaasi (i) kohta igal ajahetkel ( $t_i$ ) vastavalt võrrandile:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Selle võrrandi tegurid võib arvutada järgmiselt:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kus:

$$A_{t_i} = A_{t_i}$$

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = uuritava aine mass mullas ajahetkel  $t_i$ , kui analüüs tehakse ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = uuritava aine mass katseklaasis uuringu alguses ( $\mu\text{g}$ );

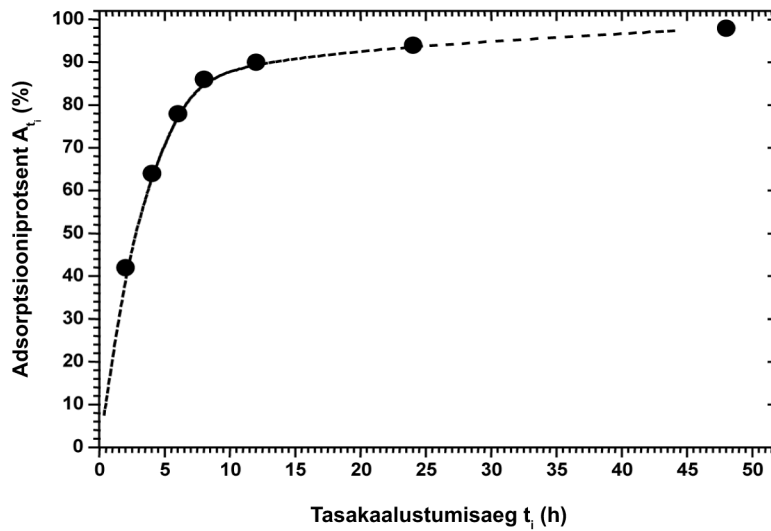
$C_0$  = mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

▼ B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$  = aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel  $t_i$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); see kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtused;

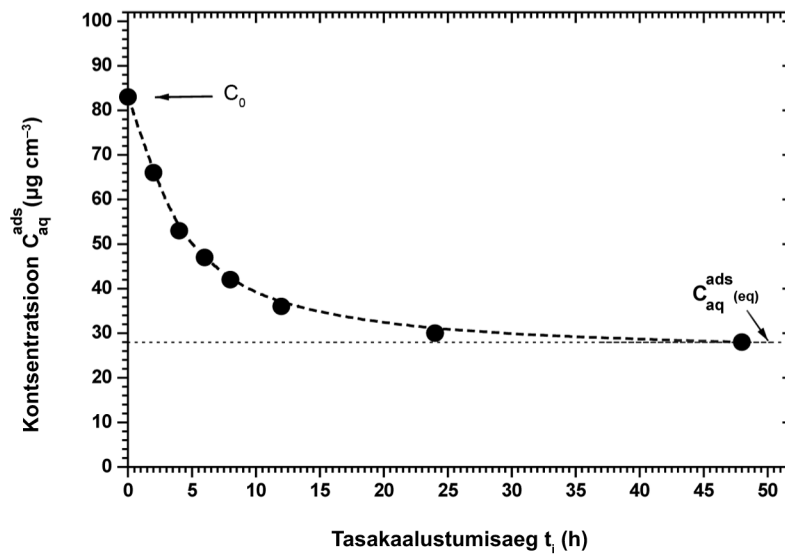
$V_0$  = mullaga kokku puutuva uuritava lahuse esialgne ruumala ( $\text{cm}^3$ ).

Adsorptsiooniprotsendi väärtused  $A_t$  või  $C_{aq}^{ads}(t_i)$  esitatakse aja funktsioonina ja määratakse aeg, mis kulus sorptsioonitasakaaluoleku püstitumiseks. Näited sellistest graafikutest esitatakse vastavalt joonisel 1 ja 2.



Joonis 1

Adsorptsiooni tasakaaluoleku graafik



Joonis 2

Uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis ( $C_{aq}$ ) aja funktsioonina

**▼ B**b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et adsorptsioonimenetluseks mõõdetakse uuritavat ainet väikestes vesifaasi alikvootides määratletud ajavahemikel.

— Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse mullal adsorbeerunud aine kogus järgmiselt:

— esimese ajavahemiku puhul  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— teise ajavahemiku puhul  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— kolmanda ajavahemiku puhul  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— n-nda ajavahemiku puhul  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorptsiooniprotsent igas ajavahemikus,  $A_{\Delta t_i}$ , arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (8)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent  $A_{t_i}$  ajahetkel  $t_i$  saadakse võrrandist:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (9)$$

Adsorptsiooni väärtused  $A_{t_i}$  või  $A_{\Delta t_i}$  (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse sorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kuluv aeg.

— Tasakaaluoleku püstitumise hetkel  $t_{eq}$

— mullal adsorbeerunud uuritava aine mass on:

$$m_s^{\text{ads}}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

**▼ B**

— uuritava aine mass lahuses on:

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ja adsorptsiooniprotsent tasakaaluolekus on:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (12)$$

Eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$  = mullal adsorbeerunud aine mass vastavalt ajavahemike  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  jooksul ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$  = vastavalt ajahetkedel  $v_a^A t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ )

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

$v_a^A$  = alikvoodi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse ( $\text{cm}^3$ );

$A_{\Delta t_i}$  = adsorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule  $\Delta t_i$  (%);

$A_{\text{eq}}$  = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus (%).

**DESORPTSIOON D (%)**

Ajahetke  $t_0$ , kui desorptsioonikineetika katse algab, peetakse selleks hetkeks, kui uuritava aine maksimaalne eemaldatud ruumala (pärast adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist) asendatakse sama ruumala 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  lahusega.

**a) Paralleelmeetod**

Ajahetkel  $t_i$  mõõdetakse uuritava aine mass katseklaasist  $i$  ( $V_r^i$ ) võetud vesifaasis ja desorbeerunud uuritava aine mass arvutatakse vastavalt võrrandile:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{\text{aq}}^A \quad (13)$$

Desorptsiooni tasakaaluolekus  $t_i = t_{\text{eq}}$  ja seega  $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$

Ajavahemiku ( $\Delta t_i$ ) jooksul desorbeerunud uuritava aine mass saadakse võrrandist:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Desorptsiooniprotsent arvutatakse:

ajahetkel  $t_i$  võrrandist:

**▼ B**

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

ja ajavahemikul ( $\Delta t_i$ ) võrrandist:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

kus:

$D_{t_i}$  = desorptsiooniprotsent ajahetkel  $t_i$  (%);

$D_{\Delta t_i}$  = desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule  $\Delta t_j$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{des}(t_i)$  = ajavahemikul  $\Delta t_j$  desorbeerunud uuritava aine mass ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{des}(t_i)$  = ajahetkel  $t_i$  analüütiliselt määratud uuritava aine mass lahuse ruumalas  $V_r^i$ , mis võetakse analüüsi jaoks ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^A$  = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = uuritava aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ );

$V_R$  = adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  lahusega ( $\text{cm}^3$ );

$V_r^i$  = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse ruumala desorptsioonikineetika katses ( $\text{cm}^3$ ).

Desorptsiooni väärtused  $D_i^i$  või  $D_i$  (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitamiseks kuluv aeg.

b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et eelnevaks adsorptsioonimenetlus viidi läbi, määrates uuritava aine väikestes vesifaasi alikvootides ( $v_a^A$ ) (jadameetod punktis 1.9 „Katse käik“). Eeldatakse, et a) pärast adsorptsioonikineetika katses katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala asendati sama ruumala 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  lahusega ( $v_R$ ) ja b) desorptsioonikineetika katse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala ( $v_T$ ) püsib konstantsena ja esitatakse võrrandiga:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$



**▼ B**

Ajahetkel  $t_i$ :

- määratakse uuritava aine mass väikeses alikvoodis ( $v_a^D$ ) ja arvutatakse desorbeerunud mass vastavalt võrrandile:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \quad (19)$$

- desorptsiooni tasakaaluolekus,  $t_i = t_{eq}$ , seegam $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

- desorptsiooniprotsent  $D_{t_i}$  arvutatakse järgmisest võrrandist:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (20)$$

Ajavahemikus ( $\Delta t_i$ )

Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse desorbeerunud aine kogus järgmiselt:

- esimese ajavahemiku puhul  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$  ja

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ ja } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- ajavahemiku  $n$  puhul  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{V_T - v_a^D}{V_T}\right) \quad (22)$$

ja

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)]$$

- teise ajavahemiku puhul  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$  ja

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[ m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right) \right] \quad (23)$$

ja

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Lõpuks arvutatakse desorptsiooniprotsent igas ajavahemikus,  $D_{\Delta t_i}$ , kasutades järgmist võrrandit:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (24)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent  $D_{t_i}$  ajahetkel  $t_i$  saadakse võrrandist:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (25)$$

**▼ B**

milles eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m^{\text{des}}(\Delta t_1), m^{\text{des}}_s(\Delta t_2), \dots, m^{\text{des}}_s(\Delta t_n)$  = aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa vastavalt pärast ajavahemike  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  möödumist ( $\mu\text{g}$ );

$m^{\text{des}}_{\text{aq}}(\Delta t_1), m^{\text{des}}_{\text{aq}}(\Delta t_2), \dots, m^{\text{des}}_{\text{aq}}(\Delta t_n)$  = uuritava aine mass, mis on desorbeerunud vastavalt ajavahemike  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  jooksul ( $\mu\text{g}$ );

$m^{\text{des}}_m(t_1), m^{\text{des}}_m(t_2), \dots, m^{\text{des}}_m(t_n)$  = vastavalt ajahetkedel ( $v_a^D$ )  $t_1, t_2, \dots, t_n$  ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga Kokku puutuva vesifaasi koguruumala ( $\text{cm}^3$ );

$m_{\text{aq}}^A$  = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus ( $\mu\text{g}$ )

$$m_{\text{aq}}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

$V_R$  = adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  lahusega ( $\text{cm}^3$ );

$v_a^D$  = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil katseklaasist (i) võetud alikvoodi ruumala ( $\text{cm}^3$ );

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$



▼B

	Tähis	Ühikud	Tasakaalu- leku saabu- mise aeg	Tasakaalu- leku saabu- mise aeg	Tasakaalu- leku saabu- mise aeg	Tasakaalu- leku saabu- mise aeg
<b>Pärast loksutamist ja tsentrifugimist</b>						
KAUDNE MEETOD						
Paralleelmeetod						
Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Jadameetod						
Uuritava aine mõõdetud mass alikvoodis <sup>A</sup>	$m_m^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g}$				
OTSENE MEETOD						
Mullal adsorbeerunud uuritava aine mass	$m_s^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g}$				
Adsorptsiooni arvutamine						
Adsorptsioon	$A_{t_i}$	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Keskmsed						
Adsorptsioonitegur	$K_d$	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Keskmsed						
Adsorptsioonitegur	$K_{oc}$	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Keskmsed						

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

**Adsorptsiooni uuring: pimekatsed ja kontroll**

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Kontroll	
Katseklaas nr						
Kaalutud mullad		g			0	0
Vee kogus kaalutud mullas (arvutatud)		$\text{cm}^3$			—	—
Lisatud 0,01 M $\text{CaCl}_2$ lahuse ruumala		$\text{cm}^3$				
Lisatud uuritava aine põhilahuse ruumala		$\text{cm}^3$	0	0		
Vesifaasi koguruumala (arvutatud)		$\text{cm}^3$			—	—

▼ **B**

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Pimekatse		Kontroll	
Uuritava aine esialgne kontsentratsioon vesifaasis		$\mu\text{g cm}^{-3}$						

**Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist**

Kontsentratsioon vesifaasis		$\mu\text{g cm}^{-3}$						
-----------------------------	--	-----------------------	--	--	--	--	--	--

Märkus: Vajaduse korral lisada veerge.

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

**Massibilanss**

	Tähis	Ühikud				
Katseklaas nr						
Kaalutud muld	—	g				
Muld: kuivmass	$m_{\text{soil}}$	g				
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	$V_{\text{WS}}$	ml				
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M $\text{CaCl}_2$ lahuse ruumala		ml				
Põhilahuse ruumala		$\text{cm}^3$				
Mullaga kokku puutuva vesifaasi koguruumala	$V_0$	$\text{cm}^3$				
Uuritava lahuse esialgne kontsentratsioon	$C_0$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h				

**Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist**

Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis tasakaaluolekus, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	$t_{\text{eq}}$	h				

**Esimene lahjendamine lahustiga**

Eemaldatud vesifaasi ruumala	$V_{\text{rec}}$	$\text{cm}^3$				
Lisatud lahusti ruumala	$\Delta V$	$\text{cm}^3$				

**Esimene ekstraheerimine lahustiga**

Lahustis analüüsitud signaal	$S_{\text{E1}}$	var.				
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	$C_{\text{E1}}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				

**▼ B**

	Tähis	Ühikud				
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	$m_{E1}$	$\mu\text{g}$				
Teine lahjendamine lahustiga						
Eemaldatud lahusti ruumala	$\Delta V_s$	$\text{cm}^3$				
Lisatud lahusti ruumala	$\Delta V'$	$\text{cm}^3$				
Teine ekstraheerimine lahustiga						
Lahustifaasis analüüsitud signaal	$S_{E2}$	var.				
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	$C_{E2}$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	$m_{E2}$	$\mu\text{g}$				
Kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	$m_E$	$\mu\text{g}$				
Massibilanss	MB	%				

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: .....°C

**Adsorptsiooniisotermid**

	Tähis	Ühikud							
Katseklaas nr									
Kaalutud muld	—	g							
Muld: kuivmass	E	g							
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	$V_{ws}$	$\text{cm}^3$							
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M $\text{CaCl}_2$ lahuse ruumala		$\text{cm}^3$							
Lisatud põhilahuse ruumala		$\text{cm}^3$							
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (arvutatud)	$V_0$	$\text{cm}^3$							
Lahuse kontsentratsioon	$C_0$	$\mu\text{g cm}^{-3}$							
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h							

## ▼ B

	Tähis	Ühikud								
<b>Pärast loksutamist ja tseentrifuugimist</b>										
Aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsesest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}$ (eq)	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Temperatuur		$^{\circ}\text{C}$								
Mullaühiku kohta adsorbeerunud mass	$C_s^{ads}$ (eq)	$\mu\text{g g}^{-1}$								

Regressioonanalüüs:

 $K_F^{ads}$  väärtus:

1/n väärtus:

regressioonitegur  $r^2$ :

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): ..... %

Temperatuur: ..... °C

Kasutatud analüüsimetoodika:                      Kaudne        Paralleelne        Jada                      **Desorptsiooni uuring**

	Tähis	Ühikud	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik
Katseklaasi nr, saadakse adsorptsioonietapist						
Mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	$m_s^{ads}$ (eq)	$\mu\text{g}$				
Eemaldatud vesifaasi ruumala, mis asendati 0,01 M $\text{CaCl}_2$ -ga	$V_R$	$\text{cm}^3$				
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	PM	$V_0$	$\text{cm}^3$			
	SM	$V_T$	$\text{cm}^3$			
Osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	$m_{aq}^A$	$\mu\text{g}$				

**Desorptsiooni kineetika**

Mullast desorbeerunud aine mõõdetud mass ajahetkel $t_i$		$m_m^{des}(t_i)$	$\mu\text{g}$			
Uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse ruumala	PM	$V_f^i$	$\text{cm}^3$			
	SM	$v_a^D$	$\text{cm}^3$			
Mullast desorbeerunud aine mass ajahetkel $t_i$ (arvutatud)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	$\mu\text{g}$			
Mullast ajavahe $\Delta t_i$ desorbeerunud aine mass (arvutatud)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	$\mu\text{g}$			

**▼ B**

	Tähis	Ühikud	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik	Ajavahe- mik
<b>Desorptsiooni protsent</b>						
Desorptsioon ajahetkel $t_i$	$D_{t_i}$	%				
Desorptsioon ajavahemikus $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näiline desorptsioonitegur	$K_{des}$					

PM: paralleelmeetod

SM: jadameetod



**▼B****C.19. ADSORPTSIOONITEGURI ( $K_{oc}$ ) KINDLAKSMÄÄRAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 121 (2000).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Ainete sorptsiooni muldadesse ja kanalisatsioonijääkidesse võib kirjeldada parameetrite abil, mida saab katseliselt kindlaks määrata meetodi C.18 abil. Üheks oluliseks parameetrik on adsorptsioonitegur, mida määratletakse kui suhet mullas/reoveesettes oleva aine kontsentratsiooni ja vesifaasis oleva aine kontsentratsiooni adsorptsiooni tasakaalu tingimuste vahel. Mulla orgaanilise süsiniku sisalduse suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur  $K_{oc}$  on kasulik näitaja, mis iseloomustab kemikaali seostumisvõimet mulla orgaanilise ainese või reoveesetega ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Seda parameetrit võib hinnata veeslahustuvuse ja n-oktaanooli/vee jaotusteguri vaheliste korrelatsioonide abil (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Käesolevas uuringus kirjeldatud katsemeetodis kasutatakse HPLCd adsorptsiooniteguri  $K_{oc}$  määramiseks mullas ja reoveesettes (8). Need näitajad on usaldusväärsemad kui QSAR-arvutustega saadud näitajad (9). Kuna tegemist on hinnangulise meetodiga, ei saa see täielikult asendada katsemeetodis C.18 kasutatud partii tasakaalustamise katseid. Siiski võib kindlaksmääratud  $K_{oc}$  väärtust kasutada selleks, et valida sobivad katseparameetrid adsorptsiooni/desorptsiooni uuringute jaoks vastavalt katsemeetodile C.18, arvutades  $K_d$  (jaotustegur) või  $K_f$  (Freundlichi adsorptsioonitegur) vastavalt võrrandile 3 (vt punkti 1.2).

**1.2. MÕISTED**

$K_d$  – jaotustegur on lahustunud uuritava aine tasakaalukontsentratsioonide  $C$  suhe kahefaasilises süsteemis, mis koosneb sorbendist (muld või reoveesete) ja vesifaasist; see on dimensioonita väärtus, kui kontsentratsioonid mõlemas faasis on väljendatud massiprotsendina. Juhul kui kontsentratsioon vesifaasis esitatakse massi ja ruumala suhtena, on ühikuteks  $\text{ml g}^{-1}$ .  $K_d$  võib muutuda vastavalt sorbendi omadustele ning sõltuda kontsentratsioonist.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

kus:

$C_{soil}$  = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon mullas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

$C_{sludge}$  = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon jääkides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

$C_{aq}$  = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )).

**▼ B**

$K_f$  – Freundlichi adsorptsioonitegur on uuritava aine kontsentratsioon mullas või reoveesetis ( $x/m$ ), kui tasakaalukontsentratsioon  $C_{aq}$  vesifaasis on üks; ühikud on  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  sorbenti. Väärtus võib muutuda sõltuvalt sorbendi omadustest.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

kus:

$x/m$  = sorbendi kogusesse  $m$  (g) adsorbeerunud uuritava aine kogus  $x$  ( $\mu\text{g}$ ) tasakaaluolekus

$1/n$  = Freundlichi adsorptsiooniisotermi kõver

$C_{aq}$  = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

$K_{oc}$  – sorbendi orgaanilise süsiniku sisalduse ( $f_{oc}$ ) suhtes normaliseeritud aine jaotustegur ( $K_d$ ) või Freundlichi adsorptsioonitegur ( $K_f$ ); eriti mitteioniseerumata kemikaalide korral on see ligikaudselt indikaatoriks aine ja sorbendi vahelise adsorptsiooni ulatuse määramisel ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Olenevalt  $K_d$  ja  $K_f$  mõõtmetest võib  $K_{oc}$  olla dimensioonita suurus või omada ühikuid  $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$  või  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  orgaanilist ainest.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left( \text{dimensionless or } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \right) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} \left( \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (3)$$

$K_{oc}$  ja  $K_d$  vaheline suhe ei ole alati lineaarne ja seega võivad  $K_{oc}$  väärtused mullati erineda, kuid nende varieerivus on palju väiksem võrreldes  $K_d$  või  $K_f$  väärtustega.

Adsorptsioonitegur ( $K_{oc}$ ) tuletatakse võimsustegurist ( $k'$ ), kasutades kaliibrimisgraafikut, milles  $\log k'$  esitatakse  $\log K_{oc}$  funktsioonina valitud võrdlusühendite kohta.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kus:

$t_R$  = uuritava aine ja võrdlusaine HPLC peetumisaeg (minutites)

$t_0$  = HPLC surnud aeg (minutites) (vt punkti 1.8.2).

$P_{ow}$  – oktanooli/vee jaotustegur on n-oktanooli ja vette lahustunud aine kontsentratsioonide suhe, mis on ilma dimensioonita väärtus

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Enne meetodi kasutamist peavad olema teada struktuurivalem, puhtus ja dissotsiatsioonikonstant (vajaduse korral). Kasulik on ka teave vees ja orgaanilistes lahustites lahustuvuse, oktanooli/vee jaotusteguri ja hüdrolüüsi omaduste kohta.

**▼B**

Selleks, et uuritava aine mõõdetud HPLC-retentsioonandmeid saaks korreleerida uuritava aine adsorptsiooniteguri  $K_{oc}$ -ga, tuleb joonistada kaliibrimisgraafik, milles  $\log K_{oc}$  esitatakse  $\log k'$  funktsioonina. Kasutada tuleks minimaalselt kuut võrdluspunkti, millest vähemalt üks on madalam ja üks kõrgem kui uuritava aine eeldatav väärtus. Meetodi täpsus paraneb märgatavalt, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud. Kui sellised andmed ei ole kättesaadaval, valib kasutaja ise sobivad kaliibrimisained. Sellisel juhul tuleks valida struktuuriliselt heterogeensed ained. Kasutamiseks sobivad ained ja  $K_{oc}$  väärtused on esitatud reoveesette puhul liite tabelis 1 ja mulla puhul tabelis 3. Teiste kaliibrimisainete valikut tuleks põhjendada.

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

HPLC tehakse analüütilistes kolonnides, mis on täidetud müügiloleva tsüanopropüüli faasiga, mis sisaldab lipofiilseid ja polaarseid struktuuriühikuid. Kasutatakse mõõdukalt polaarset statsionaarset faasi, mis põhineb ränidioksiidmaatriksil:

- O - Si	- CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>	- CN
Ränidioksiid	Mittepolaarne spacer-aine	Polaarne struktuuriühik

Katsemeetodi põhimõte on sarnane meetodiga A.8 (jaotustegur, HPLC-meetod). Kui uuritav aine läbib kolonni koos liikuva faasiga, reageerib see statsionaarse faasiga. Kuna uuritav aine jaguneb liikuva ja statsionaarse faasi vahel, aeglustub selle liikumine. Kuna statsionaarses faasis on nii polaarseid kui mittepolaarseid osasid, võivad molekulide polaarset ja mittepolaarset rühmad reageerida samal viisil kui orgaaniline aines mulla- või reoveesette maatriksites. See võimaldab määrata kolonniga seotud peetumisaja ja orgaanilise ainese adsorptsiooniteguri vahelise suhte.

pH-l on märkimisväärne mõju sorptsioonile, eriti polaarsete ainete puhul. Põllumajandusmaa või reoveepuhastusjaamade mahutite pH on tavaliselt vahemikus pH 5,5–7,5. Ioniseerivate ainete korral tuleks teha kaks uuringut nii ioniseeritud kui ioniseerimata kujul sobivates puhverlahustes, kuid ainult siis, kui vähemalt 10 % katsetühenditest dissotsieerub vahemikus pH 5,5–7,5.

Kuna määramisel kasutatakse ainult HPLC-kolonniga seotud peetumisaja ja adsorptsiooniteguri vahelist suhet, ei ole kvantitatiivset analüüsimeetodit tarvis ja määrata tuleb ainult peetumisaeg. Kui kasutatakse sobivaid võrdlusaineid ja katse tingimused on standardsed, võimaldab see meetod kiiresti ja efektiivselt määrata adsorptsiooniteguri  $K_{oc}$ .

## 1.5. UURINGU KASUTATAVUS

HPLC-meetod sobib selliste keemiliste ainete jaoks (märgistamata või märgistatud), mille jaoks on saadav sobiv tuvastamissüsteem (nt spektrofotomeeter, radioaktiivsuse detektor) ja mis on katse tegemise jooksul piisavalt püsivad. See võib olla eriti kasulik selliste kemikaalide puhul, mida on raske uurida muude katsesüsteemidega (st lenduvad ained; ained, mis ei lahustu vees kontsentratsioonil, mida on võimalik analüütiliselt mõõta; inkubatsioonüsteemide pinna suhtes suurt afiinsust omavad ained). Meetodit saab kasutada segude puhul, mille korral ei ole võimalik elueerimisribasid eristada. Sellisel juhul tuleks märkida ära uuritavate ainete segu ühendite  $\log K_{oc}$  väärtuste ülemine ja alumine piir.

**▼B**

Lisandid võivad mõnikord põhjustada probleeme HPLC-tulemuste tõlgendamisel, kuid need ei ole väga olulised, kui uuritavat ainet on võimalik analüütiliselt selgelt identifitseerida ja lisanditest eraldada.

See meetod on valideeritud liite tabelis 1 loetletud ainete jaoks ja seda on kasutatud ka paljude teiste kemikaalide puhul, mis kuuluvad järgmistesse kemikaalide klassidesse:

- aromaatsed amiinid (nt trifluraliin, 4-klooraniliin, 3,5-dinitroaniiliin, 4-metüülaniliin, N-metüülaniliin, 1-naftüülamiin);
- aromaatsed karboksüülhappe estrid (nt bensoehappe metüülester, 3,5-dinitrobensoehappe etüülester);
- aromaatsed süsivesinikud (nt toluen, ksüleen, etüülbenseen, nitrobenseen);
- arüüloksüfenoksüpropioonhappe estrid (nt diklofop-metüül, fenoksaprop-etüül, fenoksaprop-P-etüül);
- bensimidiasool- ja imidasoolfungitsiidid (nt karbentasiim, fuberidasool, triasoksiid);
- karboksüülhappe amiidid (nt 2-klorobensamiid, N,N-dimetüülbensamiid, 3,5-dinitrobensamiid, N-metüülbensamiid, 2-nitrobensamiid, 3-nitrobensamiid);
- klooritud süsivesinikud (nt endosulfaan, DDT, heksaklorobenseen, kintoseen, 1,2,3-triklorobenseen);
- orgaanilist fosforit sisaldavad insektitsiidid (nt metüülasiinfoss, disulfotoon, fenamifoss, isofeenfoss, pürasofoss, sulprofoss, triasofoss);
- fenoolid (nt fenool, 2-nitrofenool, 4-nitrofenool, pentaklorofenool, 2,4,6-triklorofenool, 1-naftool);
- fenüülkarbamiidi derivaadid (nt isoproturoon, monolinuroon, pentsükuroon);
- värvained (nt Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polüaromaatsed süsivesinikud (nt atsenafteen, naftaleen);
- 1,3,5-triasiinherbitsiidid (nt prometrüün, propasiin, simasiin, terbutrüün);
- triasooli derivaadid (nt tebukonasool, triadimefoon, tradimenool, triapentenool).

Meetodit ei kasutata ainete puhul, mis reageerivad kas eluendi või statsionaarse faasiga. Samuti ei kasutata seda ainete puhul, mis reageerivad spetsiifilisel viisil anorgaaniliste ühenditega (nt moodustavad klasterkomplekse savimineraalidega). Meetod ei pruugi toimida ka pindaktiivsete ainete, anorgaaniliste ühendite ja mõõdukalt tugevate või tugevate orgaaniliste hapete ja aluste korral. Kindlaks võib määrata log  $K_{oc}$  väärtused vahemikus 1,5–5,0. Tuleb määrata ioniseeruvad ained, kasutades puhverdatud liikuvat faasi, kuid hoolitseda tuleb selle eest, et puhvri komponendid ega uuritav aine ei sadestuks.

**▼ B**

## 1.6. KVALITEEDIKRITERIUMID

## 1.6.1. Täpsus

Tavaliselt saab uuritava aine adsorptsiooniteguri määrata täpsusega  $\pm 0,5$  logaritmiühikut perioodilise tasakaalu meetodiga määratud väärtusest (vt liites olevat tabelit 1). Suurema täpsuse võib saavutada, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud.

## 1.6.2. Korratavus

Määramised tuleks teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest määramistest tuletatud  $\log K_{oc}$  väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

## 1.6.3. Reprodutseeritavus

Meetodi kasutamisest saadud kogemused toetavad selle valiidsust. HPLC-meetodi uurimine, milles kasutati 48 ainet (enamasti pestitsiidid), mille kohta on olemas usaldusväärsed mulla  $K_{oc}$  kohta käivad andmed, andis korrelatsioonikordaja  $R = 0,95$  (10, 11).

Meetodi töhustamiseks ja valideerimiseks viidi läbi laboratooriumidevaheline võrdlusuuring, milles osales 11 laboratooriumi (12). Tulemused on esitatud liite tabelis 2.

## 1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.7.1. Adsorptsiooniteguri esialgne määramine

Oktanooli/vee jaotustegurit  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) ja teatud ulatuses ka vees lahustuvust saab kasutada adsorptsiooni ulatuse indikaatoritena, eriti ioniseerimata ainete korral, ja seega kasutada esialgse ulatuse leidmiseks. Paljude kemikaalide rühmade kohta on avaldatud mitmeid kasulikke korrelatsioone (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

## 1.7.2. Seadmed

Vajalik on mittepulseeriva pumba ja sobiva tuvastamiseseadmega vedelikkromatograafi olemasolu. Soovitatakse kasutada klapp-pihustit, millel on sisestus silmus. Kasutatakse müügilolevaid ränidioksiidist alusega tsüanopropüülidemega seotud vaike (nt Hypersil ja Zorbax CN). Sama aine juhtkolonni võib asetada sisetussüsteemi ja analüütilise kolonni vahele. Erinevate tarnijate kolonnid võivad oma eraldamise efektiivsuse suhtes märkimisväärselt varieeruda. Juhisena tuleks üritada saavutada järgmised võimsustegurid  $k'$ :  $\log k' > 0,0$ , kui  $\log K_{oc} = 3,0$ , ja  $\log k' > -0,4$ , kui  $\log K_{oc} = 2,0$ , kasutades metanooli/vee suhet 55/45 % liikuva faasina.

## 1.7.3. Liikuvad faasid

Uuritud on mitmeid liikuvaid faase ja soovitatakse kahte järgmist:

— metanool/vesi (55/45 mahuprotsenti);

— metanool/0,01 M tsitraatpuffer pH 6,0 (55/45 mahuprotsenti).

**▼B**

Elueerimislahusti valmistamiseks tuleb kasutada HPLC-puhast metanooli ja destilleeritud vett või tsitraatpuhvit. Enne kasutamist segud degaseeritakse. Kasutada tuleb isokraatilist elueerimist. Kui metanooli/vee segud ei sobi, võib kasutada teisi orgaanilise lahusti ja vee segusid, näiteks etanooli ja vee segu või atsetonitriili ja vee segu. Ioniseerivate ühendite korral soovitatakse kasutada puhverlahust pH stabiliseerimiseks. Tuleb hoolitseda selle eest, et sool ei ladestuks ja kolonn ei manduks, mida võib mõningate orgaaniliste faaside/puhversegude korral esineda.

Kasutada ei tohi mingeid lisaaineid, nagu näiteks ioonpaari reaktiive, sest need võivad mõjutada statsionaarse faasi sorptsiooni omadusi. Sellised statsionaarse faasi muutused võivad olla pöördumatud. Seetõttu on kohustuslik lisaaineid kasutavad katsed viia läbi eraldi kolonnis.

**1.7.4. Soluudid**

Uuritavad ained ja võrdlusained tuleks lahustada liikuvus faasis.

**1.8. KATSE KÄIK****1.8.1. Katsetingimused**

Temperatuur mõõtmiste kestel tuleks dokumenteerida. Väga soovitatav on kasutada reguleeritava temperatuuriga kolonni, et tagada püsivad tingimused kaliibrimise ja hindamise katsete jooksul ning uuritava aine määramisel.

**1.8.2. Surnud aja  $t_0$  määramine**

Surnud aja  $t_0$  määramiseks võib kasutada kahte erinevat meetodit (vt ka punkti 1.2).

**1.8.2.1. Surnud aja  $t_0$  määramine, kasutades homoloogilist rida**

See menetlus on andnud usaldusväärseid ja standardiseeritud  $t_0$  väärtusi. Üksikasju vt katsemeetodit käsitlevas punktis A.8: jaotustegur (n-oktanool/vesi), HPLC-meetod.

**1.8.2.2. Surnud aja  $t_0$  määramine inertsete ainete abil, mis ei jää kolonni**

See tehnika põhineb formamiidi, karbamiidi või naatriumnitraadi lahuste lisamisel. Määramisi tuleks teha vähemalt kaks korda.

**1.8.3. Peetumisaegade  $t_R$  määramine**

Võrdlusained tuleks valida punktis 1.3 kirjeldatud viisil. Need võib sisestada segastandardina peetumisaegade kindlaksmääramiseks, tingimusel, et on tõendatud, et ühegi võrdlus standardi peetumisaega ei mõjuta teiste võrdlusstandardite juuresolek. Kaliibrimine tuleks teha korrapäraste ajavahemike tagant vähemalt kaks korda päevas, et oleks võimalik seletada kolonni tulemuste ootamatuid muutusi. Kaliibrimis-sisestused soovitatakse teha enne ja pärast uuritava aine sisestamist, et saada kinnitust selle kohta, et peetumisaeg ei ole muutunud. Uuritavad ained sisestatakse eraldi võimalikult väikestes kogustes (et vältida kolonni ülekoormust) ning nende peetumisaegad määratakse kindlaks.

**▼B**

Määramiste usaldusväärsuse suurendamiseks tuleb need teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest mõõtmistest tuletatud  $\log K_{oc}$  väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

1.8.4. **Hindamine**

Võimsustegurid  $k'$  arvutatakse valitud võrdlusainete surnud aja  $t_0$  ja peetumisaegade  $t_R$  põhjal vastavalt võrrandile 4 (vt punkti 1.2). Seejärel joonistatakse graafik, milles võrdlusainete  $\log k'$  andmed esitatakse liite tabelites 1 ja 3 toodud partii tasakaalustamise katsetest saadud vastavate  $\log K_{oc}$  väärtuste funktsioonina. Selle graafiku abil kasutatakse uuritava aine  $\log k'$  väärtust selle  $\log K_{oc}$  väärtuse määramiseks. Kui tegelikud tulemused näitavad, et uuritava aine  $\log K_{oc}$  on väljaspool kaliibrimisvahemikku, tuleks uuringut korrata, kasutades erinevaid, sobivamaid võrdlusaineid.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

Aruanne peab sisaldama järgmist teavet:

- uuritavate ainete ja võrdlusainete identsus ja puhtus ning vajaduse korral  $pK_a$  väärtused;
- seadmete ja tegevustingimuste kirjeldus, nt analüütilise (ja juht-) kolonni tüüp ja mõõtmed, tuvastamisvahendid, liikuv faas (komponentide suhe ja pH), temperatuuri vahemik määramiste jaoksul;
- surnud aeg ja selle määramiseks kasutatud meetod;
- kolonni viidud uuritavate ainete ja võrdlusainete kogused;
- kaliibrimiseks kasutatud võrdlusühendite peetumisajad;
- joonestatud regressioonigraafiku ( $\log k'$  vs  $\log K_{oc}$ ) üksikasjalikud andmed ja graafik ise;
- uuritud ühendi keskmised peetumisandmed ja määratud  $\log K_{oc}$  väärtus;
- kromatogramm.

3. **VIITED**

- 1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- 2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC Chemosphere, 17, 1 67.
- 3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050–1059.
- 4) C T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227–231.
- 5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297–312.

**▼B**

- 6) C T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, pp. 831–832.
- 7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pp. 833–846.
- 8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), pp. 121–128.
- 9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493–2504.
- 10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), pp. 2341–2352.
- 11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, pp. 285–304.
- 12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), pp. 1373–1384.





liide

Tabel 1

Muldade ja reoveesette  $K_{oc}$  väärtuste ja HPLC-sõelumismeetodi alusel arvatud väärtuste võrdlus <sup>(1)</sup>/<sup>(2)</sup>

Aine	CASi nr	log $K_{oc}$ reoveesete	log $K_{oc}$ HPLC	$\Delta$	log $K_{oc}$ mullad	log $K_{oc}$ HPLC	$\Delta$
Atrasiin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuroon	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentioon	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuroon	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoehappe fenüülester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamiid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamiid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Atsetaniliid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniliin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloroaniliin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

<sup>(1)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121-128.

<sup>(2)</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.

Tabel 2

HPLC-meetodi tõhustamiseks ja valideerimiseks tehtud laboratooriumidevahelise võrdlusuuringu (11 laboratooriumi osalusel) tulemused <sup>(1)</sup>

Aine	CASi nr	log $K_{oc}$ (OECD 106)	$K_{oc}$	log $K_{oc}$
		[HPLC-meetod][	[HPLC-meetod]	
Atrasiin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuroon	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenool	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuroon	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentioon	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

<sup>(1)</sup> W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



Tabel 3

## Mulla adsorptsiooni käsitlevatel andmetel põhineva HPLC-sõelumismeetodi jaoks soovitatavad võrdlusained

Võrdlusained	CASi nr	Partii tasakaaluolekust saadud log K <sub>oc</sub> keskmised väärtused	K <sub>oc</sub> andmete number	log S.D.	Allikas
Atseetaniliid	103-84-4	1,25	4	0,48	( <sup>a</sup> )
Fenool	108-95-2	1,32	4	0,70	( <sup>a</sup> )
2-Nitrobensamiid	610-15-1	1,45	3	0,90	( <sup>b</sup> )
N, N-dimetüülbensamiid	611-74-5	1,52	2	0,45	( <sup>a</sup> )
4-metüülbensamiid	619-55-6	1,78	3	1,76	( <sup>a</sup> )
Metüülbensoaat	93-58-3	1,80	4	1,08	( <sup>a</sup> )
Atrasiin	1912-24-9	1,81	3	1,08	( <sup>c</sup> )
Isoproturoon	34123-59-6	1,86	5	1,53	( <sup>c</sup> )
3-nitrobensamiid	645-09-0	1,95	3	1,31	( <sup>b</sup> )
Aniliin	62-53-3	2,07	4	1,73	( <sup>a</sup> )
3,5-dinitrobensamiid	121-81-3	2,31	3	1,27	( <sup>b</sup> )
Karbentasiim	10605-21-7	2,35	3	1,37	( <sup>c</sup> )
Triadimenool	55219-65-3	2,40	3	1,85	( <sup>c</sup> )
Triasoksiid	72459-58-6	2,44	3	1,66	( <sup>c</sup> )
Triasofoss	24017-47-8	2,55	3	1,78	( <sup>c</sup> )
Linuroon	330-55-2	2,59	3	1,97	( <sup>c</sup> )
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	( <sup>a</sup> )
Endosulfaandiool	2157-19-9	3,02	5	2,29	( <sup>c</sup> )
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	( <sup>c</sup> )
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	( <sup>a</sup> )
1,2,3-triklorobenseen	87-61-6	3,16	4	1,40	( <sup>a</sup> )
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	( <sup>a</sup> )
Fentioon	55-38-9	3,31	3	2,49	( <sup>c</sup> )
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	( <sup>a</sup> )
Pürasofoss	13457-18-6	3,65	3	2,70	( <sup>c</sup> )
α-endosulfaan	959-98-8	4,09	5	3,74	( <sup>c</sup> )
Diklofop-metüül	51338-27-3	4,20	3	3,77	( <sup>c</sup> )
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	( <sup>a</sup> )
Basic Blue 41 (segu)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	( <sup>a</sup> )
DDT	50-29-3	5,63	1	—	( <sup>b</sup> )

(<sup>a</sup>) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R&D Report No 106 01044 (1994)

(<sup>b</sup>) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(<sup>c</sup>) Tööstusest saadud andmed.

▼ M7C.20. HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE

## SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 211 (2012). OECD katsejuhendeid vaadatakse teaduse arengut arvestades korrapäraselt läbi. Sigivuse katsejuhend 211 pärineb katsejuhendi 202 II osast „*Daphnia* sp. sigivuse katse“ (1984). Oli üldiselt teada, et katsejuhendi nr 202 kohaselt läbiviidud katsete andmed võivad olla muutlikud. Seepärast tehti suuri jõupingutusi, et leida selle muutlikkuse põhjused ja luua parem katsemeetod. Katsejuhendi 211 aluseks on teadusuuringute tulemused, laboritevahelised võrdluskatsed ja valideerimisuurinud, mis tehti 1992. (1), 1994. (2) ja 2008. aastal (3).

Peamised erinevused sigivuskatse esialgselt versioonist (nr 202, 1984) ja teisest versioonist (nr 211, 1998) on järgmised:

- soovitatud kasutatav liik on *Daphnia magna*;
- katse kestab 21 päeva;
- poolstaatiliste katsete puhul kasutatavate loomade arvu on iga uuritava kontsentratsiooni puhul vähendatud vähemalt 40-lt, kes olid eelistatult jaotatud neljaks kümneloomaliseks rühmaks, 10 loomale, keda hoitakse eraldi (kuigi läbivoolukatsete puhul võib kasutada erinevaid katseplaanide);
- katses kasutatava söötme ja söötmistingimuste kohta on esitatud konkreetsemaid soovitusi.
- Peamised erinevused sigivuskatse teise versiooni (nr 211, 1998) ja käesoleva versiooni vahel on järgmised:
  - on lisatud liide 7, et kirjeldada meetodit vastsündinute soo määramiseks, kui seda nõutakse. Kooskõlas käesoleva katsemeetodi varasemate versioonidega on sooline jagunemine üks võimalikke määratavaid näitajaid;
  - Sõltuvat muutujat „elusate järglaste arv ellujäänud vanema kohta“ on täiendatud veel ühe kiivrike paljunemist iseloomustava sõltuva muutujaga, nimelt „elusate järglaste üldarv katse lõpul ühe vanema kohta katse alguses“, kusjuures analüüsil ei võeta arvesse vanemate juhuslikku või seletamatut suremust. Sellise sõltuva muutuja lisamise eesmärk on viia see sõltuv muutuja kooskõlla muudes selgrootutega tehtavates sigivuskatsetes kasutatavate muutujatega. Peale selle on käesolevas katsemeetodis selle sõltuva muutuja puhul võimalik kõrvaldada üks veaallikatest, nimelt vanemloomade juhuslik või seletamatu suuremus, kui see toimub kokkupuuteperioodi ajal;
  - lisatud on täiendavaid statistilisi juhiseid katsete kavandamise ja andmete töötlemise kohta nii seoses EC<sub>x</sub> (nt EC<sub>10</sub> või EC<sub>50</sub>) kui ka NOEC/LOEC (tähtsamat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim tähtsamat toimet avaldav kontsentratsioon) lähenemisviisiga;
  - lisatud on piirsalduskatse.

Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

Katse põhieesmärk on hinnata kemikaalide mõju *Daphnia magna* sigivusele. Selleks viiakse noored emased kiivrikud (vanemloomad), kes on katse alguses alla 24 tunni vanad, kokkupuutesse veele eri kontsentratsioonides lisatud uuritava kemikaaliga. Katse kestab 21 päeva. Katse lõpus hinnatakse elusate lisandunud järglaste koguarvu. Vanemloomade sigivust saab väljendada ka muul viisil (nt looma kohta päevas saadud elusate järglaste arv alates esimesest päevast, mil järglaste olemasolu märgati), kuid need tuleb esitada lisaks katse lõpus elus

▼ **M7**

olevate noorloomade koguarvule. Tänu muude selgrootutega tehtavate sigivuskatsetega võrreldes erilisele poolstaatilise katseplaanile, on võimalik määrata ka igalt üksikisendilt saadud elusate järglaste arv. See võimaldab, vastupidi muudele selgrootutega tehtavatele sigivuskatsetele, jätta analüüsist välja andmed sellise vanemlooma sigivuse kohta, kes katse ajal juhuslikel või seletamatutel põhjustel sureb. Seega, kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsetes, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses on näha kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade suremust hinnata kui uuritava kemikaali toimet ja selliseid paralleelkatseteid ei tohiks analüüsist välja jätta. Kui vanem sureb katse ajal, st juhusliku (mingi käsitsemisvea või juhuse tõttu) või seletamatu vahejuhtumi tõttu, mis ei ole seotud uuritava kemikaali toimega, või kui vanem osutub isasloomaks, jäetakse see paralleelkatse analüüsist välja (vt lähemalt punkt 51). Uuritava kemikaali toksilised mõjud sigivusele väljendatakse EC<sub>x</sub> kujul, mille leidmiseks lähendatakse andmeid sobivale mudelile mittelineaarse regressiooniga, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab loomade sigivuse vähenemise  $x$  %, või et alternatiivina leida NOEC/LOEC väärtus (4). *Eelistatavalt peaks uuritavate kontsentratsioonide vahemik asuma mõlemal pool toimet avaldavat väikseimat kasutatud kontsentratsiooni (nt EC<sub>10</sub>), mis tähendab, et see väärtus arvutatakse interpoleerimisega, mitte ekstrapoleerimisega.*

Andmed tuleb esitada ka vanemate ellujäämise ja esimeste järglaste saamise aja kohta. Uurida võib ka muid kemikaaliga seotud toimeid sellistele näitajatele, nagu kasv (pikkus), ja võimaluse korral ka populatsiooni kasvu omakiirusele (vt punkt 44).

## TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

Akute toksilisuse katse tulemused (vt käesoleva lisa peatükk C.2. *Daphnia* sp. liikumisvõime akuutse pärssimise katse), kui katse on tehtud *Daphnia magna*'ga, võivad olla kasulikud sigivuskatse tegemiseks sobiva uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valimiseks. Teda peavad olema uuritava kemikaali lahustuvus vees ja aururõhk ning olemas peab olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kemikaali kogust uuritavas lahuses ning mille kohta on teada tulemuslikkus ja määramispiir.

Katsetingimuste kindlaksmääramisel võib olla kasulik järgmine uuritavat kemikaali käsitlev teave: struktuurivalem, kemikaali puhtus, stabiilsus valguse käes, stabiilsus katsetingimustes, pK<sub>a</sub>, P<sub>ow</sub> ja biolagunduvuse katse tulemused (vt käesolevas lisas meetod C.4, kohese biolagunduvuse määramine, ja C.29, kiire biolagundatavus – CO<sub>2</sub> suletud nõudes).

## KATSE NÕUETEKOHASUS

Katse nõuetekohasuse jaoks peavad kontrolli rühma(de)s olema täidetud järgmised kvaliteedikriteeriumid:

— vanemate (emaste kiivrike) suremus ei ületa katse lõpus 20 %;

— katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elusate järglaste keskmine arv on  $\geq 60$ .

Märkus: sama kriteeriumi (20 %) võib kasutada ka juhusliku ja seletamatu vanemate suremuse kohta nii kontrolli katsetes kui ka iga uuritava kontsentratsiooni puhul.

**▼ M7****MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku uuritavate lahustega, peavad olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Katsenõud on tavaliselt klaasist keeduklaasid.

Lisaks võib vaja minna veel järgmisi vahendeid:

- hapnikumõõtur (mikroelektroodi või muu sobiva seadmega, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovides);
- temperatuuri reguleerimiseks vajalikud seadmed;
- pH-meeter;
- seadmed vee kareduse määramiseks;
- seadmed vee orgaanilise süsiniku kogusisalduse määramiseks või seadmed keemilise hapnikutarbe määramiseks;
- sobivad seadmed valgusrežiimi reguleerimiseks ja valgustugevuse mõõtmiseks.

**Katseorganism**

Katses kasutatav liik on *Daphnia magna* Straus<sup>(1)</sup>.

Eelistatavalt tuleks kloon identifitseerida genotüübi määramisega. Teadusuuringud (1) on näidanud, et klooni A (pärit IRCHast Prantsusmaalt) (5) sigivuse puhul on nõuetekohasuse kriteerium – keskmiselt  $\geq 60$  järglast ellujäänud vanema kohta – järjekindlalt täidetud, kui kasvatamine toimub käesoleva meetodi tingimuste kohaselt. Vastuvõetav on ka muude kloonide kasutamine, kui tõendatakse, et kiivrike kultuur vastab katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Katse alguses ei tohiks loomad olla üle 24 tunni vanad ning nad ei tohiks olla esimese haudme järglased. Nad peavad olema pärit tervest põhikultuurist (st neil ei tohi esineda selliseid stressi tunnuseid nagu suur suremus, isaste ja talimunade esinemine, esimese haudme hiline mine, värvimuutusega loomad jne). Põhikultuuri loomi tuleks säilitada katsetingimustega sarnastes kasvatamistingimustes (valgus, temperatuur, sööde, söötmine ja loomade arv ruumalaühiku kohta). Kui katses kasutatav kiivrikute kasvatamise sööde erineb söötimest, mida tavaliselt kasutatakse kiivrikute kasvatamiseks, on hea tava kasutada vanemate stressi vältimiseks katse-eelset tavaliselt umbes kolme nädala pikkust (st üks põlvkond) aklimatiseerimisperioodi.

**Katses kasutatav sööde**

Kõnealuses katses on soovitatav kasutada täielikult määratletud koostisega söödet. See aitab vältida raskesti iseloomustatavate lisaainete (nt merevetikad, mullaekstraktid) kasutamist ja parandab seega laboritevahelise standardimise võimalusi. On leitud, et selleks otstarbeks sobivad söötmed on Elendti M4 (6) ja M7 söötmed (vt 2. liide). Eeldusel, et kiivrikukultuur tõendatult vastab katse nõuetekohasuse kriteeriumidele, on vastuvõetavad siiski ka muud söötmed (nt 7, 8).

<sup>(1)</sup> Muid kiivrike liike võib kasutada tingimusel, et nad vastavad vajalikele katse nõuetekohasuse kriteeriumidele (kontrolli rühma sigivusega seotud nõuetekohasuse kriteerium peaks olema asjakohane kõikide kiivrikuliikide puhul). Kui kasutatakse muid kiivrike liike, tuleb nad selgelt identifitseerida ja nende kasutamine põhjendada.

▼ **M7**

Kui kasutatakse määratlemata lisaineid sisaldavat söödet, tuleb need lisained selgelt määratleda ning katseprotokollis tuleb esitada teave koostise ja eriti süsinikusisalduse kohta, sest see võib täiendada pakutavat söödavalikut. Soovitatav on määrata orgaanilise lisaine põhilahuse orgaanilise süsiniku kogusisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ning hinnata sellest tulenev panus katseks valmistatud söötme orgaanilise süsiniku kogusisaldusse või keemilisse hapnikutarbesse. Soovitatakse veel, et söötme orgaanilise süsiniku kogusisalduse väärtused (enne vetikate lisamist) oleksid väiksemad kui 2 mg/l (9).

Kui uuringud tehakse metalle sisaldavate kemikaalidega, on oluline arvestada, et katseks kasutatud söötme omadused (nt karedus, kelaatimisvõime) võivad mõjutada uuritava kemikaali toksilisust. Seepärast on soovitatav kasutada täpselt määratletud koostisega söödet. Praegu on ainsad täielikult määratletud koostisega söötmed, mis teadaolevalt sobivad *Daphnia magna* pikaajaliseks kultiveerimiseks, Elendti M4 ja M7 söötmed. Mõlemad söötmed sisaldavad kelaativat ainet EDTA. On näidatud (2), et kui sigivuskatse tehakse M4 ja M7 söötmes, on kaadmiumi „näiline toksilisus“ üldiselt väiksem kui söötme puhul, milles puudub EDTA. Seepärast ei soovitata M4 ja M7 kasutada uuringute tegemiseks metalle sisaldavate kemikaalidega ning vältida tuleks ka muid söötmeid, mis sisaldavad teadaolevaid kelaadimoodustajaid. Metalli sisaldavate kemikaalide puhul on soovitatav kasutada alternatiivset söödet, näiteks ASTMi taastatud karedat magevett (9), mis ei sisalda EDTA-d. Kõnealune ASTMi taastatud kareda magevee ja vetikaeakstrakti (10) kombinatsioon sobib *Daphnia magna* pikaajaliseks kasvatamiseks (2).

Lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema üle 3 mg/l katse alguses ja kestel. pH peaks olema vahemikus 6–9 ning see ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui 1,5 ühikut. Soovitatav karedus on üle 140 mg/l (väljendatud CaCO<sub>3</sub>-na). Kõnealusel tasemel tehtud katsete puhul on sigivus olnud vastavuses katse nõuetekohasuse kriteeriumidega (11, 12).

**Katselahused**

Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahused tuleks eelistatavalt valmistada lahusteid või dispergente kasutamata, kui see on võimalik, uuritava kemikaali segamise või loksutamisega katses kasutatavas söötmes, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid, nagu loksutamine, segamine või töötlemine ultraheliga või muid sobivaid meetodeid. On soovitatav, et enne katseloomade lisamist viiakse katsesüsteem kokkupuutesse uuritava kemikaali kontsentratsiooniga, mida katses kasutatakse, nii kauaks, kui on vaja selleks, et tõendada stabiilse kokkupuutekontsentratsiooni püsimist keskkonnas. Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, tuleb kasutada meetodeid, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis raskesti uuritavate ainetega katsete tegemise kohta (13). Lahusti või dispergendi kasutamist tuleks vältida, kuid mõnel juhul võib see olla vajalik annustamiseks sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks.

Lisaks uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidega tehtavatele katsetele tuleb vajaliku arvu paralleelidega teha ka lahendusvee kontrolli katse ja, kui lahusti kasutamist ei õnnestu vältida, siis vajaliku arvu paralleelidega ka lahusti kontrolli katse. Katses tuleks kasutada vaid selliseid lahusteid või dispergente, mida on uuritud ja mille kohta on näidatud, et neil ei ole olulist toimet või on vaid minimaalne toime sõltuvalt muutujale. Sobivate lahustite (nt atsetoon, etanool,

▼ **M7**

metanool, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool) ja dispergentide (näiteks Cremophor RH40, 0,01 % metüülselluloos ja HCO-40) näited on esitatud publikatsioonis (13). Kui kasutatakse lahustit või dispergenti, ei tohiks selle lõppkontsentratsioon ületada 0,1 ml/l (13) ning see kontsentratsioon peab olema ühesugune kõikides katsenõudes, välja arvatud lahjendusvee kontroll. Siiski tuleks teha kõik selleks, et lahusti kontsentratsioon oleks minimaalne.

**KATSE KÄIK****Kokkuuutetingimused***Katse kestus*

Katse kestab 21 päeva.

*Katseloomade asustamistihedus*

Vanemloomad asustatakse katsenõudesse ühekaupa; tavaliselt on katsenõus 50–100 ml söödet (*Daphnia magna* puhul; eriti väiksemate kiivrike, nt *Ceriodaphnia dubia* puhul võib olla võimalik kasutada ka väiksemat ruumala), välja arvatud juhul, kui katse on vaja korraldada läbivoolukatsena.

Vahel võib uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks kasutatava analüüsimeetodi nõuete täitmiseks kasutada suuremat ruumala, kuid lubatud on ka paralleelkatsete koondamine keemilise analüüsi tegemiseks. Kui kasutatava katsevedeliku ruumala on üle 100 ml, võib kiivrikutele antava sööda kogust suurendada, et tagada piisava sööda olemasolu ja vastavus katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

*Katseloomad*

Poolstaatiliste katsete puhul vähemalt 10 eraldi peetavat looma iga uuritava kontsentratsiooni kohta ja vähemalt 10 eraldi peetavat looma kontrolli rühmas.

Läbivoolukatsete korral on osutunud sobivaks 40 looma kasutamine, kes on jagatud nelja kümneliikmelisse rühma iga uuritava kontsentratsiooni kohta (1). Kasutada võib ka väiksemat katsealuste organismide hulka ning soovitatav on kasutada kontsentratsiooni kohta vähemalt 20 looma, kes on jagatud kaheks või enamaks võrdse loomade arvuga paralleelkatseks (nt neli paralleelkatset, igas neist viis kiivrikut). Pange tähele, et kui loomi peetakse rühmadena, ei ole statistilisest analüüsist võimalik välja jätta ühtki järglast, kui seletamatu/juhuslik vanemate suremus esineb pärast sigimise algust; seepärast tuleb järglaste arv sellisel juhul avaldada elusate järglaste üldarvuna katse alguses olemas olnud vanemlooma kohta.

Uuritava aine jaotamine katsenõudesse ja katsenõude hilisem käitlemine peaks toimuma juhuslikul alusel. Kui nii ei tehta, võib see põhjustada tulemustes nihke, mida võib tõlgendada kontsentratsiooni mõjuna. Eelkõige juhul, kui katseühikuid käideldakse uuritava kemikaali manustamise või kontsentratsiooni järjekorras, võib mõni ajaga seotud tegur, näiteks uuringu läbiviija väsimus või muu viga, põhjustada suurema kontsentratsiooni korral tugevamat mõju. Kui katse tulemusi võivad mõjutada tingimused katse alguses või keskkonnatingimused, näiteks asukoht laboris, tuleks kaaluda katse katkestamist.

*Söötmine*

Poolstaatiliste katsete puhul peaks kiivrikke söötma iga päev ning soovitatavalt vähemalt kolm korda nädalas (st vastavalt söötme vahetustele). Arvesse tuleks võtta kokkuuutekontsentratsiooni võimalikku lahjenemist sööda lisamise tõttu; seda tuleks vältida niipalju kui võimalik ja selleks peab lisatav vetikate suspensioon olema hästi kontsentreeritud. Kõrvalekalletest (nt läbivoolukatsete korral) tuleb teatada.

Katse jooksul peaksid vanemate söödavaliku moodustama peamiselt ühe või mitme järgmise vetikaliigi elusad rakud: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (varasem nimetus *Selenastrum capricornutum*) ja *Desmodesmus subspicatus* (varasem nimetus *Scenedesmus subspicatus*). Söödavaliku aluseks

**▼ M7**

on igale vanemale pakutava orgaanilise süsiniku (C) kogus. Teadusuuringud (14) on näidanud, et hiidkiivrikute puhul on söödaratsioon 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas piisav, et saada katse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmiseks vajalik arv järglasi. Sööta võib anda püsikogusena kogu katseperioodi jooksul või soovi korral võib alguses kasutada väiksemat kogust, mida siis katse käigus suurendatakse, et võtta arvesse vanemloomade kasvamist. Sellisel juhul peaks sööda kogus jääma siiski soovitatavasse vahemikku 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas kogu katse vältel.

Kui nõutava koguse söötmisel kasutatakse asendusnäitajaid, näiteks vetikarakude arvu või valguse neeldumist (näiteks lihtsustamise huvides, kuna süsinikusisalduse mõõtmine on aeganõudev), peab iga labor koostama oma nomogrammi, millelt oleks näha asendusnäitaja ja vetikakultuuri süsinikusisalduse seos (vt nõuanded nomogrammi koostamise kohta, 3. liide). Nomogramme tuleks kontrollida vähemalt kord aastas ja juhul, kui vetikakultuuri tingimused on muutunud, siis sagedamini. On leitud, et süsinikusisalduse puhul on parem kasutada valguse neeldumist kui rakkude arvu (15).

Selleks, et minimeerida vetikakultuuri söötme sattumine katsendüüsesse, tuleks kiivrikuid sööta kontsentreeritud vetikasuspensiooniga. Vetikaid saab kontsentreerida tsentrifuugimisega, millele järgneb resuspendeerimine kiivrikute söötmes.

*Valgus*

16 tundi valgust, mille intensiivsus ei ole suurem kui  $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mõõdetuna katsenõu veepinnal. Luksides kalibreeritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valguse intensiivsuse vahemikule  $15\text{--}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vahemik 1 000–1 500 luksit.

*Temperatuur*

Katses kasutatava söötme temperatuur peab olema vahemikus  $18\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ühe individuaalse katse puhul ei tohiks temperatuur ühe päeva jooksul nimetatud piirides võimaluse korral siiski kõikuda rohkem kui  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  (st  $18\text{--}20$ ,  $19\text{--}21$  või  $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Temperatuuri jälgimiseks võib olla otstarbekas kasutada täiendavat katsenõu.

*Aereerimine*

Katsendüüsid ei aereerita katse käigus.

**Katseplaan***Vahemiku määramise katse*

Vajaduse korral tehakse doosivahemiku leidmise katse, näiteks uuritava kemikaali viie kontsentratsiooniga ja kahe paralleeliga iga kokkupuutekatse või kontrolli katse kohta. Täiendav teave kiivriku ja/või muude veeorganismide suremuse või paljunemise kohta kas sarnaste kemikaalidega tehtud akuutse toksilisuse katsetest või kirjandusest võib aidata teha otsust doosivahemiku määramise katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Doosivahemiku määramise katse kestab 21 päeva või nii kaua, kuni toime tugevust saab prognoosida piisava usaldusväärsusega. Katse lõpus hinnatakse kiivriku sigivust. Tuleb registreerida vanemate arv ja järglaste esinemine.

*Lõplik katse*

Tavaliselt tuleks kasutada vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni geomeetrisel jadas, mille eraldustegur ei tohiks soovitatavalt olla suurem kui 3,2 ja mis asuksid mõlemal pool toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt  $\text{EC}_{50}$ ). Iga uuritava kontsentratsiooniga tuleks teha asjakohane arv paralleelkatseid (vt punktid 24–25). Vähem kui viie kontsentratsiooni kasutamist tuleb põhjendada. Kemikaale ei



**▼ M7**

tohiks uurida kontsentratsioonil, mis on suurem kui nende lahustuvus katsekeskkonnas. Enne katse tegemist soovitatakse kaaluda katseplaani statistilist võimsust ja sobivate statistiliste meetodite kasutamist (4). Kontsentratsioonivahemike valimisel tuleks meeles pidada järgmist:

- i) kui hinnatakse sigivusega seotud  $EC_x$  väärtust, on soovitatav kasutada kontsentratsioone, mis oleksid piisavad, et määratleda  $EC_x$  vajalikul usaldusväärsuse tasemel. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid soovitatavalt asuma mõlemal pool hinnangulist  $EC_x$  väärtust, nii et  $EC_x$  leitaks interpoleerimisega, mitte ekstrapoleerimisega. Edasise statistilise analüüsi seisukohast on eeliseks, kui on kasutatud suuremat arvu kontsentratsioone (nt kümmet) ja vähem paralleelkatseid igal kontsentratsioonil (nt viit, millega katsenõude üldarv hoitakse konstantsena) ning kümmet kontrolli;
- ii) LOEC ja NOEC määramisel peaks vähim kontsentratsioon olema piisavalt väike, et sigivus sellel kontsentratsioonil ei oleks oluliselt väiksem kui kontrolli rühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata vähendatud vähima kontsentratsiooniga;
- iii) LOEC ja NOEC määramisel peaks suurim uuritav kontsentratsioon olema piisavalt suur, et sigivus sellel kontsentratsioonil oleks oluliselt väiksem kui kontrolli rühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata suurendatud suurima kontsentratsiooniga, välja arvatud juhul, kui esialgses katses kasutati suurima uuritava kontsentratsioonina suurimat kroonilise mõju uurimisel nõutavat uuritavat kontsentratsiooni (s.t 10 mg/l).

Kui doosivahemiku määramise katses ei täheldata (nt kontsentratsioonil 10 mg/l) mitte mingit mõju või kui on väga tõenäoline, et uuritav kemikaal on vähese toksilisusega või üldse mitte toksiline, arvestades toksilise mõju puudumist muudele organismidele ja/või vähest omastamist (või ei omastata seda üldse), võib sigivuskatse teha piirsalduskatsena, kasutades näiteks uuritava kemikaali kontsentratsiooni 10 mg/l ja kontrolli. Nii kokkupuuterühmas kui ka kontrolli rühmas on vaja teha kümme paralleelkatset. Kui piirsalduskatse tuleb teha läbivoolusüsteemis, siis piisab väiksemast arvust paralleelidest. Piirsalduskatse võimaldab tõendada, et piirsalduse juures puudub kemikaalil statistiliselt oluline toime; samas, kui täheldatakse mingit toimet, on tavaliselt vaja teha täielik katse.

**Kontrollid**

Lisaks katseseeriatele tuleb teha üks katses kasutatud söötme kontrolli katsete seeria ja vajaduse korral ka üks lahustit või dispergenti sisaldava kontrolli katsete seeria. Lahusti või dispergendi kasutamise korral peab nende kontsentratsioon olema sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Kasutada tuleks asjakohast arvu paralleelkatseid (vt punktid 23–24).

Tavaliselt peaks korralikult läbiviidud katse puhul olema kontrolli rühmas (rühmades) vanema kohta saadud elus järglaste keskmise arvu variatsioonikordaja  $\leq 25\%$  ning see tuleb esitada katseplaani puhul, milles kasutatakse üksikult peetavaid loomi.

**Söötme uuendamine**

Söötme uuendamise sagedus sõltub uuritava kemikaali stabiilsusest, kuid see sagedus peaks olema vähemalt kolm korda nädalas. Kui stabiilsuse eelkatsetes (vt punkt 7) ilmneb, et maksimaalse uuendamisperioodi (st kolme päeva) jooksul ei ole uuritava kemikaali kontsentratsioon püsiv (st väljaspool vahemikku 80–120 % või väiksem kui 80 % esialgselt mõõdetud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda katses kasutatava söötme sagedamat uuendamist või kasutada läbivoolukatset.

**▼M7**

Kui söödet uuendatakse poolstaatiliste katsete puhul, valmistatakse ette teine seeria katsenõusid ning vanemad teisaldatakse nendes näiteks sobiva läbimõõduga klaasipeti abil. Koos kiivrikuga teisaldatava söötme kogus peaks olema minimaalne.

**Vaatlus**

Katse jooksul tehtud vaatluste tulemused tuleb registreerida andmelehtedele (vt näidised, 4. ja 5. liide). Kui on vaja teha muid määramisi (vt punkt 44), võib vajalikuks osutuda täiendavate vaatluste tegemine.

**Järglased**

Iga vanema järglased tuleb pärast esimese haudme ilmumist eelistatavalt iga päev eemaldada ja üle lugeda, et nad ei saaks ära süüa vanemloomale ettenähtud sööta. Käesoleva katsemetodi puhul tuleb üle lugeda ainult elusad järglased, kuid registreerida tuleb ka aborteerunud munad ja surnud järglased.

**Suremus**

Vanemate suremus tuleks registreerida soovitatavalt kord päevas või vähemalt niisama sageli kui loendatakse järglasi.

**Muud parameetrid**

Kuigi selle meetodi põhieesmärk on hinnata mõju järglaste arvule, on võimalik, et ka muid toimeid õnnestub piisavalt hästi kvantitatiivselt mõõta, selleks et neid statistiliselt analüüsida. Katses võib registreerida järglaste arvu iga ellujäänud vanema kohta, st kogu katseperioodi jooksul ellujäänud vanemalt saadud elusate järglaste arvu. Seda võib võrrelda peamise sõltuva muutujaga (järglaste arv iga sellise vanema kohta katse alguses, kes ei ole juhuslikult või seletamatult surnud katse ajal). Kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsed, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses esineb kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade surma pidada uuritava kemikaali toimeks ja selliseid paralleelkatseid ei tohiks katsetulemuste analüüsist välja jätta. Väga soovitatav on kasvu iseloomustavate andmete kogumine, sest see annaks teavet võimalike subletaalsete mõjude kohta, mis võivad olla kasulikud ja täiendada ainult sigivust käsitlevate mõõtmiste tulemusi; katse lõpus on soovitatav mõõta vanemate pikkus (st kehapikkus, v.a anaaloga). Lisaks sellele võib mõõta või arvutada veel järgmised parameetrid: aeg esimese haudme (ja sellele järgnevale haudmete) saamiseni, haudmete arv ja suurus looma kohta, aborteerunud haudmete arv, isaste noorjarkude (OECD, 2008) ja talimunade esinemine ning võimaluse korral populatsiooni kasvu omakiirus (vt mõisted, 1. liide, ja noorjarkude soo määramine, 7. liide).

**Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

Värsked ja vana söötme hapnikusisaldust, temperatuuri, vee karedust ja pH-väärtusi tuleb mõõta vähemalt kord nädalas, kontrolli rühmas (rühmades) ja uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooniga katsenõus.

Katse käigus määratakse uuritava kemikaali kontsentratsiooni korrapärase ajavahemike järel.

Poolstaatiliste katsete puhul, kui võib eeldada, et uuritava kemikaali kontsentratsioon jääb vahemikku  $\pm 20\%$  nimiväärtusest (st vahemikku 80–120%; vt punktid 6, 7 ja 39), on soovitatav analüüsida vähemalt vähimat ja suurimat uuritavat kontsentratsiooni vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal üks

**▼ M7**

kord esimese nädala jooksul (st analüüsida tuleb proovi, mis on võetud samast lahusest – kohe pärast valmistamist ja uuendamise ajal). Hiljem tuleks nimetatud määramisi korrata vähemalt iga nädala järel.

Kui katsete puhul ei eeldata, et uuritava kemikaali kontsentratsioon jääb vahemikku  $\pm 20\%$  nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal. Kui tegemist on katsega, mille puhul esialgne mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioon ei jää vahemikku  $\pm 20\%$  nimiväärtusest, kuid esitatakse piisavalt tõendeid selle kohta, et esialgsed kontsentratsioonid on korratavad ja püsivad (st jäävad vahemikku 80–120 % esialgsest kontsentratsioonist), võib katse teisel ja kolmandal nädalal keemilisi määramisi siiski vähendada ja piirduda vaid suurima ja vähima uuritava kontsentratsiooni analüüsimisega. Igal juhul tuleb enne uuendamist määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon ainult ühes paralleelkatset sisaldavas nõus iga uuritava kontsentratsiooni kohta.

Kui kasutatakse läbivoolumatset, on otstarbekas kasutada samasugust proovivõtukorda nagu poolstaatiliste katsete puhul kirjeldatud (kuid sellisel juhul ei ole võimalik mõõta „vanu“ lahuseid). Siiski võib olla soovitatav suurendada proovivõttude arvu esimesel nädalal (nt kolm mõõtmist), et veenduda uuritava kontsentratsiooni püsivuses. Seda tüüpi katsete puhul tuleks lahjendusvedeliku ja uuritava kemikaali voolukiirust kontrollida iga päev.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsioon on kogu katse vältel püsinud rahuldavalt vahemikus  $\pm 20\%$  nimiväärtusest või esialgu mõõdetud kontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda nimiväärtusel või esialgu mõõdetud väärtusel. Kui kõrvalekaldumine nimiväärtusest või esialgu mõõdetud kontsentratsioonist on suurem kui  $\pm 20\%$ , tuleks tulemused esitada ajaga kaalutud keskmistena (vt arvutamishendid, 6. liide).

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete töötlemine**

Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju sigivusele. Iga katsenõu (st iga paralleelkatse) kohta tuleb arvutada vanema kohta saadud järglaste koguarv. Lisaks võib sigivuse arvutada ellujäänud vanemalt saadud elusate järglaste arvu järgi. Ökoloogiliselt kõige asjakohasem mõju näitaja on siiski sellisel vanemalt saadud elusate järglaste üldarv, kes ei sure katse ajal juhuslikult<sup>(1)</sup> või seletamatult<sup>(2)</sup>. Kui vanem sureb katse ajal juhuslikult või seletamatult või osutub isasloomaks, jäetakse see paralleelkatse analüüsist välja. Analüüsi aluseks võetakse sel juhul väiksem arv paralleelkatseid. Kui kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetes esineb vanemate suremust, tuleks kaaluda, kas suremuses on märgata kontsentratsiooni-toime sõltuvust, näiteks, kas esineb toime oluline regressioon, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooni positiivse tõusuga (selle määramiseks võib kasutada Cochran-Armitage'i trenditesti). Kui suremusega seoses ei esine kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleb need paralleelkatsed, milles esineb vanemate suremust, katsetulemuste analüüsist välja jätta. Kui suremuses esineb kontsentratsiooni-toime sõltuvust, tuleks vanemloomade surma pidada uuritava kemikaali toimeks ja selliseid paralleelkatseid ei tohiks katsetulemuste analüüsist välja jätta.

Lühidalt, kui mõju väljendamiseks kasutatakse LOEC, NOEC või EC<sub>x</sub> väärtusi, on soovitatav arvutada mõju sigivusele, kasutades mõlemat eespool nimetatud sõltuvat muutujat, nimelt

<sup>(1)</sup> Juhuslik suremus: suremus kemikaaliga mitte seotud juhuste tõttu (st põhjus on teada).

<sup>(2)</sup> Seletamatu suremus: kemikaaliga mitte seotud suremus, mille põhjus ei ole teada.

▼ **M7**

- selliselt vanemalt saadud elusate järglaste üldarv, kes ei ole katse ajal surnud juhuslikult või seletamatult, ja
- elusate järglaste arv ellujäänud vanemloomade kohta,

ning kasutada seejärel lõpptulemusena väikseimat LOEC ja NOEC või  $EC_x$  väärtust, mis on arvatud nendest kahest sõltuvast muutujast ühe põhjal.

Enne statistilist analüüsi, nt ANOVA analüüsi, kokkupuutekatsete võrdlemist kontrolli katsetega Studenti t-testi, Dunnetti testi või Williamsi testi abil või sammuviisilise muutujate elimineerimise Jonckheere'i-Terpstra testi astmelise rakendamise, soovitakse kaaluda andmete teisendamist, kui see on vajalik konkreetse statistilise testi nõuete täitmiseks. Mitteparameetriliste alternatiividena võib kaaluda Dunni või Manni-Whitney testi kasutamist. Üksikute kontsentratsioonitasemete keskvaartuste jaoks arvutatakse 95 % usaldusvahemikud.

Ellujäänud vanemloomade arv kemikaaliga mõjutamata kontrolli rühmades on üks peamisi katse nõuetekohasuse kriteeriume; see tuleb dokumenteerida ja esitada katseprotokollis. Lõpparuandes tuleb esitada ka kõik muud ilmnunud kahjulikud mõjud, nagu ebaharilik käitumine ja olulised toksikoloogilised nähud.

*EC<sub>x</sub>*

$EC_x$  väärtused koos nende 95 % usaldusvahemiku ülemise ja alumise piiriga arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt logistiline või Weibulli funktsioon, Spearmani-Kärberi kohendatud meetod või lihtne interpolatsioon).  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  või mõne muu  $EC_x$  arvutamiseks tuleb kõiki andmeid töödelda regressioonanalüüsiga.

*Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)*

Kui statistilise analüüsi eesmärk on määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon, tuleb kasutada sobivaid statistilisi meetodeid vastavalt OECD dokumendile 54, vt „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“ („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunist“) (4). Üldiselt otsitakse andmetest uuritava kemikaali negatiivset mõju, võrreldes kontrolli rühmaga, kasutades selleks ühepoolse hüpoteesi testimist  $p \leq 0,05$  juures.

Normaaljaotuse olemasolu ja dispersiooni homogeensust võib kontrollida asjakohase statistilise testiga, nt Shapiro-Wilki testi ja Levene'i testiga ( $p \leq 0,05$ ). Võib teha ühepoolse dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja seejärel mitmese võrdluse teste. Mitmeseid võrdlusi (nt Dunnetti test) või sammuviisilise muutujate elimineerimise trendi teste (nt Williamsi test või astmeline Jonckheere'i-Terpstra test) saab kasutada selleks, et arvutada, kas esineb olulisi erinevusi ( $p \leq 0,05$ ) kontrolli rühmade ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonide vahel (soovitatav test valitakse vastavalt OECD dokumendile nr 54 (4)). Teiselt poolt võib NOEC ja LOEC määramiseks kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmi või Jonckheere'i-Terpstra trenditestile).

*Piirsalduskatse*

Kui on tehtud piirsalduskatse (kontrolli rühma võrdlemine ainult ühe kontsentratsiooni katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tulemuse analüüsiks kasutada Studenti t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi, näiteks Manni-Whitney U-testi.

Kontrolli rühmade (lahustita ja lahustiga või dispergendiga kontrolli katsete) vaheliste oluliste erinevuste kindlakstegemiseks võib kummagi kontrollirühma paralleelkatseid analüüsida piirsalduskatse puhul kirjeldatud viisil. Kui kõnealuste testidega ei tuvastata olulisi erinevusi, võib kõikide lahustita ja lahustiga kontrolli paralleelkatsete andmed ühte koondada. Vastasel juhul tuleks kõikide katserühmade andmeid võrrelda lahustiga kontrolli katsete andmetega.

**▼M7****Katseprotokoll**

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

*Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline olemus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused;
- keemiline iseloomustus, kaasa arvatud puhtusaste.

*Katseorganismi liik:*

- kloon (kas genotüüp on määratud), tarnija või päritolu (kui on teada) ja kasutatud kultiveerimistingimused. Kui kasutatakse muud hiidkiivriku liiki, tuleks see ära märkida ja seda põhjendada.

*Katsetingimused:*

- kasutatud katsemeetod (nt poolstaatiline või läbivoolukatse, ruumala, kiivrikute arv liitri kohta);
- fotoperiood ja valgustugevus;
- katseplaan (nt paralleelkatsete arv, vanemate arv paralleelkatse kohta);
- andmed kasutatud söötme kohta;
- vajaduse korral kasutatud orgaanilised lisaained, sh koostis, päritolu, valmistusmeetod, põhilahuse orgaanilise süsiniku kogusisaldus / keemiline hapnikutarve, sellest tulenev söötme orgaanilise süsiniku kogusisalduse / keemilise hapnikutarbe hinnang;
- üksikasjalikud andmed söötmise kohta, sealhulgas kogus (mg C kiivriku kohta päevas) ja ajakava (nt sööda (söötade) liik, sh vetikate puhul konkreetne (liigi) nimi ja võimaluse korral ka liin, kasvatamistingimused);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamissagedus (kui kasutatakse lahustit või dispergenti, tuleks esitada selle nimi ja kontsentratsioon).

*Katsetulemused:*

- uuritava kemikaali stabiilsuse esialgsete uuringute tulemused;
- nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, mis on tehtud katsenõudes oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks (vt andmelehtede näidised, 5. liide); esitada tuleks ka meetodi tulemuslikkus ja määramispiir;
- katsenõudes oleva vee kvaliteet (st pH, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus, orgaanilise süsiniku kogusisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ja vajaduse korral vee karedus) (vt andmelehe näidis, 4. liide);
- täielikud andmed katse käigus igalt vanemalt saadud elusate järglaste kohta (vt andmelehe näidis, 4. liide);
- vanemate surmajuhtude arv ja surmapäev (vt andmelehe näidis, 4. liide);
- kontrolli rühma järglaste arvu variatsioonikordaja (katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elus järglaste kogu arvu põhjal);
- graafik elusate järglaste arvu kohta igas paralleelkatses, välja arvatud emasloomad, kes on katse ajal surnud juhuslikult või seletamatult, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga;

▼ M7

- sobivas teljestikus graafik elusate järglaste üldarvu kohta igas paralleelproovis ellujäänud emaslooma kohta, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga;
- võimaluse korral vähim sigivusele täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC), sh kasutatud statistiliste meetodite kirjeldus ja märge selle kohta, kui suurt mõju võis eeldada (enne selle määramiseks korraldatavat katset võib teha statistilise võimsuse analüüsi), ning sigivusele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC); teave selle kohta, millist sõltuvat muutujat kasutati LOEC ja NOEC väärtuste arvutamiseks (kas elusate järglaste arv emaslooma kohta, kes ei surnud juhuslikult või seletamatult, või elusate järglaste üldarv iga elusoleva emaslooma kohta); kui asjakohane, tuleb esitada ka emasloomade suremuse LOEC ja NOEC;
- vajaduse korral sigivuse EC<sub>x</sub> ja usaldusvahemikud (näiteks 90 % ja 95 %) ning graafik, millele on kantud andmetega sobitatud mudel, mida kasutati selle arvutamiseks, kontsentratsiooni-reaktsiooni sõltuvuse kõvera tõus ja selle standardvigaga;
- muud täheldatud bioloogilised mõjud või mõõtmised; tuleb esitada andmed kõigi täheldatud või mõõdetud bioloogiliste mõjude kohta (nt vanemate kasv) koos võimalike asjakohaste põhjendustega;
- selgitused kõigi katsemeetodist kõrvalekaldumiste kohta.

## KIRJANDUS

- (1) OECD Test Guidelines Programme. „Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test“, Sheffield University, U.K., 20.–21. märts 1993.
- (2) OECD (1997). „Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test“. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). „Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test“. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* No.88. OECD, Paris.
- (4) 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 Number 54*. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J. *et al.* (1991). „A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus“. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, 257–265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). „Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus“. *Protoplasma* 154: 25–33.
- (7) EPA (2002). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. [www.epa.gov/waterscience/methods](http://www.epa.gov/waterscience/methods)
- (8) Vigano, L. (1991). „Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*“. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775–782.
- (9) ASTM, (2008), „Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians“. In: *Annual Book of ASTM Standards: Water and Environmental Technology*, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- (10) Baird, D.J. *et al.* (1989). „The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects“. In: *Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology*. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen Eds.) pp 144–148.

**▼M7**

- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte, and G.P. Wright (1981) „Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*“. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1–8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990), „The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness“, *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
- (13) 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*. OECD, Paris.
- (14) Sims, I.R., S. Watson and D. Holmes (1993), „Toward a standard *Daphnia* juvenile production test“. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053–2058.
- (15) Sims, I. (1993). „Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth“. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459–466.

▼ **M7***1. liide***MÕISTED**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

**Avastamispiir** – vähim kontsentratsioon, mille olemasolu on võimalik määrata, kuid mille suurust ei saa kvantitatiivselt mõõta.

**Ex** – vees lahustatud uuritava aine kontsentratsioon, mille juures kiivrike sigivus väheneb kokkupuuteaja jooksul  $x$  %.

**Juhuslik suremus** – suremus kemikaaliga mitte seotud juhusete tõttu (st põhjus on teada).

**Järglane** – noor kiivrik, kes on saanud vanemloomalt katse jooksul.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Määramispiir** – vähim kontsentratsioon, mille suuruse saab kvantitatiivselt mõõta.

**Populatsiooni kasvu omakiirus** – populatsiooni kasvu määr, milles on ühendatud sigivus ja east tingitud suremus (1–3). Stabiilsetes populatsioonides on see null. Kasvavate populatsioonide puhul on see positiivne ja kahanevate populatsioonide puhul negatiivne. Kahanevad populatsioonid ei ole ilmselt jätkusuutlikud ja surevad lõpuks välja.

**Seletamatu suremus** – kemikaaliga mitte seotud suremus, mille põhjus ei ole teada.

**Sigivus** – vanemloomadelt katse ajal saadud elusate järglaste arv.

**Suremus** – loom registreeritakse surnuna, kui ta ei liiguta, st ei suuda ujuda, või kui 15 sekundit pärast katsenõu ettevaatlikku loksutamist ei ole võimalik täheldada tundlate ja tagakeha liikumist. (Kui kasutatakse teistsugust määraflust, tuleb see esitada koos vajalike viidetega.)

**Täheldatavat toimet mitte avaldav kontsentratsioon (NOEC)** – esimene LOECst väiksem uuritud kontsentratsioon, millel teatatud kokkupuuteaja jooksul ei avaldu kontrolli rühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju ( $p < 0,05$  juures).

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Vanemloom** – katse alguses katses olnud emane kiivrik, kelle sigivuse uurimine on katse eesmärk.

**Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)** – vähim uuritud kontsentratsioon, mille puhul ainel on teatatud kokkupuuteaja jooksul kontrolli rühmaga võrreldes statistiliselt oluline ( $p < 0,05$  juures) mõju sigivusele ja vanemate suremusele. Kõikidel LOECst suurematel uuritavatel kontsentratsioonidel peaks avalduma kahjulik mõju, mis on võrdne või suurem kui LOECi korral täheldatav mõju. Kui neid kaht tingimust ei ole võimalik täita, tuleb esitada täielik selgitus, kuidas LOEC (ja sellest tulenevalt ka NOEC) on valitud.

## Kirjandus

- (1) Wilson, E.O. ja Bossert, W.H. (1971), *A Primer of Population Biology*. A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.



▼ M7

- (2) Poole, R.W. (1974), „An Introduction to quantitative Ecology“. *McGraw-Hill Series in Population Biology*, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. ja Boyce, M.S. (1986), „Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques“. *Ecology*, 67, 1156–1166.

▼ **M7**

## 2. liide

**TÄIELIKULT MÄÄRATLETUD ELENDTI M7 JA M4 SÖÖTMETE VALMISTAMINE****Kohanemine Elendti söötmetega M7 ja M4**

Mõnes laboris on olnud raskusi kiivriku üleviimisega otse söötmesse M4 (I) ja M7. Teatavat edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimiselega oma söötmest 30 % Elendti söödet sisaldavasse söötmesse, seejärel 60 % ja siis 100 % Elendti söödet sisaldavasse söötmesse. Kohanemisaeg võib kesta kuni kuu aega.

**Valmistamine***Mikroelemendid*

Kõigepealt valmistatakse sobiva puhtusastmega vees, nt deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosi teel puhastatud vees, individuaalsete mikroelementide eraldi põhilahused (I). Nendest eri põhilahustest (I) valmistatakse üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

Põhilahused I (üks aine)	Vette lisatav kogus	Kontsentratsioon (söötmes M4)	Kombineeritud põhilahuse II valmistamiseks lisada veele järgmine kogus põhilahust I	
			ml/l	
	mg/l		M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57 190	20 000-kordne	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	7 210-kordne	20 000-kordne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kordne	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kordne	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3 040	20 000-kordne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kordne	1,0	0,25
MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 260	20 000-kordne	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	335	20 000-kordne	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20 000-kordne	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200	20 000-kordne	1,0	1,0
KI	65	20 000-kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20 000-kordne	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20 000-kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	5 000	2 000-kordne	—	—
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 991	2 000-kordne	—	—
Nii Na <sub>2</sub> EDTA kui ka FeSO <sub>4</sub> lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku ja autoklaavitakse kohe. Tulemuseks saadakse:				
Fe-EDTA lahus		1 000-kordne	20,0	5,0

▼ **M7***Söötmed M4 ja M7*

Söötmete M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse põhilahust II, makroelemente ja vitamiine järgmiselt:

	Vette lisatav kogus	Kontsentratsioon (söötmes M4)	Söötmel valmistamiseks lisatud põhilahuse kogus	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Põhilahus II (ühendatud elemendid) mikro-		20-kordne	50	50
Makrotoitainete põhilahused (üks aine) põhila-				
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	293 800	1 000-kordne	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246 600	2 000-kordne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kordne	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1 000-kordne	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	50 000	5 000-kordne	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2 740	10 000-kordne	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	10 000-kordne	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	10 000-kordne	0,1	0,1
Vitamiinide ühendatud põhilahus	—	10 000-kordne	0,1	0,1

Vitamiinide ühendatud põhilahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmiselt:

	mg/l			
Tiamiinvesinikkloriid	750	10 000-kordne		
Tsüanokobalamiin (B <sub>12</sub> )	10	10 000-kordne		
Biotiin	7,5	10 000-kordne		

Vitamiinide ühendatud põhilahust säilitatakse külmutatuna väikestes alikvootides. Vitamiinid lisatakse söötmele vahetult enne kasutamist.

*N.B.:* Soolade sadestumise vältimiseks lisatakse täieliku söötme valmistamisel põhilahuste alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ja seejärel lisatakse vett kuni 1 liitrini.

*N.N.B.* Esimese söödet M4 käsitleva uuringu võib leida artiklist Elendt, B.P. (1990), „Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus“. *Protoplasma* 154: 25–33.

▼ M7

## 3. liide

**ORGAANILISE SÜSINIKU KOGUSISALDUSE ANALÜÜS JA VETIKATEL PÕHINEVA SÖÖDA JAOKS ORGAANILISE SÜSINIKU KOGUSISALDUSE NOMOGRAMMI KOOSTAMINE**

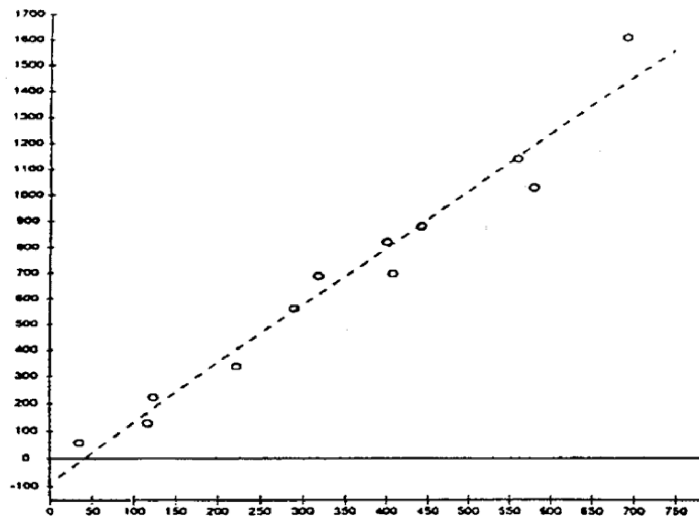
On teada, et vetikatel põhineva sööda süsinikusisaldust ei mõõdetata tavaliselt otse, vaid asendusparameetrite mõõtmistest (nt vetikarakkude arv või valguse neelduvus) tulenevate korrelatsioonide (st nomogrammi) põhjal.

Orgaanilise süsiniku kogusisaldust tuleks mõõta pigem kõrgel temperatuuril toimuva oksüdatsiooni kui UV- või persulfaatmeetodiga. (Nõuanded vt: „The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands“ 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammi koostamiseks tuleks vetikad eraldada söötmest tsentrifuugimisega, millele järgneb resuspendeerimine destilleeritud vees. Asendusparameeter ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus tuleb mõõta igas proovis kolm korda. Analüüsida tuleb destilleeritud vett sisaldavaid tühiproove ning orgaanilise süsiniku kogusisaldus määratakse saadud sisalduse lahutamisel vetikaproovi orgaanilise süsiniku kogusisaldusest.

Nomogramm peab nõutava süsinikusisalduse vahemikus olema lineaarne. Näited on esitatud allpool.

*N.B.* Siin esitatud nomogramme ei tohi kasutada teisendamiseks; on oluline, et iga labor koostaks oma nomogrammid ise.



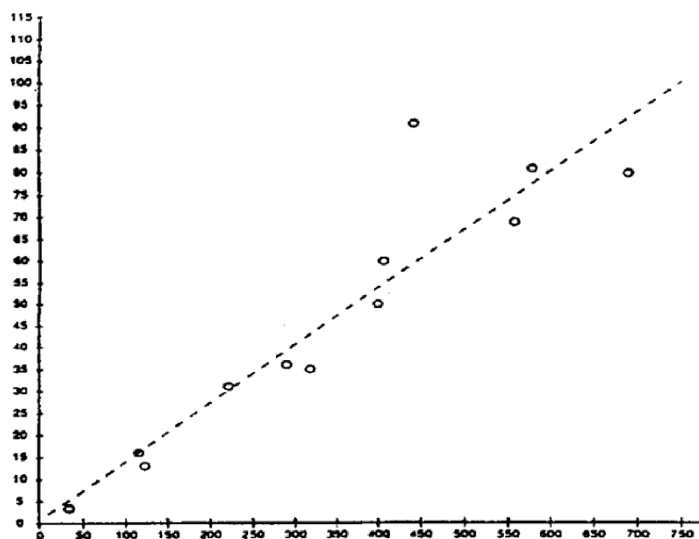
*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

Seos kuivmassi (mg/l) ja orgaanilise süsiniku sisalduse (mg C/l) vahel. Andmed on saadud poolpideva partiiiviisilise rakukultuuri kontsentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontsentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: kontsentreeritud vetikasööda kuivmass, mg/l.

Parandustegur – 0,980

▼ M7

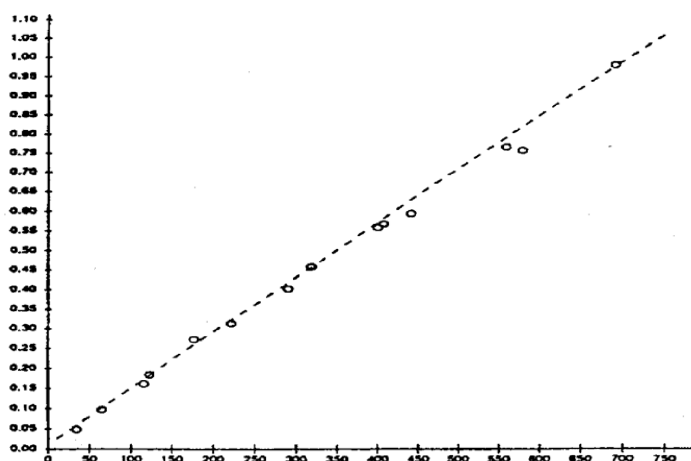
*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

Seos rakkude arvu ja orgaanilise süsiniku sisalduse (mg C/l) vahel. Andmed on saadud poolpideva partiiviisilise rakukultuuri kontseentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontseentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: kontseentreeritud vetikasööda rakkude arv/l

Parandustegur – 0,926



*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

Neelduvuse ja mg C/l vaheline seos (optilise tee pikkus 1 cm). Andmed on saadud poolpideva partiiviisilise rakukultuuri kontseentreeritud suspensiooni kohta, pärast resuspendeerimist destilleeritud vees.

x-telg: kontseentreeritud vetikasööda orgaanilise süsiniku sisaldus, mg C/l.

y-telg: Määratakse kontseentreeritud vetikasööda optiline neeldumine lainepikkusel 440 nm ja lahjendusel 1/10.

Parandustegur – 0,998

NÄIDISANDMELEHT KESKKONNA UUENDAMISE, FÜÜSIKALISE/KEEMILISE SEIRE ANDMETE, SÖÖTMISE, KIIVRIKE SIGIVUSE JA TÄISKASVANUD ISENDITE SUREMUSE REGISTREERIMISEKS

Katse nr:	Alguskuupäev:					Kloon:			Sööde:					Sööda liik:					Uuritav kemikaal:					Nimikonsentratsioon:	
Päev	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Söötme uuendamine (märkida „linnukesega“)																									
pH (*)																									uus
																									vana
O <sub>2</sub> (mg/l) (*)																									uus
																									vana
Temp (°C) (*)																									uus
																									vana
Söötmine (märkida „linnukesega“)																									
Elus järglaste arv (**)																									Kokku
Katsenõu 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									







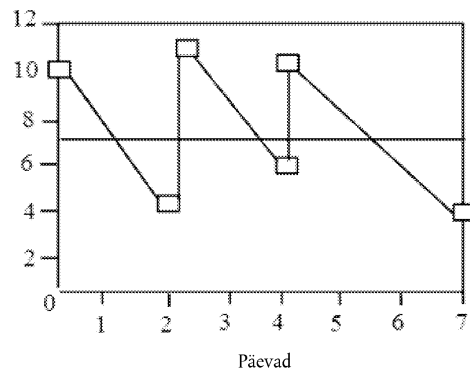
▼ **M7**

## 6. liide

**AJAGA KAALUTUD KESKMISE ARVUTAMINE****Ajaga kaalutud keskmine**

Arvestades, et uuritava kemikaali kontsentratsioon võib söötme uuendamiste vahel väheneda, tuleb kaaluda, milline kontsentratsioon on kiivriku emasloomade söötme esinenud kontsentratsioonide suhtes esindav. Valiku tegemisel tuleks lähtuda nii bioloogilistest kui ka statistilistest teguritest. Näiteks kui arvatakse, et sigivust mõjutab kõige enam suurim kontsentratsioon, siis tuleks kasutada maksimaalset kontsentratsiooni. Kui aga arvatakse, et olulisem on toksilise kemikaali elusorganismi kogunemisest tulenev või pikaajaline mõju, siis on otstarbekam kasutada keskmist kontsentratsiooni. Sellisel juhul on sobiv keskmisena kasutada ajaga kaalutud keskmist kontsentratsiooni, kuna selle puhul võetakse arvesse hetkekonsentratsioonide varieerumist aja jooksul.

Joonis 1

**Ajaga kaalutud keskmise näide**

Joonisel 1 on näide (lihtsustatud) katse kohta, mis kestis seitse päeva ja mille puhul vahetati söödet 0., 2. ja 4. päeval.

- Peenike sakiline joon väljendab kontsentratsiooni igal ajahetkel. Oletatakse, et kontsentratsiooni vähenemine vastab eksponentsiaalse lagunemisprotsessile.
- Kuus joonisele märgitud punkti kujutavad iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus mõõdetud kontsentratsioone.
- Jäme pidevjoon näitab ajaga kaalutud keskmise asukohta.

Ajaga kaalutud keskmine arvutatakse selliselt, et ajaga kaalutud keskmise joonest allapoole jääva ala pindala on võrdne kontsentratsioonikõverast allapoole jääva ala pindalaga. Eespool toodud näidet käsitlevad arvutused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1

**Ajaga kaalutud keskmise („AK kesk“) arvutamine**

Uuendamine nr	Days	Conc 0	Conc 1	Ln (Conc 0)	Ln (Conc 1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼ **M7**

Uuendamine nr	Days	Conc 0	Conc 1	Ln (Conc 0)	Ln (Conc 1)	Area
Päevad kokku:	7					Üldpindala: 50,092 AK kesk: 7,156

*Days* tähistab uuendamisperioodi päevade arvu.

*Conc 0* tähistab iga uuendamisperioodi alguses mõõdetud kontsentratsiooni.

*Conc 1* tähistab iga uuendamisperioodi lõpus mõõdetud kontsentratsiooni.

*Ln (Conc 0)* tähistab *Conc 0* naturaallogaritmi.

*Ln (Conc 1)* tähistab *Conc 1* naturaallogaritmi.

*Area* on selle ala pindala, mis igal uuendamisperioodil asub allpool eksponentsiaalsel kõveral. See arvutatakse järgmise valemi kohaselt:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Ajaga kaalutud keskmine (AK kesk) on üldpindala, mis on jagatud päevade üldarvuga.

Kiivriku sigivuse katse puhul tuleks tabelit loomulikult pikendada selliselt, et see hõlmaks 21 päeva.

On selge, et kui vaatlusi tehakse ainult iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus, ei ole võimalik kinnitada, et lagunemisprotsess on tegelikult eksponentsiaalne. Teistsuguse kõvera puhul oleks pindala (*Area*) arvutamine teistsugune. Eksponentsiaalse lagunemisprotsessi olemasolu ei ole siiski ebatõenäoline ning seega on seda kirjeldava kõvera kasutamine muu teabe puudumise korral kõige otstarbekam.

Juhul, kui keemilise analüüsiga ei leita uuendamisperioodi lõpus jälgi uuritavast kemikaalst, tuleb siiski olla ettevaatlik. Kui kemikaali lahusest kadumise kiirust ei ole võimalik hinnata, on võimatu saada kõvera alla tõlevastavat pindala ja seega ei ole võimalik saada mõistlikku ajaga kaalutud keskmist.

▼ M7

## 7. liide

**JUHISED VASTKOORUNUD KIIVRIKU SOO MÄÄRAMISEKS**

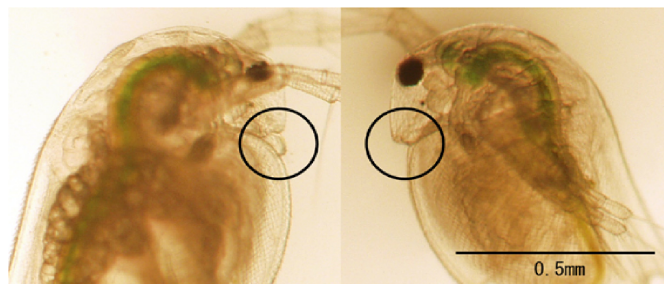
Muutuvates keskkonnatingimustes, nagu lühenev valge aeg, langev temperatuur, toidu kontsentratsiooni vähenemine ja suurenev asustustihedus võivad hakata kooruma isased noorloomad (Hobaek ja Larson, 1990; Kleiven jt, 1992). Isasloomade ilmumine on samuti üks teadaolevaid vastuseid teatavatele putukate kasvuregulaatoritele (Oda jt, 2005). Tingimustes, kus keemilised mõjurid vähendavad partenogeensete emasloomade sigivust, võiks eeldada isasloomade arvu suurenemist (OECD, 2008). Olemasoleva teabe põhjal ei ole võimalik prognoosida, milline sugude vahekorra või sigivuse näitaja on tundlikum; siiski on tõendeid (vt valideerimisaruanne, 1. osa), et see isasloomade arvu suurenemine järglaste hulgas võib olla vähem tundlik näitaja kui järglaste arvu vähenemine. Kuna katsemeetodi peamine eesmärk on hinnata saadud järglaste arvu, on isasloomade ilmumise jälgimine vabatahtlik. Kui uuringus vabatahtlikult hinnatakse seda näitajat, tuleb kasutada täiendavat katse nõuetekohasuse kriteeriumi; nimelt ei tohiks kontrolli katsetes ilmuda isasloomi üle 5 %.

Kõige praktilisem ja lihtsam viis kiivrike sooliseks eristamiseks on kasutada nende fenotüübilisi tunnuseid, kuna isas- ja emasloomad on geneetiliselt identsed ning nende soo määrab keskkond. Isas- ja emasloomad on erineva pikkusega ja nende esimeste tundlate välimus on erinev; isasloomadel on need pikemad kui emasloomadel (joonis 1). See erinevus on äratuntav kohe pärast koorumist, samas kui muud teised sugutunnused arenevad välja kiivrike täiskasvanuks saamisel (vt nt joonis 2, Olmstead ja LeBlanc, 2000).

Morfoloogilise soo hindamiseks tuleks iga vanema munadest koorunud vastsed võtta pipetti ja panna sellega Petri tassile, millel on katses kasutatav sööde. Söötmekogus peab olema minimaalne, et piirata loomade liikumist. Esimeste tundlate vaatlemiseks võib kasutada stereomikroskoopi (10–60).

*Joonis 1*

***D. magna* 24-tunnine isasloom (vasakul) ja emasloom (paremal). Isasloomi võib emasloomadest eristada esimeste tundlate pikkuse ja kuju järgi, nagu on osutatud ringidega (Tatarazako jt 2004).**



## VIITED

Hobaek A. ja Larson P. 1990, „Sex determination in *Daphnia magna*“. *Ecology* 71: 2255–2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992, „Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli“. *Oikos* 65, 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M. ja Iguchi T. 2005, „Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs“. *Chemosphere* 61: 1168–1174.

**▼M7**

OECD (2008), „Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test“. *OECD Series on Testing and Assessment*, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000, „Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*“. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004, „Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)“. *Environmental Science* 17, 439–449.

**▼B****C.21. MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 216 (2000).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud kemikaalide pikaajaliste mõjude uurimiseks mullamikroobide lämmastiku transformatsiooni suhtes pärast ühekordset kokkupuudet Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemeremaade taimekaitseorganisatsiooni soovitusel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalt (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3), SETACi (4) ja Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (5) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (6). Mullaproovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitusel põhinevad ISO juhisdokumendil (7) ja Belgirate töörühma soovitusel. Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutada vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Lämmastiku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii lämmastiku transformatsiooni kui ka süsiniku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katsest. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC<sub>50</sub>-väärtused on kaubanduslike nitrifikatsiooniinhibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututes koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeenseses segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustavad mikroobikogumid on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade lämmastiku transformatsiooni protsessile. Katsemeetod võimaldab samuti hinnata ainete mõjusid mulla mikrofloora süsiniku transformatsioonile. Nitraat tekib pärast süsinik-lämmastiksidemete lagunemist. Seetõttu kui nitraadi teke leitakse olevat samal tasemel katse- ja kontrollmuldades, on väga tõenäoline, et peamised süsinikusidemete lagunemisteed on puutumata ja toimivad hästi. Katses kasutatava substraadi (peenes- tatud lutsernijahu) süsiniku-lämmastiku suhe on soodne (tavaliselt 12/1 ja 16/1). Seetõttu ei vähendata süsiniku puudust katse käigus ja kui mikroobikogumeid kahjustab kemikaal, siis taastuvad need 100 päeva jooksul.

**▼ B**

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid agrokemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud lämmastiku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja  $EC_x$  väärtuste arvutamiseks, milles  $x$  on mõju protsendina.

## 1.2. MÕISTED

**Lämmastiku transformatsioon** – mikroobide tegevuse tulemusena ammonifikatsiooni- ja nitrifikatsiooniprotsessi kaudu toimuv, lämmastikku sisaldava orgaanilise aine lõplik lagunemine vastavaks anorgaaniliseks lõppsaaduseks, nitraadiks.

**$EC_x$  (efektiivkontsentratsioon)** – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks  $x$  protsenti.

**$EC_{50}$  (efektiivkontsentratsiooni mediaan)** – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks 50 protsenti (50 %).

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda parandatakse peenestatud taimejahuga ning seda kas töödeldakse seejärel katseainega või jäetakse töötlemata (kontrollproov). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitatav kasutada vähemalt kahte katsekonsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast inkubeerimise 0-, 7., 14. ja 28. päeva ekstraheeritakse katse- ja kontrollmullaproove sobiva lahustiga ning määratakse kindlaks ekstraktides esinevad nitraadikogused. Nitraaditekke kiirust katseproovides võrreldakse kiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katse- ja kontrollproovide protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollmullaproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi kuni 100 päeva. Kui ei uurita agrokemikaale, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsiooni ridu ning katse- ja kontrollproovides tekkinud nitraadikoguseid mõõdetakse pärast 28 inkubeerimispäeva. Mitmekordseid kontsentratsioone käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonmudelit kasutades, ning arvutatakse väärtused (s.t  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ja/või  $EC_{10}$ ). Vt mõisteid.

## 1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on  $\pm 25$  %) kontroll- ja katsemullaproovide nitraadi kontsentratsioonide vahel, et kontrollproovide suured muutused võib viia väärte tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui  $\pm 15$  %.

**▼B**

## 1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seadmed**

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforeeritud polüetüleenkillega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasikindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Katses kasutatakse järgmiseid standardseid laboriseadmeid:

- segamisseade: mehaaniline segur või vastav seade;
- tsentrifuug (3 000 g) või filtreerimisseade (kasutades nitraadivaba filterpaberit);
- nitraadi analüüsi jaoks piisava tundlikkuse mõõteseade, mille mõõtmistulemus on korduvteostatav.

1.6.2. **Mullaliikide valik ja arv**

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

- liivasisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %;
- pH: 5,5–7,5;
- orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;
- mikroobi biomassi tuleks mõõta (8, 9) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorptsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutada vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

**▼ B****1.6.3. Mullaproovide kogumine ja säilitamine****1.6.3.1. Kogumine**

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põua- või vettimisperiodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm).

Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

**1.6.3.2. Säilitamine**

Värskelt põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproovid lahustada pimedas temperatuuril  $4 \pm 2$  °C maksimaalselt kolmeks kuuks. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C kuni miinus 22 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne iga katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusisaldusest (vt punkti 1.6.2).

**1.6.4. Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine****1.6.4.1. Eelinkubeerimine**

Kui mullaproovid säilitati (vt punkti 1.6.3.2), on soovitatav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katses (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).



**▼B**1.6.4.2. *Füüsikalise-keemilised omadused*

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

1.6.4.3. *Parandamine orgaanilise substraadiga*

Mulda tuleks parandada sobiva orgaanilise substraadiga, nt peenes-  
tatud lutserni-rohujahu seguga (põhiline koostisosa on *Medicago sativa*), mille süsiniku-lämmastiku suhe on 12/1 ja 16/1. Soovitav lutserni-mulla suhe on 5 g lutserni ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass).

1.6.5. **Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks**

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veeslahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartslüüv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid, nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitatav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse samase veehulgaga ja/või üksnes kvartslüüvaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada homogeenne jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekteerida mulda mitmes kohas).

1.6.6. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitatavad katsekonsentratsioonid suurimad arvutuskonsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekonsentratsioon olema saadud PEC korrutamisel suurima eeldatava annustamise arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC<sub>x</sub> väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

**▼B**

## 1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitatav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitatav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsitavad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusest, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimatest eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuaegade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril  $20 \pm 2$  °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suuri- mast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus  $\pm 5$  %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides nitraaditekke kiirust. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. Arvutatakse  $EC_x$  väärtused.

**▼B****1.7.2. Mullaproovide võtmine ja analüüs****1.7.2.1. Mullaproovide võtmise ajakava**

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides nitraati 0-, 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katsed pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekonsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides nitraati kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali  $EC_x$  väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas nitraadi algkogusest teatamiseks.

**1.7.2.2. Mullaproovide analüüs**

Igas katse- ja kontrollproovi paralleelproovis tekkinud nitraadi kogus määratakse kindlaks igal proovivõtuajal. Nitraat ekstraheeritakse mullast proovide raputamise teel sobiva ekstrahendiga, nt kaaliumkloriidilahus (0,1 M). Soovitav suhe on 5 ml KCl lahust mullaproovi ühe kuivmassi grammi kohta. Ekstraheerimise optimeerimiseks ei tohiks mulla ja ekstrahendi mahutid olla rohkem kui pooltäis. Segu raputatakse 150 rpm 60 minutit. Segusid tsentrifuugitakse või filtreeritakse ning analüüsitakse vedelfaasist nitraat. Osakestevabad vedelikuekstraktid võib säilitada enne analüüsi miinus  $20 \pm 5$  °C juures kuni kuus kuud.

**2. TULEMUSED****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis tekkinud nitraadikogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Lämmastiku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisusaste). Tekkinud nitraadi koguseid väljendatakse mg nitraadina mulla kuivmassi kg kohta päevas. Nitraadi tekke kiirusi igas katseproovis võrreldakse kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse kontrollproovide protsentuaalne hälve.

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis tekkinud nitraadi kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver  $EC_x$  väärtuste hindamiseks. Nitraadikoguseid (s.t mg nitraati mulla kuivmassi kg kohta) katseproovides pärast 28 päeva võrreldakse kontrollproovis olevate nitraadikogustega. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsiooniväärtused iga katsekonsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse konsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure  $EC_x$  väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid ( $p = 0,95$ ) arvatud  $EC_x$  puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (10, 11, 12).

Katseained, mis sisaldavad lämmastiku suuri koguseid võivad mõjutada katse käigus tekkivaid nitraadikoguseid. Kui nimetatud ained uuritakse suurte konsentratsioonidena (nt kemikaalid, mida eeldatavasti annustatakse korduvalt), peaks katse sisaldama sobivaid kontrollid (s.t mullaproov ja katseaine ilma taimejahuta). Nimetatud kontrollidest saadud andmeid peab võtma arvesse  $EC_x$  väärtuste arvutamisel.

**▼B**

## 2.2. TULEMUSTE TÖLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning nitraatidekke kiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurimale eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtuajal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseainel ei ole pikaajalist toimet lämmastiku tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ja/või  $EC_{10}$  väärtusi.

## 3. ARUANDLUS

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

- geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);
- kasutusviis (nt põllumaa, mets jne);
- proovivõtu sügavus (cm);
- liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);
- pH (vees);
- orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);
- lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);
- algne lämmastikusisaldus (mg nitraati kg kuivmassi kohta);
- kationvahetusvõime (mmol/kg);
- mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;
- viide iga parameetri määramismeetodi kohta;
- kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;
- vajaduse korral üksikandmed mulla eelinkubeerimise kohta.

Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastikusisaldus.

Substraat:

- substraadi allikas;
- koostis (lutsernijahu, lutserni-rohujahu);
- süsiniku-, lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);
- sõelaava suurus (mm).

**▼ B**

## Katsetingimused:

- üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;
- üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;
- inkubatsioonitemperatuur;
- mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;
- kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);
- paralleelsete proovide arv;
- proovivõtuajad;
- nitraadi mullast ekstraheerimise meetod.

## Tulemused:

- analüüsimeetod ja -seade, mida kasutatakse nitraadi analüüsimiseks;
- andmed tabeli kujul, sh nitraadi mõõtmiste üksikud ja keskvaartused;
- katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;
- arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;
- nitraadi tekke kiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral  $EC_{50}$  väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud  $EC_x$  väärtused (s.t  $EC_{25}$  või  $EC_{10}$ ) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;
- tulemuste statistiline töötlemine;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

## 4. VIITED

- 1) Eppo (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. Eppo Bulletin 24: 1-16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.
- 5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

**▼B**

- 6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 January 1995.
- 7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- 9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol, and Exper. Ther.*, 96, 99–113.
- 11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- 12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

**▼B****C.22. MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 217 (2000).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud selleks, et uurida põllukultuuride kaitsevahendite ja muude võimalike kemikaalide pikaajalisi mõjusid mullamikroobide süsiniku transformatsioonile ühekordse kokkupuute järel. Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemere taimekaitseorganisatsiooni soovitusel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalt (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3) ja SETACi (4) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (5). Mullaproovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitused põhinevad ISO juhisdokumendil (6) ja Belgirate töörühma soovitusel.

Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutada vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Süsiniku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii süsiniku transformatsiooni kui ka lämmastiku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katsest. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC<sub>50</sub> väärtused on kaubanduslike nitrifikatsioonihibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututest koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeenseses segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustav mikroobikogum on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

**▼B**

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade süsiniku transformatsiooni protsessile. Katse on tundlik süsiniku transformatsioonis osaleva mikroobikogumi suuruse ja tegevuse muutuste suhtes, kuna katses lastakse neil mikroobikogumitel osa saada nii keemilisest stressist kui ka süsinikupuudusest. Kasutatakse liivast mulda, mille orgaanilise aine sisaldus on madal. Seda mulda töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse tingimustes, mis võimaldavad kiiret mikroobide ainevahetust. Nimetatud tingimustes on kiirelt vähenenud kergesti kättesaadava süsiniku allikad mullas. See põhjustab süsiniku puudust, mis tapab mikroobirakud ning kutsus esile puhkeperioodi ja/või sporulatsiooni. Kui katset tehakse kauem kui 28 päeva, saab mõõta nimetatud reaktsiooni summat (töötlemata mulla) kontrollproovides metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi järkjärgulise vähenemisenä (7). Kui süsinikupuuduses vaevlevas mullas olevat biomassi mõjutab katsetingimustes kemikaali esinemine, ei saa see pöörduda tagasi samale tasemele nagu kontrollproovis olev biomass. Seetõttu katseaine põhjustatud häireid mis tahes ajal katse käigus kestavad tihti kuni katse lõpuni.

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid prognoositavaid arvestuskontsentratsioone omavate kemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustatavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud süsiniku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja  $EC_x$  väärtuste arvutamiseks, milles x on mõju protsendina.

## 1.2. MÕISTED

**Süsiniku transformatsioon** – orgaanilise aine lagundamine mikroorganismide poolt anorgaaniliseks lõppsaaduseks, süsinikdioksiidiks.

**$EC_x$  (efektiivkontsentratsioon)** – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks x protsendiga.

**$EC_{50}$  (efektiivkontsentratsiooni mediaan)** – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks 50 protsendiga.

## 1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.



**▼B**

## 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda töödeldakse kas katseainega või jäetakse töötlemata (kontroll). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitatav kasutada vähemalt kahte katsekonsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast 0-, 7., 14. ja 28. inkubeerimispäeva segatakse katse- ja kontrollmullaproovid glükoosiga ning glükoosi põhjustatud hingamiskiirust mõõdetakse järjestikusel 12 tunnil. Hingamiskiirusi väljendatakse vabanenud süsinikdioksiidina (mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis) või tarbitud hapnikuna (mg hapnikku kg mulla kohta tunnis). Keskmist hingamiskiirust katseproovides võrreldakse sama hingamiskiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katseproovi ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi 14päevaste intervallidega kuni maksimaalselt 100 päeva. Kui uuritakse muid kemikaale kui agrokemikaale, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsioonide sari ning mõõdetakse glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi (s.t tekkinud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguste keskmine) pärast 28 päeva möödumist. Kontsentratsioonide sarja käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonimudelit kasutades, ning arvutatakse  $EC_x$  väärtused (s.t  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ja/või  $EC_{10}$ ). Vt mõisteid.

## 1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on  $\pm 25\%$ ) kontroll- ja katsemullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku vahel, et kontrollproovide suured muutused võivad viia väärate tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui  $\pm 15\%$ .

## 1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.6.1. Seadmed

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforeeritud polüetüleenkilega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasikindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Glükoosi põhjustatud hingamise kindlaksmääramisel on nõutavad inkubeerimissüsteemid ja süsinikdioksiidi tootmise või hapniku tarbimise mõõtmisseadmed. Selliste süsteemide ja seadmete kohta käivad näiteid võib leida kirjandusviidetest (8, 9, 10, 11).

## 1.6.2. Mullaliikide valik ja arv

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

— liivisisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %,

**▼B**

- pH: 5,5–7,5;
  
- orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;
  
- mikroobi biomassi tuleks mõõta (12, 13) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorptsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutada vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

### 1.6.3. Mullaproovide kogumine ja säilitamine

#### 1.6.3.1. Kogumine

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põua- või vettimisperiodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm). Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

#### 1.6.3.2. Säilitamine

Värskest põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproove säilitada pimedas temperatuuril  $4 \pm 2$  °C maksimaalselt kolm kuud. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne igat katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusisaldusest (vt punkti 1.6.2).

**▼B****1.6.4. Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine****1.6.4.1. Eelinkubeerimine**

Kui mullaproove säilitati (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3), on soovitatav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katseks (vt punktid 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

**1.6.4.2. Füüsikalised-keemilised omadused**

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

**1.6.5. Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks**

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veelahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartslüüv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitatav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse sarase veehulgaga ja/või üksnes kvartslüüvaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada ühtlane jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekteerida mulda mitmes kohas).

**1.6.6. Uuritavad kontsentratsioonid**

Kui uuritakse põllukultuuride kaitsevahendeid või muid prognoositavaid arvestuskontsentratsioone omavaid kemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitatavad katsekonsentratsioonid suurimad arvutuskonsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekonsentratsioon olema saadud PEC korrutamisel suurima eeldatava annustamise arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC<sub>x</sub> väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

**▼B**

## 1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitatav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide puhul. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitatav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsitavad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusest, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimatest eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuetuagade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril  $20 \pm 2$  °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suurimast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus  $\pm 5$  %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguseid. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. 28. päeval määratakse kindlaks katse- ja kontrollmullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ja arvutatakse  $EC_x$  väärtused.

**▼B****1.7.2. Mullaproovide võtmine ja analüüs****1.7.2.1. Mullaproovide võtmise ajakava**

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi 0., 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katset pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamist kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali EC<sub>x</sub> väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi algkogustest teatamiseks (12).

**1.7.2.2. Glükoosi põhjustatud hingamiskiiruste mõõtmine**

Iga katseproovi ja kontrollproovi paralleelse proovi glükoosi põhjustatud hingamiskiirus määratakse kindlaks igal proovivõtukorral. Mullaproovidesse segatakse selline glükoosihulk, millest piisab vahetu suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks. Nimetatud mullaproovis suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks vajaliku glükoosi hulga saab kindlaks määrata eelkatses, kasutades glükoosi kontsentratsioonide sarja (14). Liivaste muldade puhul, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,5–1,5 %, piisab tavaliselt 2 000–4 000 mg glükoosist mulla kuivmassi kg kohta. Glükoosi võib jahvatada pulbriks koos puhta kvartsiivaga (10 g liiva mulla kuivmassi kg kohta) ja segada ühtlaselt mullaga.

Glükoosiga parandatud mullaproove inkubeeritakse sobivas hingamiskiiruste mõõtmiseadmes kas pidevalt, kord tunnis või kord kahe tunni jooksul (vt punkti 1.6.1)  $20 \pm 2$  °C juures. Vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapnikku mõõdetakse 12 järjestikusel tunnil ning mõõtmisi tuleks alustada nii ruttu kui võimalik, s.t üks-kaks tundi pärast glükoosiga täiendamist. Mõõdetakse vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku üldkoguseid 12 tunni jooksul ja määratakse keskmised hingamiskiirused.

**2. ANDMED****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Süsiniku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisusaste). Glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi väljendatakse mg süsinikdioksiidina mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikuna mulla kuivmassi kg kohta tunnis. Keskmist süsinikdioksiidi tekkekiirust või keskmist hapniku tarbimiskiirust igas katseproovis võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse katse- ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve.

**▼B**

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver  $EC_x$  väärtuste hindamiseks. Katseproovi glükoosi põhjustatud hingamiskiiruse (s.t mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikku mulla kuivmassi kg kohta tunnis) pärast 28 päeva möödumist võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsiooniväärtused iga katsekontsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse kontsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure  $EC_x$  väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid ( $p = 0,95$ ) arvutatud  $EC_x$  puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (15, 16, 17).

## 2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning hingamiskiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurile eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtuajal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseaine ei oma pikaajalist toimet süsinikdioksiidi tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ja/või  $EC_{10}$  väärtusi.

## 3. ARUANDLUS

### 3.1 KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

- geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);
- kasutusviis (nt põllumaa, mets jne);
- proovivõtu sügavus (cm);
- liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);
- pH (vees);
- orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);
- lämmastikuisaldus (protsenti kuivmassist);
- katioonvahetusvõime (mmol/kg);
- algne mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;
- viide iga parameetri määramismeetodi kohta;
- kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;
- vajaduse korral üksikasjalikud andmed mulla eelinkubeerimise kohta.

**▼ B**

## Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastiksisaldus.

## Katsetingimused:

- üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;
- üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;
- inkubatsioonitemperatuur;
- mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;
- kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);
- paralleelsete proovide arv;
- proovivõtuajad.

## Tulemused:

- hingamiskiiruste mõõtmismeetod ja -seade;
- andmed tabeli kujul, sh süsinikdioksiidi või hapniku üksikud ja keskmised väärtused;
- katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;
- arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;
- glükoosi põhjustatud hingamiskiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral  $EC_{50}$  väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud  $EC_x$  väärtused (s.t  $EC_{25}$  või  $EC_{10}$ ) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

## 4.

**VIITED**

- 1) Eppo (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. Eppo Bulletin 24: 1-16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

**▼ B**

- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- 5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- 6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora”. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
- 8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph Ns 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.
- 9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- 10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77-81.
- 12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- 13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluE von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113-120.
- 15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- 16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- 17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.



**▼B****C.23. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 307 (2002).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod töötati välja kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks mullas. Katsete abil määratakse i) katseaine transformatsiooni kiirus ja ii) selliste transformatsioonisaaduse laad, mida taimed ja mullaorganismid saavad mõjutada, ning nende moodustumis- ja hävimiskiirus. Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse maapinda või mis tõenäoliselt jõuavad mullakeskkonda. Selliste laboriuuringute tulemusi võib samuti kasutada vastavates väliuuringutes kasutatud proovivõtu- ja analüüsiprotokollide koostamisel.

Transformatsiooniteede hindamiseks piisab üldjuhul aeroobsest ja anaeroobsest uuringust ühe pinnasetüübiga (8, 10, 11). Transformatsioonikiirused tuleks kindlaks määrata veel lisaks vähemalt kolmes pinnasetüübis (8, 10).

Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepiti kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD tööruhmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (10). Uuritavad pinnasetüübid peaksid esindama keskkonnatingimusi, kus katseainet kasutatakse või kus vabastamised toimuvad. Näiteks, kemikaale, mis võidakse vabastada subtroopilises kuni troopilises kliimas, tuleks uurida Ferrasoli või Nitosoliga (FAO-süsteem). Töörühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (15). Käesolevas meetodis võetakse samuti arvesse riisi kasvatamisel kasutatavaid pinnaseid.

**1.2. MÕISTED**

**Katseaine** – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

**Transformatsioonisaadused** – kõik katseaine biotilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO<sub>2</sub> ja tooted, mis on seotud jääkides.

**Seotud jäägid** – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi(metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismeetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Sideme olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismeetodi ja täiustatud analüüsitehnikate abil. Tänaseni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonsidemed ning „lõksud“. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (12) 1984. aasta IUPAC muudatus (13).

**Aeroobne transformatsioon** – reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (14).

**▼B**

**Anaeroobne transformatsioon** – reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (14).

**Pinnas** – väikeste (peamiselt mikro)organismide poolt orgaaniliseks muudetav segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, mis hiljem sisaldab kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. Pinnast võib töödelda kahes eri seisundis:

- a) looduspärane, nagu see on aja jooksul arenenud pinnasetüüpide erinevateks iseloomulikeks kihtideks;
- b) häiritud, nagu see on tavaliselt esineb viljeluspõldudel või käesolevas meetodis kasutamiseks kaevatud proovides (14).

**Mineralisatsioon** – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH<sub>4</sub>-ks, CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse <sup>14</sup>C-märgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeerub ning vabaneb sobiv kogus <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (14).

**Poolestusaeg** – t<sub>0,5</sub> on aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu kontsentratsioonist.

**DT<sub>50</sub> (hävimisaeg 50)** – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra; see on erinev poolestusajast t<sub>0,5</sub>, mil transformatsioon ei järgi esimese astme kineetikat.

**DT<sub>75</sub> (hävimisaeg 75)** – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

**DT<sub>90</sub> (hävimisaeg 90)** – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste iseloomustamiseks ja/või identifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

### 1.4. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodit kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (märgistamata või radiomärgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mittelenduvate, veeslahustuvate või vees mittelahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida pinnases käesolevates katsemeetodites.

**▼B**

## 1.5. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või märgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks.  $^{14}\text{C}$ -märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsemale osa(de) külge <sup>(1)</sup>. Katseaine puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne pinnases aeroobset ja anaeroobset transformatsiooni käsitleva katse tegemist peaks olema katseaine kohta kättesaadaval järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (meetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;
- d) n-oktanolli/vee jaotustegur (meetod A.8);
- e) keemiline stabiilsus pimedas (hüdroolüüs) (meetod C.7);
- f)  $\text{pK}_a$ , kui molekulil on kalduvus protoneerumisele või deprotoneerumisele (OECD juhend 112) (16).

Muu vajalik teave võib sisaldada andmeid katseaine mürgisuse kohta mullamikroobide suhtes (katsemeetodid C.21 ja C.22) (16).

Katseaine ja selle transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamismeetodid) peaksid olema kättesaadavad.

## 1.6. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Mullaproove töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse pimedas Erlenmeyer kolbides või möödavoolusüsteemides kontrollitud laboritingimustes (konstantse temperatuuri ning pinnaseniiskuse juures). Pärast sobivaid ajavahemikke ekstraheeritakse mullaproovid ja neid analüüsitakse lähteaine ja transformatsioonisaaduste suhtes. Lenduvad saadused kogutakse samuti analüüsiks sobivate absorptsiooniseadmete abil. Kasutades  $^{14}\text{C}$ -märgistusega materjali, saab mõõta katseaine erinevaid mineralisatsioonikiiruseid eraldunud  $^{14}\text{CO}_2$  kinni püüdes, ning saab määrata ainetaseme, sh pinnases seotud jäägid.

## 1.7. KVALITEEDIKRITERIUMID

## 1.7.1. Saagis

Vähemalt kahe mullaproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta. Saagised katse hilisematelt etappidelt on saadud vastavatelt ainetasemetelt. Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (8) ja 70–110 % märgistamata kemikaalide puhul (3).

<sup>(1)</sup> Näiteks, kui katseaine sisaldab ühte rõngast, on nõutav see märgistada; kui katseaine sisaldab kahte või enamat rõngast, võib vaja minna eraldi uuringuid kummagi märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ja sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

**▼B****1.7.2. Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

Analüüsimeetodi korratavust (v.a alguses tehtud ekstraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduvalanalüüsidest samast pinnasest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsioonisaadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul on analüüsimeetodi avastamislävi (LOD) peaks olema vähemalt  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  mulla-proovi (katseainena) või 1 % kasutatud annusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

**1.7.3. Transformatsioonist saadud andmete täpsus**

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera usaldusväärsuse kohta ning võimaldab arvutada poolestusaegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või  $DT_{50}$  väärtused ja vajaduse korral  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  väärtused.

**1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS****1.8.1. Seadmed ja keemilised reaktiivid**

Inkubatsioonisüsteemid võivad olla staatiliselt suletud süsteemid või sobivad möödavoolusüsteemid (7, 17). Näited mullaproovide inkubatsioonil kasutatava möödavooluseadme ja Erlenmeyeri kolvi kohta on esitatud vastavalt joonistel 1 ja 2. Mõlemat tüüpi inkubatsioonisüsteemidel on eelised ja puudused (7, 17).

Nõutavad on standardsed laboriseadmed, eriti järgmised:

- analüütilised seadmed, näiteks GLC, HPLC, TLC-seadmed, kaasa arvatud radiomärgistatud või märgistamata ainete analüüsimisel kohaldatavad avastamissüsteemid või pööratud isotoopide lahjendusmeetod;
- identifitseerimisel kasutatavad seadmed (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR jne);
- vedelikstsintillaatsioonloendur;
- oksüdeerija radioaktiivsete ainete põletamiseks;
- tsentrifuug;
- ekstraheerimisseade (nt tsentrifuugiküvetid külmeekstraheerimiseks ja Soxhlet' seade pidevekstraheerimiseks püstjahuti all);
- lahuste ja ekstraktide kontsentreerimise seadmed (nt pöördaurusti);
- veevann;
- mehaaniline segamisseade (nt sõtkumismasin, pöörlev segisti).

**▼B**

Kasutatud keemilised reaktiivid, näiteks:

- NaOH, analüütiliselt puhas,  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , või muu sobiv alus (nt KOH, etanoolamiin);
- $\text{H}^2\text{SO}^4$ , analüütiliselt puhas,  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;
- etüleenglükool, analüütiliselt puhas;
- tahked absorptsioonimaterjalid, nt naatronlubi ja poliüuretaanküünlad;
- orgaanilised lahustid, analüütiliselt puhtad, nt atsetoon, metanool jt;
- stsintsillatsioonvedelik.

**1.8.2. Katseaine annustamine**

Mullaproovi lisamiseks või levitamiseks võib katseainet lahustada vees (deioniseeritud või destilleeritud) või vajaduse korral väheses koguses atsetoonis või muudes orgaanilistes lahustites (6), milles katseaine on piisavalt lahustuv ja stabiilne. Valitud lahusti kogusel ei peaks siiski olema olulist mõju mulla mikroobsele aktiivsusele (vt punkte 1.5 ja 1.9.2–1.9.3). Selliste mikrobioloogilist aktiivsust inhibeerivate lahustite nagu kloroform, diklorometaan ja muud halogeenitud lahustid kasutamist tuleks vältida.

Katseainet võib samuti lisada tahkel kujul, nt segatud kvartsliiduga (6) või mullaproovide väikeste osaproovidena, mida on õhkuivatatud ja steriliseeritud. Kui katseainet lisatakse lahusti abil, tuleks lasta lahustil aurustuda enne katseainet sisaldava osaproovi lisamist algupärasesse ebasteriilsesse mullaproovi.

Üldkemikaalide puhul, mis sisenevad mulda üldiselt reoveesetete kaudu või põllumajanduslikul kasutamisel, tuleks katseainet esmalt lisada reovette, mida seejärel annustatakse mullaproovi (vt punkte 1.9.2 ja 1.9.3).

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata. Nt nõrgalt lahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

**1.8.3. Pinnased****1.8.3.1. Pinnase valik**

Transformatsioonitee kindlaksmääramisel võib kasutada representatiivset pinnast; soovitatav pinnasetüüp on saviliiv või liivsavi või savi või savine liiv (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), mille pH on 5,5–8,0, orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,5–2,5 % ja mikroobi biomass on vähemalt 1 % orgaanilise süsiniku koguhulgast (10).

Transformatsioonitee määramisel tuleks uurida vähemalt kolme representatiivset pinnast. Pinnaste orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, savi sisaldus ja mikroobi biomass on erinevad (10).

## ▼B

Kõiki pinnaseid tuleks iseloomustada vähemalt nende tekstuuri (liiva, aluerüdi, savi (protsentides)) (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), pH, kationvahetusvõime, orgaanilise süsiniku, lasuvustiheuse, veeläbilaskvusvõime<sup>(1)</sup> ja mikroobi biomassi poolest (üksnes aeroobsetes uuringutes). Tulemuste tõlgendamisel võib osutada kasulikuks lisateave pinnaseomaduste kohta. Pinnaseomaduste kindlaksmääramiseks saab kasutada viidetes (19, 20, 21, 22, 23) soovitatud meetodeid. Mikroobi biomass tuleks määrata substraadi indutseeritud hingamise (SIR) meetodi (25, 26) või alternatiivsete meetodite abil (20).

### 1.8.3.2. Mullaproovide kogumine, käsitlemine ja säilitamine

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Kui pinnaseid on juba töödeldud katseainega või selle struktuursete analoogidega viimase nelja aasta jooksul, ei tuleks neid kasutada transformatsiooni uuringutel (10, 15).

Muld peaks olema värskest kogutud põllult (A-horisondilt või üleemisest 20 cm kihist), ning selle veesisaldus peaks olema selline, et hõlbustaks sõelumist. Muude muldade kui riisipõldude muldade puhul tuleks vältida proovide võtmist pikkade (> 30 päeva) põua-, külmumis- või üleujutusperioodide jooksul või vahetult pärast neid (14). Proove tuleks transportida nii, et muutused mulla veesisalduses oleksid minimaalsed ja neid tuleks hoida pimedas võimalikult vaba õhujuurdepääsuga. Nõrgalt seotud polüetüleenkott on üldiselt selleks piisav.

Mulda tuleks töödelda nii ruttu kui võimalik pärast proovivõtmist. Taimed, suurem mullafauna ja kivid tuleks eemaldada enne mulla sõelumist läbi 2 mm sõela, mis eemaldab väikesed kivid, fauna ja taimejäätmek. Tuleks vältida mulla ulatuslikku kuivatamist ja purustamist enne sõelumist (15).

Kui põllult proovide võtmine on raske talvel (pinnas on külmunud või kaetud lumekihtidega), võib proove võtta mullapartiist, mida säilitatakse kasvuhoones taimkatte all (nt rohu või rohu-ristikheina segu all). Väga on eelistatud uuringud värskest põllult kogutud muldadega, kuid kui kogutud ja töödeldud mulda tuleb säilitada enne uuringu algust, peavad säilitamistingimused olema piisavad ja üksnes piiratud aja jooksul ( $4 \pm 2$  °C maksimaalselt kolm kuud), et säiliks mikroobne aktiivsus<sup>(2)</sup>. Üksikasjalikud juhendid selliste mullaproovide kogumiseks, käsitlemiseks ja säilitamiseks, mida kasutatakse biotransformatsioonikatsetes, on toodud viidetes (8, 10, 15, 26, 27).

<sup>(1)</sup> Pinnase veeläbilaskvusvõimet saab mõõta väliveemahutavusena, veemahutavuse või imirõhuna (pF). Selgitused on liites 1. Katseprotokollis tuleks edastada, kas pinnase veeläbilaskvusvõime ja lasuvustiheus määrati kindlaks looduspärastes väliproovides või häiritud (töödeldud) proovides.

<sup>(2)</sup> Viimased uurimistulemused viitavad sellele, et parasvöötmes kogutud mullaproove saab samuti säilitada  $-20$  °C juures üle kolme kuu (28, 29) mikroobide aktiivsust oluliselt häirimata.

**▼B**

Enne töödeldud pinnase kasutamist katses, tuleks seda eelinkubeerida, et lasta seemnetel idaneda ja saaks need emaldada ning taastada mikroobide ainevahetuse tasakaal pärast proovivõtu- ja säilitamistingimuste muutumist inkubatsioonitingimusteks. 2–28 päeva vahel toimuv eelinkubeerimine ligikaudu samadel temperatuuri ja niiskuse tingimustel nagu tegelikus katseski on üldiselt piisav (15). Säilitamis- ja eelinkubeerimisperioodid kokku ei tohiks ületada kolme kuud.

## 1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**1.9.1.1. *Katsetemperatuur*

Kogu katseperioodi jooksul tuleks mullaproovid inkubeerida pimedas konstantsel temperatuuril, mis vastab kliimatingimustele, kus katseainet kasutati või kus toimus vabastamine. Kõikide parasvöötmes pinnasesse jõudvate katseainete puhul on soovitatav temperatuur  $20 \pm 2$  °C. Temperatuuri tuleks jälgida.

Kemikaalide puhul, mida kasutatakse või mis vabanevad külmemas kliimas (nt põhjamaades, sügis/talveperioodil), tuleks inkubeerida lisa- proove, kuid madalamal temperatuuril (nt  $10 \pm 2$  °C).

1.9.1.2. *Niiskusesisaldus*

Aeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete puhul tuleks mulla niiskusesisaldust<sup>(1)</sup> reguleerida ja säilitada pF vahemikus 2,0–2,5 (3). Mulla niiskusesisaldust väljendatakse veemassina kuiva mulla massi kohta ja seda tuleks korrapäraselt kontrollida (nt kahenädalaste intervallide tagant), kaaludes inkubatsioonikolbe ja veekadusid, mida täiendatakse vee lisamise teel (eelistatavalt steriilne filtreeritud kraanivesi). Tuleks püüda vältida või vähendada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste kadu lendumise ja/või fotolagundamise (kui see juhtub) kaudu vedeliku lisamise käigus.

Anaeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete käigus küllastatakse pinnast veega üleujutamise teel.

1.9.1.3. *Aeroobsed inkubatsioonitingimused*

Möödavoolumüsteemides säilitatakse aeroobsed tingimused vahelduva loputamise või pidevalt niisutatud õhuga ventileerimise teel. Erlensmeyereri kolbides tagatakse õhuvahetus difusiooni abil.

1.9.1.4. *Steriilsed aeroobsed tingimused*

Katseaine abiootilise transformatsiooni olulisuse kohta käiva teabe saamiseks võib mullaproovid steriliseerida (steriliseerimismeetodid on viidetes 16 ja 29), töödelda steriilse katseainega (nt lahuse lisamine läbi steriilse filtri) ja tuulutada niisutatud steriilse õhuga, nagu on kirjeldatud punktis 1.9.1.3. Riisipõldude mullaproovide puhul tuleks pinnast ja vett steriliseerida ja inkubeerida tuleks vastavalt punktile 1.9.1.6.

<sup>(1)</sup> Mullaproov ei tohiks kunagi olla liiga märg või liiga kuiv, et säiliks mulla mikrofloora piisav ohutus ja toitumine. Soovituslikud niiskusesisaldused optimaalseks mikroobi kasvuks on 40–60 % veemahutavusest (WHC) ja 0,1–0,33 baari (6). Viimane vahemik on sama, mis 2,0–2,5 pF-vahemik. Erinevatele mullatüüpidele omased niiskusesisaldused on toodud 2. liites.

**▼ B**1.9.1.5. *Aneroobsed inkubatsioonitingimused*

Anaeroobsete tingimuste loomiseks ja säilitamiseks katseainega töödeldud ja aeroobsetes tingimustes 30 päeva või ühe poolestusaja jooksul või  $DT_{50}$  ajal (olenevalt sellest, milleks kulub vähem aega) inkubeeritud pinnast küllastatakse seejärel veega (1–3 cm veekiht) ja inkubatsioonüsteemi loputatakse inertse gaasiga (nt lämmastik või argoon) <sup>(1)</sup>. (2) Katsesüsteem peab võimaldama järgmisi mõõtmisi: pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali mõõtmised, ja sisaldama lenduvate saaduste püüdmise seadmeid. Erlenmeyeri kolbi-dest koosnev süsteem tuleb sulgeda, et vältida õhu sisenemist difusiooni teel.

1.9.1.6. *Niiske põllu mullaproovide inkubatsioonitingimused*

Riisipõllu mullaproovide transformatsiooni uurimisel ujutatakse pinnas üle ligikaudu 1–5 cm veekihiga ja katseainet annustatakse veefaasi (9). Soovitav pinnasesügavus on vähemalt 5 cm. Süsteemi õhutatakse samamoodi nagu aeroobsetel tingimustel. Veekihi pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali tuleks jälgida ja sellest teatada. Vähemalt kahepäevane eelinkubatsiooniperiood on vajalik enne transformatsiooniuringutega alustamist (vt punkt 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Katse kestus*

Kiirust ja transformatsiooniteed käsitlevad uuringud ei tohiks tavaliselt ületada 120 päeva <sup>(2)</sup> (3, 6, 8), kuna seejärel eeldatakse, et väheneb mulla mikroobne aktiivsus tehislaborisüsteemis, kus ei täiene looduslikult toitainetagavarad. Kui katseaine vähenemist ja peamiste transformatsioonisaaduste teket ja vähenemist on vaja kirjeldada, tuleks uuringuid jätkata pikema aja jooksul (nt 6 või 12 kuud) (8). Pikema inkubatsiooniperioodi tuleks põhjendada katseprotokollis ja sellele tuleks lisada biomassi mõõtmised nimetatud perioodide kestel ja lõpus.

1.9.2. **Katse käik**

Ligikaudu 50–200 g mulda (kuivmassina) asetatakse iga inkubatsioonikolvi põhja (vt 3. liites jooniseid 1 ja 2) ning mulda töödeldakse katseainega ühe punktis 1.8.2 kirjeldatud meetodi abil. Kui orgaanilisi lahusteid kasutatakse katseaine annustamiseks, tuleks need eemaldada mullast aurustamise teel. Seejärel segatakse muld hoolikalt spaatliga ja/või kolvi raputamise teel. Kui uuring tehakse niiskete põldude tingimustes, tuleks mulda ja vett hoolikalt segada pärast katseaine lisamist. Väikeseid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Alternatiivne meetod on toodud allpool.

<sup>(1)</sup> Aeroobsed tingimused domineerivad pindmises mullakihis ja isegi aluspõhjas, nagu on näidatud ELi rahastatud uurimisprojekti (K. Takagi *et al.* (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internal. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol, 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden). Anaeroobsed tingimused võivad esineda vaid juhuslikult pinnaste üleujutuste käigus pärast tugevaid sademeid või siis, kui on loodud niiske põllumajanduse tingimused riisipõldudel.

<sup>(2)</sup> Aeroobsed uuringud tuleks lõpetada palju varem kui 120 päeva, tingimisel et selgelt on selleks ajaks jõutud lõpliku transformatsiooniteeni ja lõpliku mineralisatsioonini. Katse lõpetamine on võimalik pärast 120 päeva või siis, kui vähemalt 90 % katseainest transformeeritakse, kuid tekkis ainult 5 % CO<sub>2</sub>.



## ▼B

Annustatav kogus peaks vastama põllukultuuride kaitsevahendite kasutusjuhendites soovitatud suurimale annusele ja ühtset levimist sobivasse sügavusse (nt ülemisse 10 cm mullakihti<sup>(1)</sup>). Näiteks, kemikaalide puhul, mis levivad taimede lehtedesse või pinnasesse ilma, et need tungiksid taimedesse, sobiv sügavus selle arvutamiseks, kui palju kemikaali tuleks igasse kolbi lisada, on 2,5 cm. Pinnasesse tunginud kemikaalide puhul on sobiv sügavus kasutusjuhendis täpsustatud tungimissügavus. Üldkemikaalide puhul tuleks hinnata annustamist kõige sobivama pinnasesse tungimise tee põhjal, näiteks, kui peamine pinnasesse tungimise tee on läbi reoveesetete, tuleks kemikaali annustada reovette kontsentratsioonile, mis vastab oodatud reovee kontsentratsioonile, ja pinnasesse lisatud reovee hulk peaks vastama tavalisele põllumajanduses kasutatavate pinnaste reovee määrale. Kui see kontsentratsioon ei ole piisavalt suur peamiste transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks, võib olla abiks erinevate suuremaid kontsentratsioone sisaldavate mullaproovide inkubeerimine, kuid tuleks vältida liiga suuri annusmäärasid, mis võivad mõjutada mulla mikroobide funktsioone (vt punkte 1.5 ja 1.8.2).

Alternatiivselt saab katseainega töödelda suuremat mullakogust (s.t 1–2 kg), seda hoolikalt segades sobiva segamisseadme abil ja seejärel asetades need väikeste, 50–200 g osadena inkubatsioonikolbidesse (nt proovijaoturite abil) Väikesteid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Sellist protseduuri eelistatakse, kuna see võimaldab ühtlasemalt katseainet pinnasesse jagada.

Samuti inkubeeritakse töötlemata mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) nagu katseainega töödeldud proove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringu käigus ja lõpus.

Kui katseainet lisatakse pinnasesse lahjendatuna orgaanilis(t)es lahusti(te)s, inkubeeritakse sama koguse lahusti(te)ga töödeldud mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) kui katseainega töödeldud mullaproove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringute alguses, kestel ja lõpus lahusti(te) mõjude kontrollimiseks mikroobi biomassi suhtes.

Töödeldud mullaproove sisaldavad kolvid kas kinnitatakse mööda-voolustusüsteemi, mida on kirjeldatud joonisel 1, või suletakse absorptsioonikoloni, mis on toodud joonisel 2 (vt 3. liidet).

<sup>(1)</sup> Järgmise võrrandi abil arvutatakse lähtekontsentratsioon pindala põhjal:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg}/\text{kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^6 [\text{mg}/\text{kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

$C_{\text{soil}}$  = lähtekontsentratsioon mullaproovis [ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]

$A$  = annustamine [ $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ ];  $l$  = mullakihi paksus uuritavas keskkonnas [ $\text{m}$ ];  $d$  = kuivlasuvustihedus [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ].

Resikareegel on, et annustamisel  $1 \text{ kg ha}^{-1}$  saadakse pinnase kontsentratsiooniks kigikaudu  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  kihis (oletades, et lasuvustihedus on  $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

**▼B****1.9.3. Proovide võtmine ja mõõtmine**

Paralleelsed inkubatsioonikolvid eemaldatakse sobiva ajavahemiku tagant ja mullaproovid ekstraheeritakse erineva polaarsusega lahustitega ning analüüsitakse katseaine ja/või transformatsioonisaaduste osas. Hästi väljatöötatud uuringus on piisavalt kolbe, et igal proovivõtukorral kasutatakse kahte kolbi. Samamoodi eemaldatakse absorptsioonilahused või tahked absorptsioonimaterjalid erinevate ajavahemike tagant (seitsmepäevane intervallid esimese kuu jooksul ja pärast ühe kuu möödumist 17päevased intervallid) iga mullaproovi inkubatsiooni kestel ja lõpus ning analüüsitakse lenduvate saaduste osas. Kohe katseaine manustamise järel (0-päeva proov) võetud mullaproovile lisaks tuleks katsetesse lisada vähemalt viis erinevat proovivõtu kohta. Ajavahemikud tuleks valida nii, et katseaine vähenemisaegu ning transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemisaegu saaks määrata (nt 0, 1, 3, 7 päeva; 2, 3 nädalat; 1, 2, 3 kuud jne).

Kasutades <sup>14</sup>C-märgistusega katseainet, ekstraheerimata radioaktiivsete ainete määr määratakse põlemise teel ja ainetase arvutatakse iga proovivõtuaja kohta.

Anaeroobsete ja niiske põllu proovide korral mulla- ja veefaase ning katseaine ja transformatsioonisaaduseid analüüsitakse või eraldatakse filtreerimise või tsentrifuugimise teel enne ekstraheerimist ja analüüsi.

**1.9.4. Valikkatsed**

Aeroobsetes, mittesteriilsetes uuringutes, milles kasutatakse muid temperatuure ja mullaniiskust, võib hinnata pinnase temperatuuri ja niiskuse mõju katseaine ja/või selle transformatsioonisaaduste transformatsioonikiirust pinnases.

Ekstraheerimata radioaktiivseid aineid võib lisaks proovida kirjeldada näiteks ülikriitilisel vedeliku ekstraheerimisel.

**2. ANDMED****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Katseaine, transformatsioonisaaduste, lenduvate ainete (vaid protsendina) ja ekstraheerimata ainete kogused tuleks esitada protsendina lähtekontsentratsioonist ja vajaduse korral  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  mullaproove (tahke kuivmass) igas proovivõtuvahemikus. Ainetase tuleks esitada protsendina lisatud lähtekontsentratsioonist igas proovivõtuvahemikus. Katseaine graafiline esitamine aja funktsioonina aitab hinnata transformatsiooni poolestusaega või  $\text{DT}_{50}$ . Peamised transformatsioonisaadused tuleks identifitseerida ja nende kontsentratsioonid tuleks esitada aja funktsioonina, et näidata nende tekke- ja vähenemiskiirust. Peamised transformatsioonisaadused on mis tahes saadused, mida esineb igal ajahetkel uuringu käigus  $\geq 10$  % katseaine annusest.

Kinnipüütud lenduvad ained annavad märke selle kohta, et katseaine ja selle transformatsioonisaaduste võimest pinnasest lenduda.

**▼B**

Sobivate kineetilise mudeli kohaste arvutuste põhjal peaks saama täpsemalt määrata poolestusajad või  $DT_{50}$  väärtused ja vajaduse korral  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  väärtused. Poolestusajad ja  $DT_{50}$  väärtused tuleks teatada koos kasutatava mudeli, kineetika astme ja määramiskoeffitsiendi ( $r^2$ ) kirjeldusega. Esimese astme kineetika on soovitud, välja arvatud juhul, kui  $r^2 < 0,7$ . Vajaduse korral tuleks arvutused teha peamiste transformatsioonisaaduste kohta. Sobivate mudelite näiteid kirjeldatakse viidetes 31–35.

Uurides erinevatel temperatuuridel kiiruseid, tuleks kirjeldada transformatsioonikiirust temperatuuri funktsioonina katsetemperatuuri vahemikus, kasutades Arrheniuse võrrandit kujul:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

kus  $\ln A$  ja  $B$  on kõige sobivama joone lõikepunktist ja tõusust saadavad regressioonkonstandid, mis saadakse  $\ln k$  ja  $1/T$  lineaarse regressioonanalüüsi tulemusena,  $k$  on kiirusekonstant temperatuuril  $T$  ja  $T$  on temperatuur Kelvini järgi. Kui transformatsiooni reguleerib mikroobide tegevus, tuleks võtta arvesse piiratud temperatuurivahemikku, milles Arrheniuse võrrand kehtib.

## 2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Kuigi uuringuid tehakse tehislaboritingimustes, saab tulemuste põhjal hinnata katseaine transformatsioonikiirust ja samuti transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemiskiirust välitingimustes (36, 37).

Katseaine transformatsioonitee uuring annab teavet selle kohta, kuidas lisatud ainet struktuur pinnases muutub keemiliste ja mikroobsete reaktsioonide abil.

## 3. ARUANDLUS

### 3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (tuues ära märgi/märkide asukohta, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused (vt punkti 1.5);

— katseaine puhtus (lisandid);

— märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja spetsiifiline aktiivsus (vajaduse korral).

Võrdlusained:

— selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

Katsepinnased:

— üksikasjalikud andmed kogumiskoha kohta;

— mullaproovide võtmise kuupäev ja protseduur;

**▼B**

— pinnase omadused, nt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, tekstuur (liiva-, aleuriidi-, saviprotsent), kationvahetusvõime, lasuvustihedus, veeläbilaskvusvõime ja mikroobi biomass;

— mullaproovide säilitamise kestus ja tingimused (kui need säilitatakse).

## Katsetingimused:

— uuringute tegemise kuupäevad;

— lisatud katseaine kogus;

— kasutatud lahustid ja katseaine lisamise meetod;

— töödeldud mullaproovide lähtemass ja nende mass analüüsi igal proovivõtukorral;

— kasutatud inkubatsioonüsteemi kirjeldus;

— õhu voolukiirus (üksnes möödavoolussüsteemides);

— katsesüsteemi temperatuur;

— mullaproovide niiskusesisaldus inkubatsiooni ajal;

— mikroobi biomass aeroobse uuringu alguses, kestel ja lõpus;

— pH, hapniku kontsentratsioon ja redokspotentsiaal anaeroobsete ja niiske põllumaa uuringute alguses, kestel ja lõpus;

— ekstraheerimismeetod;

— katseaine ja peamiste transformatsioonisaaduste kvantifitseerimis- ja identifitseerimismeetodid mullaproovides ning ja absorptsioonimaterjalides;

— paralleelproovide arv ja kontrollproovide arv.

## Tulemused:

— mikroobide tegevuse määramistulemus;

— kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;

— saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);

— tulemused tabeli kujul, väljendatuna protsendina lähteannusest ja vajaduse korral  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  mullaproovi (kuivmass);

— ainetase uuringute kestel ja lõpus;

— pinnase ekstraheerimata (seotud) radioaktiivsuse või jääkide iseloomustamine;

— vabanenud  $\text{CO}_2$  ja muude lenduvate ühendite kvantifitseerimine;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste kontsentratsioonid mullaproovis esitatud aja funktsioonina;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste poollestusaeg või  $\text{DT}_{50}$ ,  $\text{DT}_{75}$  ja  $\text{DT}_{90}$  väärtused usaldusvahemikes;

**▼B**

- hinnang abiootilise lagunemise kiirusele steriilsetes tingimustes;
- hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste transformatsioonikineetika kohta;
- vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;
- tulemuste arutelu ja tõlgendamine;
- töötlemata tulemused (s.t proovide kromatogrammid, transformatsioonikiirust käsitlevad arvutused ja transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks kasutatavad vahendid).

4. **VIITED**

- 1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- 6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
- 7) ISO 14239 (1997). Soil Quality- Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- 10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- 11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.
- 12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- 13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- 14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

**▼ B**

- 15) ISO 10381-6 (199 3). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 16) Annex V to Dir. 67/548/EEC.
- 17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.
- 18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 3 3, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- 19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- 20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- 21) ISO Standard Compendium Environment (1994). *Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- 22) Muckenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- 23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- 24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215–221.
- 25) ISO 14240-1 and 2 (1997). *Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method*.
- 26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.
- 27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16 Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105–120.
- 28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59–63 (SETAC-Europe).
- 29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjudahl-Svensson K., Stenstrom J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68–69 (SETAC-Europe).
- 30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197–200.
- 31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Fesdegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141–146.

**▼B**

- 32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.
- 33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides”. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.
- 34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.
- 35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.
- 36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.
- 37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.



## 1. liide

VEEPINEVUS, VÄLIVEEMAHUTAVUS (FC) JA VEEMAHUTAVUS (WHC) <sup>(1)</sup>

Veesamba kõrgus (cm)	pF <sup>(a)</sup>	baar <sup>(b)</sup>	Märkused
10 <sup>7</sup>	7	10 <sup>4</sup>	Kuiv pinnas
1,6 · 10 <sup>4</sup>	4,2	16	Närbumispiir
10 <sup>4</sup>	4	10	
10 <sup>3</sup>	3	1	
6 · 10 <sup>2</sup>	2,8	0,6	
3,3 · 10 <sup>2</sup>	2,5	0,33 <sup>(c)</sup>	Väliveemahutavuse ala <sup>(d)</sup>
10 <sup>2</sup>	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (hinnang)
1	0	0,001	Veega küllastatud pinnas

<sup>(a)</sup> pF = veesamba kõrguse (cm) logaritm.

<sup>(b)</sup> 1 baari = 10<sup>5</sup> Pa.

<sup>(c)</sup> Vastab ligikaudsele 10 %lisele veesisaldusele liivas, 35 %lisele mudas ja 45 %lisele savis.

<sup>(d)</sup> Väliveemahutavus ei ole konstantne, vaid see varieerub vastavalt mulla tüübile pF 1,5 ja 2,5 vahel.

*Veepinevust* mõõdetakse veesamba kõrgusena (cm) või baarides. Imirõhu laia ulatuse tõttu väljendatakse seda üksnes pF väärtusena, mis vastab veesamba logaritmile.

*Väliveemahutavus* on määratletud veehulgana, mida võib säilitada atmosfääri-rõhus looduspinnases 2 päeva pärast pikemat vihmaperioodi või pärast piisavat kastmist. See määratakse looduspärasel pinnasel *in situ* põllul. Mõõtmist seega ei kohaldata pinnase häiritud laboriproovides. Häiritud mullaproovides määratud FC väärtused võivad esindada suuri süsteemseid muutusi.

*Veemahutavus* (WHC) määratakse kindlaks laboris looduspärasel või häiritud mullas, küllastades mullasammast veega kapillaartranspordi teel. See on eriti kasulik häiritud mullaproovide teel ja võib olla kuni 30 % suurem kui väliveemahutavus <sup>(239)</sup>. Samuti võib olla seda katseliselt kergem määrata kui usaldusväärsed FC-väärtusi.

Märkused

<sup>(1)</sup> Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.



▼B

## 2. liide

**ERINEVATEST RIIKIDEST ERINEVATEST MULLATÜÜPIDEST VÕETUD  
MULLAPROOVIDE NIISKUSESISALDUS (g vett 100 g kuiva pinnase kohta)**

Mullatüüp	Riik	Niiskusesisaldus		
		WHC <sup>(1)</sup>	pF = 1,8	pF = 2,5
Liiv	Saksamaa	28,7	8,8	3,9
Mudane liiv	Saksamaa	50,4	17,9	12,1
Mudane liiv	Šveits	44,0	35,3	9,2
Aleuriitne muda	Šveits	72,8	56,6	28,4
Savimuda	Brasiilia	69,7	38,4	27,3
Savimuda	Jaapan	74,4	57,8	31,4
Liivane muda	Jaapan	82,4	59,2	36,0
Aleuriitne muda	Ameerika Ühendriigid	47,2	33,2	18,8
Liivane muda	Ameerika Ühendriigid	40,4	25,2	13,3

<sup>(1)</sup> Veemahutavus.

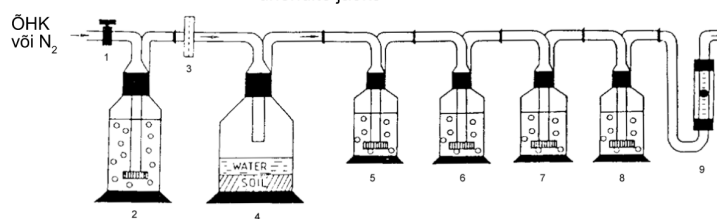
▼B

## 3. liide

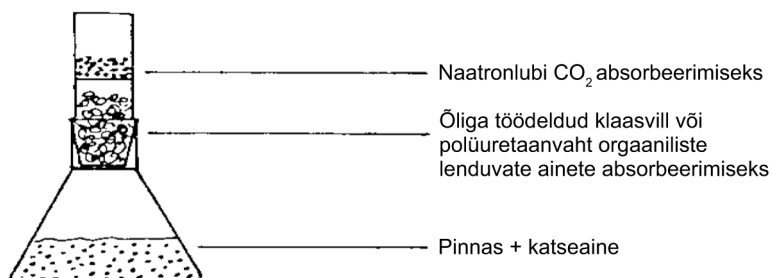
## Joonis 1

Näide möödavooluseadme, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>

- |  |  |  |
|--|--|--|
| 1: nõelventiil   | 4: pinnase ainevahetuse kolb (veega küllastatud üksnes anaeroobsetes ja niiske põllumaa tingimustes) | 7, 8: naatriumhüdroksiidilõks CO <sub>2</sub> ja muude happeliste lenduvate ainete jaoks |
| 2: vett sisaldavad gaasipesupudelid                                  | 5: etüleenglükoolilõks orgaaniliste lenduvate ühendite jaoks   | 9: voolumõõtur.  |
| 3: ultramembraan (üksnes steriilsed tingimused), poori suurus 0.2 µm | 6: väävelhappelõks leeliseliste lenduvate ühendite jaoks   |  |



## Joonis 2

Näide Erlenmeyeri kolvist, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

<sup>(2)</sup> Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

<sup>(3)</sup> Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallyl im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

**▼B****C.24. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 308 (2002).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Kemikaalid võivad pääseda madalasse või sügavasse pinnavette näiteks otse annustatuna, õhku pihustatuna, äravoolu või kuivendamise kaudu, jäätmete kõrvaldamisel, tööstusliku, kodumajapidamise või põllumajandusliku heitveena ja atmosfäärist väljasadenemisel. Käesolev katsemetod kirjeldab laborimeetodit, mida kasutatakse orgaaniliste kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks põhjasettes. See põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6). Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepiti kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (7). Töörühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (8). Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse vette või mis tõenäoliselt jõuavad veekeskkonda eespool kirjeldatud viisil.

Loodusliku põhjasette tingimused on tihti aeroobsed ülemises veefaasis. Sette pinnakiht võib olla kas aeroobne või anaeroobne, kuigi sügavam sete on tavaliselt anaeroobne. Kõikide nende võimaluste hõlmamiseks kirjeldatakse käesolevas dokumendis nii aeroobseid kui ka anaeroobseid katseid. Aeroobne katse simuleerib aeroobset veesammast, mille all on aeroobne settekiht ja mille all omakorda anaeroobne gradient. Anaeroobne katse simuleerib täielikult anaeroobset põhjasetet. Kui asjaolud viitavad sellele, et on vaja oluliselt kõrvale kalduda neist soovitustest, nt kasutades puutumata sette tuuma või setteid, mis võivad olla kokku puutunud katseainetega, on selleks kättesaadavad muud meetodid (9).

**1.2. MÕISTED**

SI-ühikuid tuleks kasutada igal juhul.

**Katseaine** – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

**Transformatsioonisaadused** – kõik katseaine biotilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO<sub>2</sub> ja tooted, mis on seotud jääkides.

**Seotud jäägid** – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi(metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Seose olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismetodi ja täiustatud analüüsitehnikate abil. Tänašeni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonidemed ning „löksud”. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (10) (1984. aasta IUPACi muudatus (11)).

**▼B**

**Aeroobne transformatsioon** – (oksüdeeriv): reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (12).

**Anaeroobne transformatsioon** – (reduktseeriv): reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (12).

**Looduslikud veed** – pinnaveed, mis on saadud tiikides, jõgedes, ojadest jm.

**Sete** – segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, millest viimased sisaldavad kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. See sadestub looduslikku vette, millega ta moodustab piirkähi.

**Mineralisatsioon** – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH<sub>4</sub>-ks, CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse radiomärgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeeritakse ning vabaneb sobiv kogus <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> või <sup>14</sup>CH<sub>4</sub>.

**Poolestusaeg**, t<sub>0,5</sub> – aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu lähtekontsentratsioonist.

**DT<sub>50</sub> (hävimisaeg 50)** – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra.

**DT<sub>75</sub> (hävimisaeg 75)** – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

**DT<sub>90</sub> (hävimisaeg 90)** – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

### 1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks ja/või kvantifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

### 1.4. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või isotoopmärgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks, kuigi eelistatakse märgistatud materjali. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks. <sup>14</sup>C-märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsema(te) osa(de) külge<sup>(1)</sup>. Katseaine keemiline ja/või radiokeemiline puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne katse sooritamist peaks katseaine kohta olema järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (meetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;

<sup>(1)</sup> Näiteks, kui aine sisaldab ühte rõngast, tuleb see rõngas märgistada. Kui katseaine sisaldab kahte või enamat rõngast, on vaja eraldi katseid teha, et hinnata iga märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ning sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

**▼B**

- d) n-oktanooli/vee jaotustegur (meetod A.8);
- e) adsorptsioonikoefitsient ( $K_d$ ,  $K_f$  või  $K_{oc}$  vajaduse korral) (meetod C.18);
- f) hüdrolüüs (meetod C.7);
- g) dissotsiatsioonikonstant ( $pK_a$ ) (OECD juhend 112) (13);
- h) katseaine keemiline struktuur ja isotoopmärgistus(t)e asukoht, kui need esinevad.

*Märkus.* Tuleks märkida temperatuur, mille juures mõõtmisi tehakse.

Muu kasuliku teabe hulka võivad kuuluda andmed katseaine mikroorganismidele mõjuva mürgisuse kohta, andmed kiire ja/või inherentse biolagundatavuse kohta ning andmed aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni kohta pinnases.

Katseaine ja selle vees ja settes olevate transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamismeetodid) peaksid olema kättesaadavad (vt punkti 1.7.2).

#### 1.5. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Käesolevas katses kirjeldatud meetod kasutab aeroobseid ja anaeroobseid põhjaseteid (vt 1. liidet), mis võimaldavad:

- i) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist põhjasettes;
- ii) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist settes;
- iii) katseaine ja/või transformatsioonisaaduste mineralisatsioonikiiruse mõõtmist (kui kasutatakse  $^{14}\text{C}$ -märgistusega katseainet);
- iv) transformatsioonisaaduste identifitseerimine ja kvantifitseerimine vee- ja settefaasides, sh ainetase (kui kasutatakse märgistatud katseainet);
- v) katseaine ja selle transformatsioonisaaduste jaotamise mõõtmine kahe faasi vahel inkubatsiooni ajal pimedas (et vältida, näiteks, vetikavohangut) konstantsel temperatuuril. Poolestusajad,  $DT_{50}$ ,  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  väärtused määratakse, kui andmed seda lubavad, kuid neid ei tohiks ekstrapoleerida pikalt üle katseperioodi (vt punkti 1.2).

Vähemalt kaks setet ja nendega seotud veed on nõutavad nii aeroobseks kui anaeroobseks katseks (7). Siiski võib esineda olukordi, kui tuleks kasutada rohkem kui kahte põhjasetet, näiteks, kemikaalide puhul, mis võivad esineda magevees ja/või merekeskkonnas.

**▼B**

## 1.6. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodit kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (mürgistamata või mürgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mittelenduvate, veeslahustuvate või vees halvasti lahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida vees ja/või settes käesolevates katsemeetodites.

Meetodit on kohaldatud nii palju, et uurida kemikaalide transformatsiooni magevees ja setetes, kuid põhimõtteliselt võib seda kohaldada ka suudmealas ja merekeskkonnas. See ei sobi volava vee (nt jõed) või avamere tingimuste simuleerimiseks.

## 1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

## 1.7.1. Saagis

Vähemalt kahe vee- ja setteproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta. Saagised katse hilisematelt etappidelt on saadud vastavatelt ainetasemetelt (kui kasutatakse mürgistatud materjali). Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % mürgistatud kemikaalide puhul (6) ja 70–110 % mürgistamata kemikaalide puhul.

## 1.7.2. Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus

Analüüsimeetodi korratavust (v.a alguses tehtud ekstraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduvanalüüsidest samast veest või settest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsioonisaadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul peaks analüüsimeetodi avastamislävi (LOD) olema vähemalt  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  vee- või setteproovina (katseainena) või 1 % kasutatud lähteannusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

## 1.7.3. Transformatsioonist saadud andmete täpsus

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera täpsuse kohta ning võimaldab arvutada poolestusaegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või  $DT_{50}$  väärtused ja vajaduse korral  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  väärtused.

## 1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.8.1. Katsesüsteem ja -seadmed

Katse tuleks teha klaasmahutites (nt pudelid, tsentrifuugiküvetid), välja arvatud juhul, kui esialgne teave (nt (n-oktanooli-vee jaotustegur, sorptsioonandmed jne) viitab sellele, et katseaine võib kinnituda klaasile, mistõttu võiks kaaluda alternatiivse materjali kasutamist (nt Teflon®). Kui on teada, et katseaine kinnitub klaasile, võib olla võimalik leevendada seda probleemi, kasutades ühte või mitut järgmistest meetoditest:

**▼B**

- määrata klaasile kinnitunud katseaine ja transformatsioonisaaduste mass;
- pesta kõik klaasnõud lahustiga katse lõpus;
- kasutada preparaate (vt ka punkti 1.9.2);
- kasutada katseaine süsteemi lisamisel kaaslahusti suurenenud kogust; kui kasutatakse kaaslahustit, peaks see olema selline, mis ei solvolüüsi katseainet.

Tüüpilise katseseadme näited, s.t gaasimöödavoolu- ja biomeetersüsteemid, on toodud vastavalt 2. ja 3. liites (14). Muid kasulikke inkubatsioonisüsteeme on kirjeldatud viites 15. Katseadme ülesehitus peaks olema selline, et see võimaldab õhu või lämmastiku vahetust ning lenduvate ainete püüdmist. Seadme mõõdud peaksid vastama katsetingimustele (vt 1.9.1). Ventilatsioon tagatakse kas kerge mullitamise või viies õhu või lämmastiku veepinnale. Viimasel juhul on soovitatav segada vett kergelt ülevalpool, et hapnik või lämmastik vees paremini leviks. CO<sub>2</sub>-vaba õhku ei tohiks kasutada, kuna see võib põhjustada vee pH taseme tõusu. Igal juhul sette häirimine on ebasoovitav ja seda peaks vältima niipalju kui võimalik. Kergelt lenduvaid aineid tuleks uurida biomeetersüsteemis, veepinda kergelt segades. Samuti võib kasutada suletud anumaid, milles on kas atmosfääriõhuga või lämmastikuga õhuruum, ja sisemisi pudeleid lenduvate ainete püüdmiseks (16). Õhuruumi gaasi regulaarne vahetumine on nõutav aeroobses katses, et kompenseerida hapniku tarbimist biomassi poolt.

Lenduvate transformatsioonisaaduste kogumiseks sobivad lõksud sisaldavad, kuid mitte ainult 1 mol·dm<sup>-3</sup> kaaliumhüdroksiidi või naatriumhüdroksiidi lahuseid süsinikdioksiidi puhul<sup>(1)</sup> ja etüleenglükooli, etanoolamiini või 2 % parafiini ksüleenis orgaaniliste ühendite puhul. Anaeroobsetes tingimustes tekkinud lenduvad ained, näiteks metaan, saab koguda, näiteks, molekulaarsõelade abil. Sellised lenduvad ained saab põletada, näiteks, CO<sub>2</sub>-ks, viies gaasi CuO-ga täidetud kvartstorusse temperatuuril 900 °C ja püüdes absorberis tekkinud CO<sub>2</sub> leelisesse (17).

Nõutavad on katseainete ja transformatsioonisaaduste keemilise analüüsi laboriseadmed (nt gaasvedelikkromatograafia (GLC), kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC), planaarkromatograafia (TLC), mass-spektroskoopia (MS), gaaskromatograafia – mass-spektroskoopia (GS-MS), vedelikkromatograafia – mass-spektrometria (LC-MS), tuumamagnetresonants (NMR) jne), sh vajaduse korral radiomärgistatud või märgistamata kemikaalide avastamissüsteemid. Kui kasutatakse radiomärgistatud materjali, soovitatakse samuti vedeliktsintsiillatsioonloendurit ja oksüdeerijat põletamiseks (setteproovide põletamiseks enne radioaktiivsuse analüüsi).

Muud standardlaboriseadmed füüsikalise-keemiliste ja bioloogiliste määramiste jaoks (vt tabelit 1 punktis 1.8.2.2), klaasnõud, kemikaalid ja reaktiivid on nõutavad vastavalt vajadusele.

<sup>(1)</sup> Kuna nimetatud leeliselised absorptsioonilahused absorbeerivad ka õhutamisega süsinikdioksiidi ning aeroobsetes katses hingamisega tekkinud süsinikdioksiidi, tuleb neid regulaarselt vahetada, et vältida nende küllastumist ja seega nende absorptsioonivõime hävimist.

**▼B****1.8.2. Põhjasetete valik ja arv**

Proovivõtukohtade tuleks valida vastavalt katse eesmärgile igas nime-  
tatud olukorras. Proovivõtukohtade valikul tuleks kaaluda valgla ja  
vee ülesvoolu võimalikke põllumajanduslikke, tööstuslikke või kodu-  
majapidamise sisendeid. Setteid ei tohiks kasutada, kui need on saas-  
tatud katseainega või selle struktuurse analoogiga viimase 4 aasta  
jooksul.

**1.8.2.1. Sette valik**

Tavaliselt kasutatakse aeroobsetes katsetes kahte setet (7). Need kaks  
setet peaksid erinema orgaanilise süsiniku sisalduse ja teksturi  
poolest. Ühel settel on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus  
(2,5–7,5 %) ja peen tekstuur, teisel on madal orgaanilise aine sisaldus  
(0,5–2,5 %) ja jäme tekstuur. Orgaanilise süsiniku sisaldused peaksid  
tavaliselt erinema vähemalt 2 %. „Peen tekstuur” tähendab määratluse  
järgi > 50 % [savi + aleuriidi] <sup>(1)</sup> sisaldust ja „jäme tekstuur” < 50 %  
[savi + aleuriidi] sisaldust. Kahe sette [savi + aleuriidi] sisaldus peaks  
tavaliselt erinema vähemalt 20 %. Juhul, kui kemikaal võib samuti  
jõuda merevette, peaks vähemalt üks põhjasete olema pärit merest.

Rangelt anaeroobses katses tuleks valida prooviks kaks setet (sh  
nendega seotud vesi) pinnaveemassist anaeroobselt alalt (7). Sette-  
ja veefaase tuleks käsitleda ja transportida ettevaatlikult hapnikuta  
tingimustes.

Muud parameetrid võivad olla tähtsad setete valikul ja neid tuleks  
arvesse võtta iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Näiteks, setete  
pH-vahemik on tähtis selliste kemikaalide uurimisel, mille transfor-  
matsioon ja/või sorptsioon sõltub pH-st. Sorptsiooni pH-sõltuvust  
saab peegeldada katseaine pK<sub>a</sub> väärtuses.

**1.8.2.2. Põhjasette proovide kirjeldamine**

Nii vee kui sette puhul peamised parameetrid, mida tuleb mõõta ja  
millest tuleb teatada (viidates katsemeetodile), ning katsetapp, milles  
need parameetrid määratakse, on esitatud kokkuvõtlikult siin toodud  
tabelis. Nende parameetrite määramismeetodid on toodud viidetes  
(18, 19, 20, 21).

Lisaks sellele võib osutada vajalikuks mõõta ja teatada ka muudest  
parameetritest iga juhtumi puhul eraldi (nt magevee puhul: osakesed,  
aluselisus, kõvadus, elektrijuhtivus, NO<sub>3</sub>/PO<sub>4</sub> (suhe ja üksikud väärtused);  
setete puhul: katioonvahetusvõime, veemahutavus, karbonaat,  
kogulämmastik ja -fosfor, ning merede puhul: soolsus). Setete või vee  
analüüs nitraadi, sulfaadi, biokättesaadava raua ja muude võimalike  
elektronaktseptorite kohta võib olla kasulik redokstingimuste hinda-  
misel, eriti seoses anaeroobse transformatsiooniga.

<sup>(1)</sup> [Savi + aleuriit] on sette mineraalfraktsioon, mille osakeste suurus on < 50 µm.



▼ **B****Vee-setteproovide iseloomustamiseks kasutatavate parameetrite mõõtmine (7, 22, 23)**

Parameeter	Katseprotseduuri etapp					
	väliproovide võtmine	järelikäsitlemine	kohanemise algus	katse algus	katse käigus	katse lõpp
<b>Vesi</b>						
Päritolu/allikas	X					
Temperatuur ( °C)	X					
pH	X		X	X	X	X
Kogu orgaaniline süsinik			X	X		X
O <sub>2</sub> kontsentratsioon (*)	X		X	X	X	X
Redokspotentsiaal (*)			X	X	X	X

**Setted**

Päritolu/allikas	X					
Kihi sügavus	X					
pH		X	X	X	X	X
Osakeste jaotus		X				
Kogu orgaaniline süsinik		X	X	X		X
Mikroobi biomass (*)		X		X		X
Redokspotentsiaal (**)	Vaatlused (värv/lõhn)		X	X	X	X

(\*) Aeroobsetes uuringutes mikroobide hingamiskiiruse meetod (26), suitsutusmeetod (27) või bakterite arvu määramine (nt bakterid, kiirikbakterid, seened ja kolooniate koguarv), anaeroobsetes uuringutes metanogeneesi kiirus.

(\*\*) Viimased uurimustulemused on näidanud, et vee hapniku kontsentratsioonide ja redokspotentsiaalide mõõtmistel ei ole mehhanistlikku ega ennustatavat väärtust, kui käsitletakse mikroobipopulatsioonide kasvu ja arengut pinnaveses (24, 25). Biokeemilise hapnikutarbe (BOD – määramine väliproovide võtmisel, katse alguses või lõpus) ja mikro-/makrotoitainete Ca, Mg ja Mn kontsentratsioonide määramine (katse alguses ja lõpus) vees ning kogulämmastiku ja kogukaaliumi mõõtmine setetes (väliproovide võtmise ajal ja katse lõpus) sobivad paremini aeroobse biotransformatsiooni kiiruste ja teede tõlgendamiseks ja hindamiseks.

1.8.3. **Kogumine, käsitlemine ja säilitamine**1.8.3.1. *Kogumine*

ISO põhjasetteproovide võtmist käsitleva juhendi (8) eelnõud tuleks kasutada setteproovide võtmisel. Setteproovid tuleks võtta sette 5–10 cm ülemisest kihist. Settega seotud vesi tuleks koguda samast kohast ja samal ajal kui sete. Anaeroobse katse puhul tuleks sette- ja sellega seotud vee proove võtta ja transportida hapnikuta (28) (vt punkti 1.8.2.1). Mõningaid proovivõtuseadmeid on kirjeldatud kirjanduses (8, 23).

**▼B**1.8.3.2. *Käsitlemine*

Sete eraldatakse veest filtreerimise teel ja sete märgsõelutakse läbi 2 mm sõelaava, kasutades liigsed proovivõtukohest võetud vett, mis seejärel visatakse minema. Seejärel segatakse soovitud suhtes (vt punkti 1.9.1) sette ja vee teadaolevad kogused inkubatsioonikolbides ja valmistatakse ette kohanemiseks (vt punkti 1.8.4). Anaeroobse katse puhul tuleb sooritada kõik käsitlemisetapid hapniku puudumisel (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Säilitamine*

Värskest võetud sette- ja veeproovide kasutamist soovitatakse väga, kuid kuna säilitamine on vajalik, tuleks sete ja vesi sõeluda sellisel, nagu on kirjeldatud eespool, ja säilitada koos, veega küllastatult (6–10 cm veekiht), pimedas, temperatuuril  $4 \pm 2$  °C<sup>(1)</sup> maksimaalselt 4 nädalat (7, 8, 23). Aeroobsetes katsetes kasutatud proovid tuleks säilitada vaba õhu juurdepääsuga (nt avatud mahutites), samas anaeroobsete katsete proovid tuleks säilitada ilma hapnikuta. Transportimisel ja säilitamisel ei tohi sette- või veeproove külmutada või setteproove kuivatada.

1.8.4. **Sette-/veeproovide katseks ettevalmistamine**

Kohanemisperiood peaks aset leidma enne katseaine lisamist, asetades iga sette-/veeproovi inkubatsiooninõusse, mida kasutatakse põhikatseks, ja kohanemine toimub täpselt samades tingimustes nagu katseinkubatsioon (vt punkti 1.9.1). Kohanemisperiood on aeg, mis kuulub süsteemi mõistliku stabiilsuse saavutamiseks, mida peegeldavad pH, hapniku kontsentratsioon vees, sette- ja veeproovi redokspotentsiaal ning faaside makroskoopiline eraldamine. Kohanemisperiood peaks tavaliselt kestma üks kuni kaks nädalat ja ei tohiks ületada nelja nädalat. Nimetatud perioodil tehtud määramiste tulemused tuleks teha teatavaks.

## 1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**

Katse tehakse inkubatsiooniseadmes (vt punkti 1.8.1), milles vee ja sette mahusuhe on 3:1 ja 4:1 ning settekiht on 2,5 cm ( $\pm 0,5$  cm)<sup>(1)</sup>. Vähemalt 50 g setet (kuivmass) inkubatsioonianuma kohta on soovitatav.

Katse tuleks sooritada pimedas konstantsel temperatuuril vahemikus 10–30 °C. Temperatuur ( $20 \pm 2$ ) °C on sobiv. Vajaduse korral võib kasutada täiendavaid madalamaid temperatuure (nt 10 °C) iga juhtumi puhul eraldi, sõltuvalt katse kohta nõutavast teabest. Inkubatsiooni-temperatuuri tuleks jälgida ja sellest teatada.

<sup>(1)</sup> Viimased uuringud on näidanud, et säilitamine temperatuuril 4 °C võib põhjustada sette orgaanilise süsiniku sisalduse vähenemist, mille võimalikuks tulemuseks on mikroobide tegevuse vähenemine (34).

**▼B****1.9.2. Katseaine töötlemine ja lisamine**

Kasutatakse kemikaali ühte katsekonsentratsiooni (<sup>1</sup>). Põllukultuuride kemikaalide puhul, mida lisatakse otse veemassi, tuleks tõlgendada suurima annusena märgistusel suurimat lisamiskiirust, mis on arvatud katseanuma vee pindala põhjal. Kõikidel muudel juhtudel peaks kasutatav kontsentratsioon põhinema keskkonnaemissioonidest tehtud ennustuste põhjal. Tuleks püüda tagada seda, et katseainet lisatakse piisavas kontsentratsioonis selleks, et iseloomustada transformatsiooniteed ning transformatsioonisaaduste teke ja vähenemist. Võib osutada vajalikuks lisada suuremaid annuseid (nt 10kordsed) olukordades, kus katseaine kontsentratsioonid on lähedal avastamispiiridele katse alguses ja/või kui peamisi transformatsioonisaaduseid ei suudeta kohe avastada, kuna nende kontsentratsioon on 10 % katseaine annusemäärast. Kui kasutatakse suuremaid kontsentratsioone, ei tohiks neil olla olulist negatiivset mõju vee-settesüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine konstantse kontsentratsiooni saamiseks erinevate mõõtmete tegemisel võib pidada vajalikuks lisatava aine koguse kohandamist, mis põhineb veesamba sügavusel anumaseoses vee sügavusega uuritavas keskkonnas (mis eeldatavasti on 100 cm, kuid võib kasutada ka muid sügavusi). Vt 4. lisa näidisarvutamise kohta.

Ideaaljuhul tuleks lisada katseainet vesilahusena katsesüsteemi veefaasi. Kui see on vältimatu, on lubatud kasutada veega segunevate lahustite (nt atsetoon, etanool) väikeseid koguseid katseaine lisamiseks ja jaotamiseks, kuid see ei tohiks ületada 1 % v/v ja sellel ei tohiks olla kahjulikke mõjusid katsesüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine vesilahus tuleks teha hoolikalt – täieliku homogeensuse tagamiseks võib vaja minna generaatorkolonne ja eelsegamist. Katse-süsteemi vesilahuse lisamise järel on soovitatav veefaasi õrnalt segada, häirides setet nii vähe kui võimalik.

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata, kuna preparaate koostisosad võivad mõjutada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste jaotumist vee- ja settefaaside vahel. Nt nõrgalt veeslahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

Inkubatsioonianumate arv sõltub proovivõtukordade arvust (vt punkti 1.9.3). Katsesüsteeme peaks olema piisavalt, et igal proovivõtukorral võib kasutada kahte süsteemi. Kui iga põhjasettesüsteemi kohta tehakse kontrollproovid, ei tohiks neid töödelda katseainega. Kontrollproove saab kasutada sette mikroobi biomassi ning vee- ja setteproovide orgaanilise süsiniku koguarvu määramiseks katse lõpus. Kahte kontrollproovi (s.t üks kontrollproov iga põhjasette kohta) saab kasutada nõutud parameetrite jälgimiseks settes ja vees kohanemise ajal (vt tabelit punktis 1.8.2.2). Tuleks teha kaks täiendavat kontrollproovi juhul, kui katseainet lisatakse lahusti abil, et mõõta kahjulikke mõjusid katsesüsteemi mikroobide tegevusele.

<sup>(1)</sup> Katse tegemine teise kontsentratsiooniga võib olla kasulik kemikaalide puhul, mis jõuavad pinnavette erinevaid teid pidi oluliselt erinevate kontsentratsioonide tõttu, kuni saab analüüsida väiksemat kontsentratsiooni piisavalt täpselt.

**▼B****1.9.3. Katse kestus ja proovide võtmine**

Katse ei tohiks tavaliselt kesta kauem kui 100 päeva (6) ning peaks jätkuma seni, kuni lagunemise ja vee/sette jaotamise kohta esitatakse selgitus või kui 90 % katseainest on hävinud transformatsiooni ja/või lendumise tõttu. Proovivõtukordade arv peaks olema vähemalt kuus (sealhulgas proovivõtu 0 kord), ja enne katset võib kasutada valikulist eelkatset (vt punkti 1.9.4), mille käigus määratakse asjaomased proovivõturežiimid ja katse kestus, välja arvatud juhul, kui katseaine kohta on olemas piisavalt andmeid eelnevatest uuringutest. Hüdrofoobsete katseainete puhul võib vaja minna täiendavaid proovivõtuhetki katse algperioodil, et määrata vee- ja settefaaside jaotamise kiirus.

Asjaomastel proovivõtuaegadel eemaldatakse analüüsis kõik inkubatsioonianumad (paralleelproovides). Setet ja selle peal olevat vett analüüsitakse eraldi <sup>(1)</sup>. Pinnavesi tuleks hoolikalt eemaldada setet minimaalselt häirides. Katseaine ja transformatsioonisaaduste ekstraheerimine ja karakteriseerimine peaksid järgima asjaomaseid analüütilisi protseduure. Tuleks hoolikalt eemaldada aine, mis võib olla adsorbeerunud inkubatsioonianumasse või lenduvate ainete püüdmissüsteemidesse.

**1.9.4. Valikulised eelkatsed**

Kui proovivõtu kestust ja režiimi ei saa hinnata muude, katseainet käsitlevate asjaomaste uuringute põhjal, võib pidada vajalikuks teha valikuline eelkatse, mis tuleks sooritada, kasutades samu katsetingimusi, mis on välja pakutud lõppuuringuks. Asjaomased katsetingimuste ja eelkatse tulemuste kohta, kui see on sooritatud) tuleks esitada lühiprotookoll.

**1.9.5. Mõõtmised ja analüüs**

Katseaine a transformatsioonisaaduste kontsentratsiooni igal proovivõtu korral vees ja settes tuleks mõõta ja neist teatada (lisatud kontsentratsiooni ja protsendimäärana). Üldiselt tuleks identifitseerida transformatsioonisaadused, mis on avastatud  $\geq 10$  %na radioaktiivsest aineist vee-sette koguproovis igal proovivõtuajal, kui seda ei ole mõistlikult teisiti põhjendatud. Transformatsioonisaaduseid, mille kontsentratsioonid katse käigus pidevalt kasvavad, tuleks samuti identifitseerimisel arvesse võtta, isegi siis, kui nende kontsentratsioonid ei ületa eespool toodud piirnorme, kuna see võib viidata aine püsivusele. Viimast tuleks arvesse võtta iga juhtumi puhul eraldi, tuues põhjendused protokollis.

Gaaside/lenduvate ainete püüdmissüsteemide (CO<sub>2</sub> ja muud, s.t. lenduvad orgaanilised ühendid) tulemustest tuleks teatada igal proovivõtuajal. Tuleks teatada ka mineralisatsioonikiirus. Ekstraheerimata (seotud) jääkidest settes tuleks teatada igal proovivõtuhetkel.

<sup>(1)</sup> Kui võib toimuda kiire anaeroobsete transformatsioonisaaduste reoksüdeerumine, tuleks säilitada anaeroobsed tingimused proovivõtu ja analüüsimise ajal.

**▼B****2. TULEMUSED****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Lisatud radioaktiivse aine kogu ainetase või saagis (vt punkti 1.7.1) arvutatakse igal proovivõtukorral. Tulemustest tuleks teada anda lisatud radioaktiivse aine protsendimäärana. Radioaktiivse aine jaotamisest vee ja sette vahel tuleks teatada kontsentratsioonide ja protsendimääradena igal proovivõtukorral.

Katseaine poolestusaeg,  $DT_{50}$  ja vajaduse korral  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  tuleks arvutada koos usalduspiiridega (vt punkti 1.7.3). Teavet katseaine hävimiskiiruse kohta vees ja settes võib saada sobivate hindamisprotseduuride abil. Nende hulka kuuluvad näiline esimese astme kineetika, graafilisi või numbrilisi lahendeid kasutavad empiirilised kõvera moodustamise tehnika ning keerukamad hindamised, näiteks ühe või mitme lahtriga näidised. Täiendavaid üksikasju võib leida asjaomastest avaldatud kirjandusest (35, 36, 37).

Kõikidel lähenemistel on oma tugevad ja nõrgad küljed ning need erinevad märkimisväärselt oma keerukuse poolest. Esimese astme kineetika võib lagundamis- ja jaotamisprotsesse liiga lihtsustada, kuid võimaluse korral lisab suuruse (kiirusekonstant või poolestusaeg), mis on hõlpsasti mõistetav ja mis on väärtuslik simulatsioonimudelitel koostamisel ja prognoositavate arvutuskontsentratsioonide arvutamisel. Empiiriliste lähenemiste või lineaarsete transformatsioonide käigus võidakse saada andmete jaoks paremini sobivaid kõveraid ja seetõttu hinnata paremini poolestusaegasid,  $DT_{50}$  ja vajaduse korral  $DT_{75}$  ja  $DT_{90}$  väärtusi. Tuletatud konstantide kasutamine on siiski piiratud. Lahternäidiste abil võib luua riski hindamise jaoks kasulikke, väärtuslikke konstante, mis kirjeldavad lagunemiskiirust erinevates sektorites ja kemikaali jaotust. Neid tuleks samuti kasutada kiiruskonstantide hindamiseks peamiste transformatsioonisaaduse tekkel ja lagunemisel. Kõikidel juhtudel tuleb valitud meetodit põhjendada ja eksperimenteerija peaks graafiliselt ja/või statistiliselt esitama sobivuse headuse.

**3. PROTOKOLL****3.1. KATSEPROTOKOLL**

Protokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (tuues ära märgi/märkide asukoha, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused;

— katseaine puhtus (lisandid);

— märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

**▼ B**

## Võrdlusained:

- selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

## Uuritavad setted ja veed:

- põhjasettest proovide võtmise koha (kohtade) asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu;
- kogu teave vee-settesüsteemide kogumise, säilitamise (kui säilitatakse) ja kohanemise kohta;
- vee-setteproovide tunnused, mis on loetletud punkti 1.8.2.2 tabelis.

## Katsetingimused:

- kasutatud katsesüsteem (nt mõõdavool, biomeeter, õhutamisviis, segamismeetod, veemaht, settemass, nii vee- kui ka settekihi paksus, katseanumate mõõdud jne);
- katseaine lisamine katsesüsteemi: kasutatud katsekontsentratsioon, paralleelproovide ja kontrollproovide arv, katseaine lisamisviis (nt lahusti abil, kui seda kasutatakse) jne;
- inkubatsioonitemperatuur;
- proovivõtuajad;
- ekstraheerimismeetodid ja -tõhusused ning analüüsimeetodid ja avastamiskiirused;
- transformatsioonisaaduste kirjeldamise/identifitseerimise meetodid;
- kõrvalekalded katseprotokollist või katsetingimustest katse käigus.

## Tulemused:

- representatiivsete analüüsitud töötlamata andmed (kõik töötlamata andmed tuleb säilitada labori arhiivis);
- kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;
- saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);
- tulemused tabeli kujul, väljendatuna katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste ning ekstraheerimata radioaktiivsete ainete protsendimäärana lähteannusest ja vajaduse korral  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  vees, settes ja kogu süsteemis (vaid protsendina);
- ainetase uuringute kestel ja lõpus;
- vee- ja settefraktsioonides ning kogu süsteemis toimunud transformatsiooni (sh mineralisatsiooni) graafiline esitamine;
- mineralisatsioonikiirused;

**▼B**

- katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste poolestusaeg, DT<sub>50</sub> ja vajaduse korral DT<sub>75</sub> ja DT<sub>90</sub> väärtused, kaasa arvatud usalduspiirid vees, settes ja kogu süsteemis;
- hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste transformatsioonikineetika kohta;
- vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;
- tulemuste arutelu.

4. **VIITED**

- 1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- 2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- 3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- 4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada, pp. 35–3 7.
- 5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- 6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- 7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- 8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- 9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- 10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- 11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- 12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- 13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 14) Scholz, K, Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

**▼B**

- 15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- 16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631–637.
- 17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with <sup>14</sup>C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661–667.
- 18) Black, C.A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- 19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17<sup>th</sup> edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- 20) Rowell, D.L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- 21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, 1038–1039.
- 22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests', 3-4 July 1991.
- 23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- 24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858–2868.
- 25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329–338.
- 26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197–203.
- 27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13–21.
- 29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850–857.
- 30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U, Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527–1550.
- 31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499–1509.



**▼B**

- 32) Nuck, BA. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of <sup>14</sup>C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597–3603.
- 33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- 34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961–968.
- 35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187–203.
- 36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47–60.
- 37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, pp. 1349–1354.

**▼B***1. liide***JUHEND AEROOBSETE JA ANAEROOBSETE KATSESÜSTEEMIDE KOHTA****Aerobne katsesüsteem**

Käesolevas meetodis kirjeldatud aerobne katsesüsteem sisaldab aeroobset veeikihti (tüüpilised hapniku kontsentratsioonid on vahemikus 7–10 mg·l<sup>-1</sup>) ja settekihti, mis on aerobne pinnal ja anaerobne pinna all (tüüpilised keskmised redokspotentsiaalid ( $E_h$ ) sette anaeroobsel alal on vahemikus – 80 kuni – 190 mV). Igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud õhk veepinnale piisava hapniku säilitamiseks õhuruumis.

**Anaerobne katsesüsteem**

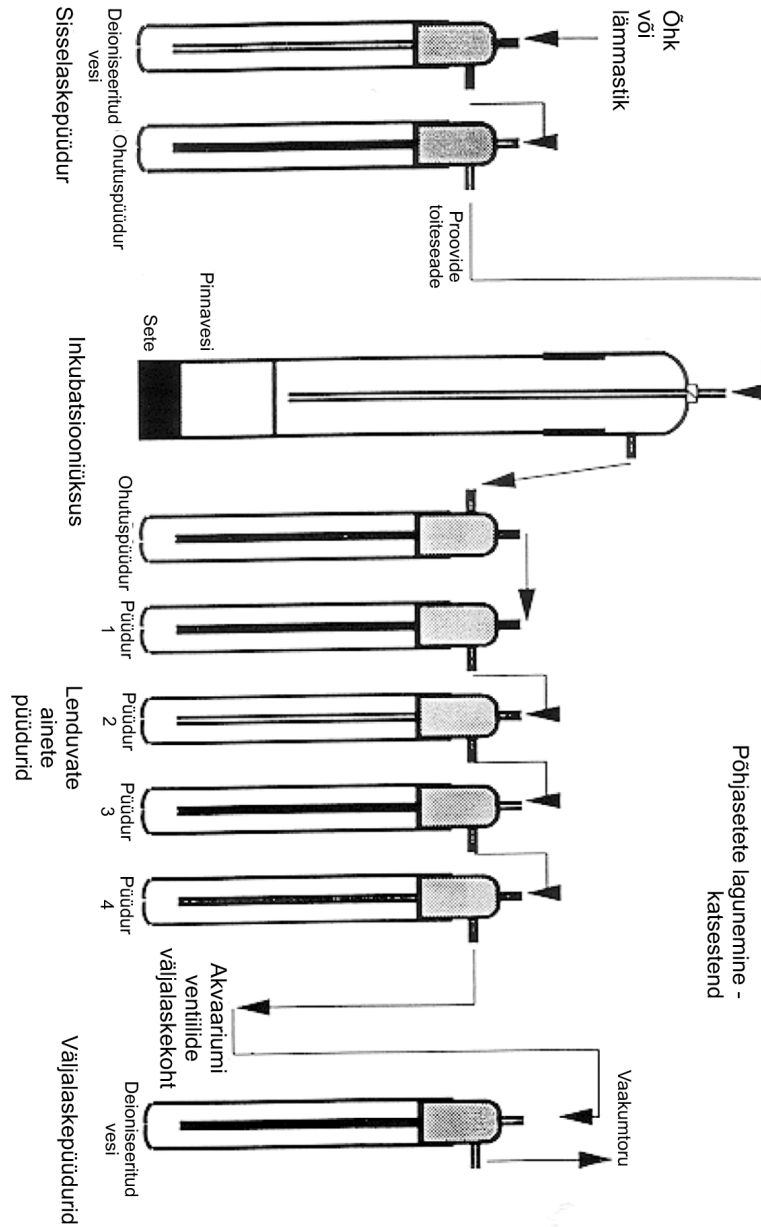
Anaerobse katsesüsteemi puhul on katseprotseduur oma olemuselt samasugune kui aeroobses süsteemis, erandiks on see, et igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud lämmastik veepinnale lämmastiku õhuruumi säilitamiseks. Setet ja vett käsitletakse anaeroobsena, kui redokspotentsiaal ( $E_h$ ) on madalam kui – 100 mV.

Anaeroobses katses sisaldab mineralisatsiooni hindamine tekkinud süsinikdioksiidi ja metaani mõõtmisi.

▼B

## 2. liide

## GAASI MÕÖDAVOOLUSEADME NÄIDIS

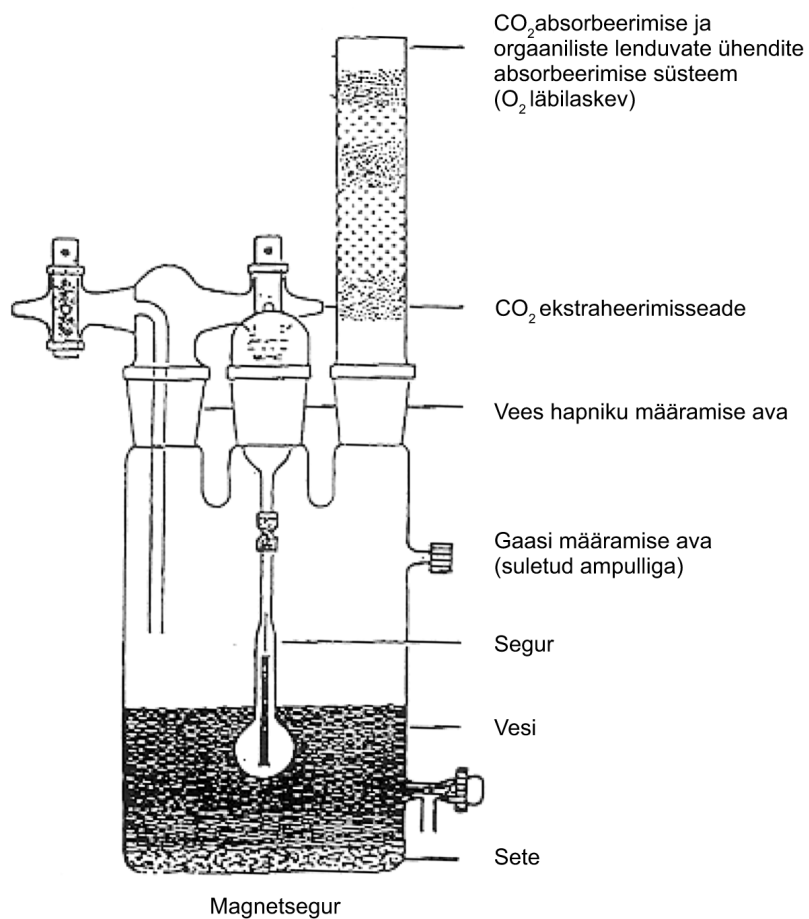


Ohutusüüdur, tühi  
 Püüdur 1:  
 etüleenglükool lenduvate orgaaniliste ainete püüdmiseks  
 Püüdur 2:  
 väävelhape 0,1 M aluseliste lenduvate ainete püüdmiseks  
 Püüdurid 3 ja 4 %:  
 naatriumhüdrosiid 2M CO<sub>2</sub> ja muude happeliste lenduvate ainete püüdmiseks

▼B

3. liide

## BIOMEETRI NÄIDIS



**▼B**

## 4. Liide

NÄIDISARVUTUS	KATSEAINE KATSEANUMATESSE	ANNUSTAMISE	KOHTA
Silindri siseläbimõõt:		= 8 cm	
Veesamba sügavus, v.a sete:		= 12 cm	
Pindala: $3,142 \times 4^2$		= 50,3 cm <sup>2</sup>	
Annusmäär: 500 g katseainet ha kohta vastab 5 µg/cm <sup>2</sup>			
Kokku µg: $5 \times 50,3$		= 251,5 µg	
Kohandada kogust seoses 100 cm sügavusega: $12 \times 251,5 \div 100$		= 30,18 µg	
Veesamba maht: $50,3 \times 12$		= 603 ml	
Kontsentratsioon vees: $30,18 \div 603$		= 0,050 µg/ml või 50 µg/l	

▼ **M1****C.25. AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES –  
BIOLAGUNEMISE MUDELKATSE****1. METOODIKA**

Käesolev meetodika on samaväärne standardiga OECD TG 309 (2004) (1).

**1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva katse eesmärk on mõõta uuritava aine biolagunemise sõltuvust ajast aeroobses looduslikus vees madalatel kontsentratsioonidel ja väljendada mõõtmistulemused kineetiliste seoste vormis. Kõnesolev mudelkatse on laboratoorne loksutatavas kolvis läbiviidav portskatse, millega saab määrata orgaanilise aine aeroobse biolagunemise kiiruse loodusliku pinnavee (mage-, riim- või merevee) proovides. Meetodika põhineb standardil ISO/DIS 14592–1 (2), kuid sisaldab ka meetodikate C.23 ja C.24 elemente (3, 4). Uuritava mikrokosmi seisundi halvenemise vältimiseks võib pika katseaja korral asendada portsrežiimi poolpideva režiimiga, kuid see ei ole kohustuslik. Mudelkatse peamine eesmärk on määrata uuritava aine mineraliseerumine pinnavees ja esitada selle alusel lagunemise kineetika. Katse teine (mittekohustuslik) eesmärk võib olla teabe saamine esmase lagunemise ja oluliste muundumissaaduste kohta. Muundumissaaduste kindlakstegemine ja võimaluse korral nende sisalduse määramine on eriti oluline väga aeglaselt mineraliseeruvate ainete puhul (ained, mille <sup>14</sup>C-märgisega jäägi üldine poolestusaeg on üle 60 ööpäeva). Oluliste muundumissaaduste kindlakstegemiseks ja mõõtmiseks tuleb analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu kasutada tavaliselt kõrgemaid uuritava aine kontsentratsioone (> 100 µg/l).

Kõnesoleva katse puhul tähendab madal kontsentratsioon uuritava aine sisaldust (1–100 µg/l), mis on nii madal, et katses saadud biolagunemise kineetika võiks kajastada eeldatavat kineetikat keskkonnas. Looduslikus katsevees leiduvate biolagundatavate süsiniksubstraatide üldmassiga võrreldes on madala kontsentratsiooniga uuritav aine sekundaarne substraat. Sellest järeldub, et biolagunemise kineetika on eeldatavalt esimest järku („ilma kasvuta kineetika“) ja uuritav aine laguneb „kometabolismi“ teel. Esimest järku kineetika tähendab, et lagunemise kiirus (mg/l/ööpäev) on aja jooksul väheneva substraadi kontsentratsiooniga võrdeline. Tõelise esimest järku kineetika puhul on konkreetse aine lagunemise kiiruskonstant  $k$  sõltumatu ajast ja kontsentratsioonist. See tähendab, et  $k$  ei muutu märkimisväärselt katse jooksul ja on samasugune ka kõrgematel kontsentratsioonidel läbiviidud eri katsete puhul. Definiitsiooni järgi on lagunemise kiiruskonstant  $k$  võrdne kontsentratsiooni suhtelise muutusega ajaühiku kohta:  $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$ . Kuigi ettenähtud tingimustes on eeldatav kineetika tavaliselt esimest järku, võib esineda teatavaid olukordi, kus andmeid kirjeldab paremini muud tüüpi kineetika. Kõrvalekalle esimest järku kineetikast võib ilmneda näiteks siis, kui biomuundumist ei limiteeri bioloogilise reaktsiooni kiirus, vaid mingi massiülekanne nähtus, nagu difusiooni kiirus. Siiski võib katseandmeid peaaegu alati kirjeldada pseudo-esimest järku kineetika abil, kui eeldada, et kiiruskonstant sõltub kontsentratsioonist.

▼ **M1**

Katseplaani koostamise ja tulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks peavad enne katset olema olemas (nt standardsetest söelkatsetest saadud) andmed uuritava aine biolagundatavuse kohta kõrgematel kontsentratsioonidel, abiootilise lagundatavuse, muundumissaaduste ja oluliste füüsikalise-keemiliste omaduste kohta. Täieliku biolagundatavuse määramiseks kasutatakse <sup>14</sup>C-märgisega uuritavat ainet ja määratakse <sup>14</sup>C jaotumine faaside vahel katse lõpus. Märgiseta uuritava aine puhul saab täielikku biolagundatavust määrata ainult kõrgete kontsentratsioonide kasutamisel ja tingimusel, et kõik olulised muundumissaadused on teada.

## 1.2. MÕISTED

**Esmane biolagunemine** on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusel aine kaotab oma keemilise identiteedi.

**Funktsionaalne biolagunemine** on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusena aine kaotab teatava omaduse.

**Täielik aeroobne biolagunemine** on hapniku juuresolekul mikroorganismide abil toimuv keemilise aine lagunemine (mineraliseerumine) süsinikdioksiidiks, veeks ja muude aines esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks ning uute mikrobioloogilise sünteesi produktide ja biomassi teke.

**Mineraliseerumine** on keemilise aine või orgaanilise materjali lagunemine süsinikdioksiidiks, veeks ja muude aines esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks mikroorganismide toimel.

**Ootefaas** on aeg katse algusest kuni hetkeni, millal lagundava toimega mikroorganismid on kohanenud ja keemilise aine või orgaanilise materjali biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (10 protsendini maksimaalsest teoreetilisest lagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemetodi täpsusest).

**Maksimaalne biolagunemise tase** on keemilise aine või orgaanilise materjali katses registreeritud biolagunemise määr protsentides, millest edasi biolagunemine katses enam ei lähe.

**Primaarne substraat** on looduslike süsiniku- ja energiaallikate kogum, mis tagab mikroorganismide biomassi kasvu ja elutegevuse.

**Sekundaarne substraat** on nii madala kontsentratsiooniga substraadikomponent, et selle lagundamisest saavad asjaomased mikroorganismid üksnes tähtsusetu koguse süsinikku ja energiat, võrreldes süsiniku- ja energiakogusega, mille nad saavad substraadi peamiste komponentide (primaarsete substraatide) lagundamisest.

**Lagunemise kiiruskonstant** on esimest või pseudo-esimest järku kiiruskonstant  $k$  (ööpäev<sup>-1</sup>), mis näitab lagunemise kiirust. Porskatsetes määratakse  $k$  pärast ootefaasi saadud lagunemiskõvera esimese osa alusel.

▼ **M1**

**Poolestusaeg  $t_{1/2}$  (ööpäev)** on mõiste, mida kasutatakse esimest järku reaktsiooni kiiruse iseloomustamiseks. See on aeg, mille jooksul aine kontsentratsioon väheneb kaks korda. Poolestusaeg ja lagunemise kiiruskonstant on seotud valemiga  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

**Poollagunemisaeg,  $DT_{50}$  (ööpäev)** on mõiste, mida kasutatakse biolagunemiskatse tulemuse väljendamiseks. See on 50-protsendiliseks biolagunemiseks vajalik aeg (koos ootefaasiga).

**Avastamislävi ja mõõtmislävi.** Avastamislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa aine identsust tõendavat signaali eristada analüüsi artefaktidest. Mõõtmislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kontsentratsiooni määrata nõutava täpsusega.

**Lahustunud orgaaniline süsinik** on veeproovis leiduva orgaanilise süsiniku osa, mida ei saa eemaldada teatava faaside eraldamisviisi abil, näiteks tsentrifuugimisega  $40\,000\text{ ms}^{-2}$  juures 15 minuti jooksul või filtrimisega läbi membraani, mille poori läbimõõt on  $0,2\text{--}0,45\ \mu\text{m}$ .

**Orgaanilise  $^{14}\text{C}$  üldaktiivsus** on orgaanilise süsinikuga seotud  $^{14}\text{C}$  üldaktiivsus.

**Lahustunud orgaanilise  $^{14}\text{C}$  aktiivsus** on lahustunud orgaanilise süsinikuga seotud  $^{14}\text{C}$  üldaktiivsus.

**Tahkete osakestega seotud orgaanilise  $^{14}\text{C}$  aktiivsus** on tahkete osakestega seotud orgaanilise  $^{14}\text{C}$  üldaktiivsus.

## 1.3. KATSE RAKENDATAVUS

Kõnesolev mudelkatse on rakendatav lendumatu või vähelenduva orgaanilise aine madalate kontsentratsioonide puhul. Atmosfääriõhule avatud kolvi (nt puuvillvatikorgiga kolvi) puhul võib praktiliselt lendumatuks pidada ainet, mille Henry konstant on väiksem kui umbes  $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$  (umbes  $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ). Kui kasutatakse suletud kolbi vaba ruumiga ülaosas, on võimalik uurida ka väheleenduvaid aineid (Henry konstant  $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$  või  $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ), ilma et süsteemist läheks ainet kaduma. Kui  $\text{CO}_2$  eemaldamisel ei kasutata vajalikke ettevaatusabinõusid, võib  $^{14}\text{C}$ -märgisega ainet siiski kaotsi minna. Sel juhul võib olla vaja püüda  $\text{CO}_2$  leelist sisaldavasse siseabsorberisse või kasutada välist  $\text{CO}_2$  absorberit (otsene  $^{14}\text{CO}_2$  määramine, vt 3. liide). Biolagunemise kineetika määramiseks peab uuritava aine kontsentratsioon olema madalam selle aine lahustuvusest vees. Tuleb siiski märkida, et kirjanduses esitatud vesilahustuvus võib olla oluliselt suurem uuritava aine lahustuvusest looduslikus vees. Väga halvasti lahustuva uuritava aine puhul võib lahustuvuse määramiseks kasutada sama vett, mida kasutatakse katsetes, kuid see ei ole kohustuslik.

Käesolevat meetodikat võib kasutada biolagunemise modelleerimiseks suuremaid osakesi mittesisaldavas pinnavees („pelaagiline katse“) või häguses pinnavees, mis võib esineda vee ja sette piirpinna läheduses (hõljumikatse).



▼ **M1**

## 1.4. KATSE PÕHIMÕTE

Portskatses inkubeeritakse uuritavat ainet kas ainult pinnavees (pelaa-giline katse) või pinnavees, millele on lisatud hõljuvainet (hõljumit) ja/või setet, nii et selle kuivmassi sisaldus on 0,01–1 g/l (hõljumikatse); viimasel juhul modelleeritakse veekogu, milles on hõljumit või taas-suspendeeritud setet. Enamasti on pinnavee hõljumi ja/või hõljuvsette sisaldus eespool märgitud vahemiku madalamas osas. Katsekolbe inku-beeritakse valguse juurdepääsuta keskkonnamperatuuril aeroobsetes tingimustes, segamisega. Lagunemise kineetika määratakse vähemalt kahel uuritava aine kontsentratsioonil. Kontsentratsioonid peavad teineteisest erinema 5–10 korda ja vastama uuritava aine eeldatavale kontsentratsioonivahemikule keskkonnas. Uuritava aine maksimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 100 µg/l ja on parem, kui see on alla 10 µg/l, kuna sel puhul vastab biolagunemine esimest järku kineetikale. Mini-maalne kontsentratsioon ei tohi ületada 10 µg/l ja on parem, kui see on 1–2 µg/l või isegi madalam kui 1 µg/l. Müügilolevate <sup>14</sup>C-märgisega ainete kasutamisel saab nii madalaid kontsentratsioone tavaliselt hästi määrata. Muude analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu on sageli võimatu mõõta uuritava aine kontsentratsiooni vajaliku täpsusega, kui selle algkontsentratsioon on ≤ 100 µg/l (vt punkt 1.7.2, teine lõik). Kui ei ole piisavalt madala avastamislävega analüüsimeetodit, siis võib oluliste muundumissaaduste identifitseerimiseks ja sisalduse mõõtmiseks kasu-tada uuritava aine kõrgemaid kontsentratsioone (> 100 µg/l, mõnikord > 1 mg/l). Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni, siis ei saa katsetulemustest võib-olla hinnata lagunemise esimest järku kiirus-konstanti ja poolestusaega, kuna lagunemine tõenäoliselt ei vasta esimest järku kineetikale.

Lagunemist registreeritakse sobiva aja tagant, mõõtes kas <sup>14</sup>C jääkak-tiivsust või (kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi) uuritava aine jääkkontsentratsiooni. Kõige stabiilsema molekuloosa märgistamine <sup>14</sup>C-ga võimaldab mõõta täielikku mineraliseerumist, samas kui vähem stabiilse molekuloosa märgistamine <sup>14</sup>C-ga või spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võimaldab hinnata esmast biolagunemist. Kõige stabiilsem molekuloosa ei pruugi siiski sisaldada olulist funktsio-naalosa, mida võib seostada aine teatava eriomadusega, nagu toksilisus, bioakumulatsioon jne. Selle eriomaduse kao jälgimiseks võib niisugusel juhul olla vaja kasutada <sup>14</sup>C-märgistatud funktsionaalosa uuritavat ainet.

## 1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Käesolevas katses võib kasutada nii radioaktiivse märgisega kui ka märgiseta aineid. Soovitatakse kasutada märgistamist <sup>14</sup>C-ga, kusjuures märgis peab tavaliselt asuma kõige stabiilsemas (stabiilsemates) mole-kuli osas (osades) (vt ka punkt 1.4). Rohkem kui ühe aromaatsse tsükliga molekulis on soovitatav märgistada <sup>14</sup>C-ga üks või mitu süsinikku igas tsükli-s. Lisaks on soovitatav märgistada <sup>14</sup>C-ga üks või mitu süsinikku mõlemal pool kergesti lõhustatavat sidet. Uuritava aine keemiline ja radiokeemiline puhtusaste peab olema > 95 %. Et hõlbustada <sup>14</sup>C mõõt-mist madala algkontsentratsiooniga katsetes, kasutatakse radiomärgi-sega aineid, mille eraktiivsus on eelistatavalt umbes 50 µCi/mg (1,85 MBq) või kõrgem. Uuritava aine kohta on vaja teada järgmist:

**▼ M1**

- lahustuvus vees [metoodika A.6];
- lahustuvus orgaanilises (orgaanilistes) lahustis (lahustites) (aine puhul, mida lisatakse lahustis või mis lahustub vees halvasti);
- dissotsiatsioonikonstant (pKa), kui aine seob või loovutab kergesti prootoneid [OECD TG 112] (5);
- aururõhk [metoodika A.4] ja Henry konstant;
- keemiline püsivus vees valguse juurdepääsuta (hüdrolüüs) [metoodika C.7].

Kui uuritakse vees vähelahustuva aine lagunemist merevees, võib olla kasulik teada ka soolamiskonstanti (Setšenovi konstant)  $K^s$ , mis on määratud valemiga  $\log(S/S') = K^s C_m$ , kus S ja S' on aine lahustuvus vastavalt magedas vees ja merevees ja  $C_m$  on soola molaarne kontsentratsioon.

Hõljumikatse puhul on vaja teada ka järgmist:

- jaotuskoefitsient süsteemis n-oktaanol-vesi [metoodika A.8];
- adsorptsioonikoefitsient [metoodika C.18].

Kasulik on teada veel järgmist:

- uuritava aine kontsentratsioon keskkonnas, kui see on teada või seda on hinnatud;
- uuritava aine toksilisus mikroorganismidele [metoodika C.11];
- kergbiolagundatus ja/või loomulik biolagundatus [metoodikad C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];
- aeroobne või anaeroobne biolagundatus mullas ja muundumiskatsed süsteemis setted-vesi [metoodikad C.23, C.24].

## 1.6. STANDARDINE

Tavaliselt kasutatakse standardina aeroobsetes tingimustes kergesti biolagundatavat ainet (nt aniliin või naatriumbensoat). Aniliini ja naatriumbensoadi eeldatav biolagunemise aeg on tavaliselt alla kahe nädala. Standardainega kontrollitakse, et katses kasutatava vee mikroorganismide aktiivsus oleks teatavates piirides, st et vees oleks aktiivne mikroorganismide populatsioon.

**▼ M1**

## 1.7. KVALITEEDIKRITERIUMID

## 1.7.1. Saagis

Pärast uuritava aine lisamist kontrollitakse iga katsetatavat algkontsentratsiooni kohe  $^{14}\text{C}$  aktiivsuse mõõtmisega või, märgistamata aine puhul, keemilise analüüsiga vähemalt kahes paralleelproovis. Nii saadakse andmeid asjaomase analüüsimeetodi rakendatavuse ja korratavuse ning uuritava aine jaotuse ühtluse kohta. Edasisel andmete analüüsil ei kasutata tavaliselt nominaalset kontsentratsiooni, vaid mõõdetud  $^{14}\text{C}$  algaktiivsust või uuritava aine algkontsentratsiooni, kuna sellega kompenseeritakse sorptsioonist tingitud ainekaod ja doseerimisvead.  $^{14}\text{C}$ -märgisega uuritava aine korral võib aine saagise katse lõpus leida massibilansi koostamisega (vt punkt 1.8.9.4, viimane lõik). Paremalt juhul on radiomärgisega aine massibilansist leitud saagis 90–110 %, samas kui radiomärgiseta aine saagis on olenevalt analüüsimeetodi täpsusest 70–110 %. Neid vahemikke ei tule pidada katse nõuetele vastavuse kriteeriumideks; neid tuleb tõlgendada sihtvahemikena. Analüüsi täpsuse võib määrata ka algkontsentratsioonist madalamal uuritava aine kontsentratsioonil ning oluliste muundumissaaduste puhul, kuid see ei ole kohustuslik.

## 1.7.2. Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus

Et kontrollida analüüsimeetodi korratavust uuritava aine ja vajaduse korral, muundumissaaduste sisalduse mõõtmisel (kaasa arvatud esmase ekstraheerimise tõhusus), tehakse viis pinnavee üksikekstraktide paralleelanalüüsi.

Võimaluse korral ei tohiks uuritava aine ja muundumissaaduste puhul analüüsimeetodi avastamislävi olla kõrgem kui 1 % katsesüsteemi lisatud aine algkontsentratsioonist. Mõõtmislävi ei tohiks ületada 10 % algkontsentratsioonist. Paljude orgaaniliste ainete ja nende muundumissaaduste keemiliseks analüüsiks on sageli vaja, et lisatud uuritava aine algkontsentratsioon oleks suhteliselt kõrge (> 100 µg/l).

## 1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

## 1.8.1. Seadmed

Katse tehakse vajaliku mahuga (nt 0,5- või 1,0-liitrites) silikoon- või kummikorgiga suletud koonilistes kolbides, silindrikujulistes pudelites või  $\text{CO}_2$ -kindlalt (nt butüülkummist septumiga) suletud seerumipudelites. Üks võimalus on teha katse suure arvu nõudega ja võtta igal proovivõtuajal prooviks vähemalt kahe paralleelnõu kogu sisu (vt punkt 1.8.9.1, viimane lõik). Radiomärgiseta lendumatu uuritava aine korral ei ole gaasikindel kork või septum vajalik, selle asemel sobib mittetihe puuvillvatikork, mille abil välditakse saastumist õhu kaudu (vt punkt 1.8.9.1, teine lõik). Vähelenduvaid aineid katsetatakse biomeetrialaadses seadmes, milles veepinda nõrgalt segatakse. Bakttersaaste vältimiseks võib katsenõu enne kasutamist steriliseerida kuumutamise või autoklaavimisega, kuid see ei ole kohustuslik. Lisaks sellele kasutatakse järgmisi tavalisi laboriseadmeid:

— plaatloksuti või magnetsegajad katsenõude pidevaks segamiseks;

**▼ M1**

- tsentrifuug;
- pH-meeter;
- turbidimeeter hägususe nefelomeetriliseks määramiseks;
- ahi või mikrolaineahi kuivmassi määramiseks;
- membraanfiltrimise seade;
- autoklaav või ahi klaasnõude kuumsteriliseerimiseks;
- vahendid <sup>14</sup>C-märgisega aine käitlemiseks;
- seade <sup>14</sup>C aktiivsuse mõõtmiseks süsinikdioksiidi neelavast lahusest võetud proovis ja vajaduse korral setteproovis;
- analüüsiseade uuritava ja standardaine määramiseks, kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi (nt gaasikromatograaf, kõrgefektiivne vedelikkromatograaf).

**1.8.2. Uuritava aine põhilahus**

Uuritava ja standardaine põhilahuste valmistamiseks kasutatakse deioniseeritud vett (vt punkt 1.8.7, esimene lõik). Deioniseeritud vesi ei tohi sisaldada mikroorganismidele mürgiseid aineid ning üle 1 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku (6).

**1.8.3. Pinnavee võtmine ja vedu**

Pinnavee võtmise koht valitakse igal konkreetsel juhtumil vastavalt katse eesmärgile. Veevõtukohta valikul tuleb arvestada võimalikke varasemaid põllumajanduse, tööstuse või olmemõjusid. Kui on teada, et eelneva nelja aasta jooksul saastati veekogu uuritava ainega või selle struktuurianaloogidega, ei tohi sellest veekogust katseveett võtta, välja arvatud juhul, kui uurija eesmärk ongi lagunemiskiiruse kindlakstege mine eelnevalt saasteainega kokku puutunud keskkonnas. Veevõtu kohas mõõdetakse vee pH ja temperatuur. Registreeritakse proovivõtu sügavus ja antakse veeproovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus) (vt punkt 3). Aeroobsete tingimuste olemasolu tõendamiseks mõõdetakse hapnikusisaldus ja/või redokspotentsiaal vees ja setete pinnakihi, kui aeroobsete tingimuste olemasolu ei ole ilmne juba eelnevast kogemusest ning veevõtukohta laadist. Pinnavett veetakse täiesti puhtas nõus. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur oluliselt ületada katsetemperatuuri. Kui vedu kestab üle 2–3 tunni, soovitatakse proov jahutada temperatuurini 4 °C. Veeproovi ei tohi külmutada.

▼ **M1****1.8.4. Pinnavee hoidmine ja ettevalmistamine**

Katset on parem alustada üks ööpäev pärast proovivõttu. Kui vett on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ja ei tohi ületada nelja nädalat. Säilitamisel aereeritakse veeproovi 4 °C juures kuni kasutamiseni. Enne kasutamist kõrvaldatakse veeproovist suuremad tahked osakesed näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri, mille ava läbimõõt on umbes 100 µm, läbi suurepöörilise paberfiltri või sadestamisega.

**1.8.5. Sette lisamine veele (mittekohustuslik)**

Hõljumikatses vajaliku suspensiooni saamiseks lisatakse looduslikku vett sisaldavasse nõusse pindmist setet (mis on filtritud suuremate tahkete osakeste eemaldamiseks vastavalt punktile 1.8.4); suspendeeritud tahke aine sisaldus peab olema vahemikus 0,01–1 g/l. Pindmine sete peab pärinema veeprooviga samast kohast. Olenevalt konkreetsest veekeskkonnast võib pindmine sete olla suure orgaanilise süsiniku sisalduse (2,5–7,5 %) ja peeneteralise lõimisega või väikese orgaanilise süsiniku sisalduse (0,5–2,5 %) ja jämeteralise lõimisega (3). Pindmine sete valmistatakse ette järgmiselt: läbipaistva plasttoru abil võetakse mitu settesüdamikku; kohe pärast proovi võtmist lõigatakse ära iga südamiku ülemine aeroobne osa (kuni 5 mm paksune pindmine kiht) ja segatakse need osad kokku. Saadud setteproovi transportitakse nõus, mille ülaosas on palju õhuga täidetud ruumi, mis tagab settele aeroobsed tingimused (kui vedu kestab üle 2–3 tunni, jahutatakse nõu temperatuurini 4 °C). Setteproov suspendeeritakse uuritavas vees, nii et proovi ja vee suhe oleks 1:10, ja hõljumit aereeritakse 4 °C juures kuni kasutamiseni. Kui setet on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ega tohi ületada nelja nädalat.

**1.8.6. Poolpidev menetlus (mittekohustuslik)**

Kui uuritava aine olulist lagunemist on võimalik mõõta alles pärast pika ootefaasi möödumist, võib olla vajalik pikk inkubatsiooniperiood (mitu kuud). Kui see on teada uuritava ainega tehtud eelkatsetest, võib katse alguses kasutada poolpidevat režiimi, milles osa katseveest või hõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt 2. liide). Teine võimalus on muuta tavaline portskatse poolpidevaks pärast seda, kui umbes 60 katsepäevaga ei ole portsrežiimis saavutatud uuritava aine lagunemist (vt punkt 1.8.8.3, teine lõik).

**1.8.7. Uuritava aine (või standardaine) lisamine**

Kui uuritav aine lahustub vees hästi (> 1 mg/l) ja on vähelenduv (Henry konstant < 1 Pa·m<sup>3</sup>/mol või < 10<sup>-5</sup> atm·m<sup>3</sup>/mol), võib põhilahuse valmistada deioniseeritud vees (vt punkt 1.8.2); vajaliku kontsentratsiooni saamiseks lisatakse katsenõusse vajalik maht põhilahust. Lisatava põhilahuse maht peab olema võimalikult väike (< 10 % vedeliku lõppmahust, kui võimalik). Teine võimalus on lahustada uuritav aine suuremas mahus katsevees, seda võib käsitleda alternatiivina orgaanilise lahusti kasutamisele.

▼ **M1**

Äärmisel juhul võib lendumatu vähelahustuva aine põhilahuse valmistada lenduvas orgaanilises lahustis, kuid katsesüsteemi lisatava lahusti kogus ei tohi ületada 1 mahuprotsenti ja pärssida mikroorganismide aktiivsust. Lahusti ei tohi mõjutada uuritava aine stabiilsust vees. Lahusti eemaldatakse, kuni lahusesse jääv väga väike lahustikogus enam oluliselt ei suurenda lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust katsevees või -hõljumis. Selle kontrollimiseks tehakse ainespetsiifiline analüüs või, võimaluse korral, lahustunud orgaanilise süsiniku analüüs (6). Lisatava lahusti kogus peab olema võimalikult väike ja uuritav aine peab olema täielikult lahustunud katsevee lõppmahus. Uuritava aine lisamiseks katsenõusse võib kasutada ka teisi publikatsioonides (7, 8) kirjeldatud võtteid. Kui uuritava aine lisamiseks kasutatakse orgaanilist lahustit, tuleb lahusti mõju kontrolliks ette nähtud katseveega nõu (mis ei sisalda lisatud aineid) ja katseveega nõu, mis sisaldab lisatud standardainet, käidelda samal viisil kui tegelikku katsenõu, millesse on lisatud kandelahustis lahustatud uuritava aine. Lahusti mõju kontrollimise eesmärk on standardaine lagunemiskiiruse jälgimisega näidata, et lahusti ei pärsi mikroorganismide populatsiooni.

1.8.8. **Katsetingimused**1.8.8.1. *Katsetemperatuur*

Inkubeerimine toimub (eelistatavalt) valguse juurdepääsuta või hajuvalguses püsival temperatuuril ( $\pm 2$  °C), milleks võib olla välistemperatuur või standardtemperatuur (20–25 °C). Välistemperatuur võib olla kas tegelik proovi temperatuur proovi võtmisel või proovivõtukoha keskmine temperatuur.

1.8.8.2. *Loksutamine või segamine*

Et tahked osakesed ja mikroorganismid püsiks hõljumis, tuleb katsenõu pidevalt loksutada või segada. Loksutamine või segamine soodustab ka hapniku transporti nõus olevast õhust vedelikku, mis tagab nõutavate aeroobsete tingimuste püsimise. Katsenõud asetatakse plaatloksutile (ligikaudu 100 võnget minutis) või magnetsegajale. Loksutamine või segamine peab olema pidev. Loksutamine või segamine peab olema võimalikult nõrk, kuid tagama homogeense suspensiooni püsimise.

1.8.8.3. *Katse kestus*

Katse kestab tavaliselt kuni 60 ööpäeva, välja arvatud juhul, kui kasutatakse poolpidevat režiimi, milles katsehõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt punkt 1.8.6 ja 2. liide). Kui uuritava aine lagunemine algab 60 esimese katsepäeva jooksul, võib portskatset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani. Lagunemist kontrollitakse vajaliku aja tagant lahuses oleva  $^{14}\text{C}$  jääkaktiivsuse või eraldunud  $^{14}\text{CO}_2$  aktiivsuse määramisega (punkt 1.8.9.4) ja/või keemilise analüüsiga (punkt 1.8.9.5). Inkubatsiooniaeg peab olema piisav lagunemisprotsessi hindamiseks. Oleks hea, kui katses laguneks üle 50 % ainest; aeglaselt laguneva aine korral peab lagunema piisavalt palju (tavaliselt üle 20 %) ainet selleks, et hinnata lagunemise kiiruskonstanti.

▼ **M1**

Katsesüsteemis mõõdetakse korduvalt pH-d ja hapnikusisaldust, kui eelnevad samalaadsed katsed samast kohast võetud vee- ja setteproovidega ei ole näidanud, et sellist kontrollimist ei ole vaja. Mõnikord võib vees või settes palju kõrgemas kontsentratsioonis olevate primaarsete substraatide tarbimine põhjustada nii rohket CO<sub>2</sub> eraldumist ja hapnikukulu, et katse jooksul muutuvad oluliselt katsetingimused.

1.8.9. **Katse läbiviimine**1.8.9.1. *Nõude ettevalmistamine pelaagiliseks katseks*

Katsenõudesse pannakse sobiv kogus katseveet, nii et ligikaudu üks kolmandik nõu mahust oleks täidetud ja igas nõus oleks vähemalt 100 ml vett. Kui katse tehakse suure arvu nõudega (ja igal proovivõtuajal võetakse prooviks teatavate katsenõude kogu sisu), on katsevee vajalik maht samuti umbes 100 ml, sest liiga väike proovi maht võib mõjutada ootefaasi pikkust. Uuritav aine lisatakse põhilahusena, nagu on kirjeldatud punktides 1.8.2 ja 1.8.7. Lagunemise kineetika määramiseks ja lagunemise kiiruskonstandi arvutamiseks kasutatakse vähemalt kahte uuritava aine kontsentratsiooni, mille väärtused erinevad 5–10 korda. Mõlemad kontsentratsioonid peavad olema alla 100 µg/l ja eelistatavalt vahemikus 1–10 µg/l.

Katsenõud suletakse õhu- ja CO<sub>2</sub>-kindla korki või kaanega. <sup>14</sup>C-märgiseta lendumatu uuritava aine korral sobib mittetihe puuvillvatikork, mis hoiab ära saastumise õhu kaudu (vt punkt 1.8.1); seejuures peavad võimalikud peamised lagunemisproduktid olema teadaolevalt lendumatud ning CO<sub>2</sub> määratakse kaudselt (vt 3. liide).

Katsenõusid inkubeeritakse valitud temperatuuril (vt punkt 1.8.8.1). Keemiliseks analüüsiks või <sup>14</sup>C mõõtmisteks võetakse proovid katse alguses (enne biolagunemise algust; vt punkt 1.7.1) ja seejärel katse jooksul sobiva aja tagant. Proovivõtt seisneb kas igast paralleelnõust osaproovide võtmises (5 ml alikvoodid) või igal proovivõtuajal kogu katsenõu sisu ärakasutamises. Uuritava aine mineraliseerumist võib määrata kas kaudselt või otse (vt 3. liide). Kiiruskonstandi usaldusväärse hinnangu saamiseks on tavaliselt vaja lagunemisfaasi jooksul (pärast ootefaasi lõppu) võtta proovid vähemalt viie andmepunkti jaoks; kiiresti laguneva aine korral võib piirduda kolme punktiga, kui saab tõendada, et neist piisab. Kui uuritava aine ei lagune kiiresti, on lagunemisfaasi ajal kerge teha ka rohkem mõõtmisi, sellepärast tuleks kineetilise konstandi hindamiseks kasutada rohkem andmepunkte. Kuna biolagunemise kiirused on erinevad, ei saa kindlat proovivõtu ajagraafikut ette anda; aeglase lagunemise korral soovitatakse siiski võtta proove üks kord nädalas. Kui uuritava aine on kiiresti biolagundatav, tuleb kolmel esimesel katsepäeval võtta proov iga päev ja seejärel igal teisel või kolmandal päeval. Mõnikord, näiteks kui aine hüdrolüüsib väga kiiresti, võib olla vaja võtta proove iga tunni tagant. Enne katset soovitatakse teha eeluuring sobivate proovivõtuaegade kindlaksmääramiseks. Kui proove on vaja ka edasisteks keemilisteks analüüsideks, on soovitatav võtta rohkem proove ja seejärel valida katse lõpus analüüsivad proovid tagurpidises järjekorras, st viimaseid proove analüüsitakse esimestena (proovide stabiilsuse tagamise kohta säilitamise ajal vt punkt 1.8.9.5, teine lõik).

▼ **M1**1.8.9.2. *Katsenõude ja proovide arv*

Valmistatakse ette piisav arv katsenõusid, et oleksid:

- katsenõud: vähemalt kaks (parem kolm) paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil või (kui prooviks võetakse teatavate katsenõude kogu sisu) suur arv katsenõusid igal kontsentratsioonil (nõu tähis on  $F_T$ );
- katsenõud massibilansi arvutamiseks: vähemalt kaks paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil (nõu tähis on  $F_M$ );
- ilma uuritava aineta pimekatsenõu: vähemalt üks ainult katsevett sisaldav pimekatsenõu (nõu tähis on  $F_B$ );
- standardainega kontrollnõud: kaks paralleelnõu standardainega (nt aniliin või naatriumbensoaat, 10 µg/l) (nõu tähis on  $F_C$ ). Standardainega kontrollnõusid on vaja minimaalse mikroorganismide aktiivsuse olemasolu kinnitamiseks. Kui see on otstarbekohane, võib radiomärgisega standardainet kasutada ka siis, kui uuritava aine lagunemist jälgitakse keemilise analüüsiga;
- steriilsed kontrollnõud: üks või kaks steriliseeritud katseveega nõu, et kontrollida uuritava aine võimalikku abiootilist lagunemist või muud mittebioloogilist kadu (nõu tähis on  $F_S$ ). Bioloogilise aktiivsuse võib kõrvaldada katsevee autoklaavimise (121 °C, 20 minutit), mürgi lisamise (nt naatriumasiid ( $\text{NaN}_3$ ), 10–20 g/l, elavhõbe(II)kloriid,  $\text{HgCl}_2$ , 100 mg/l, või formaliin, 100 mg/l) või gammakiirituse abil. Kui kasutatakse  $\text{HgCl}_2$ , tuleb katsete jäätmed kõrvaldada mürgiste jäätmete eeskirjade kohaselt. Kui veele on lisatud rohkesti setet, on steriilsust raske saavutada; sellisel juhul soovitatakse näiteks kolmekordset autoklaavimist. Tuleb arvestada, et autoklaavimine võib mõjutada sette sorptsiooniomadusi.
- lahusti kontrollnõud, milles on katsevesi ja katsevesi standardainega: kaks paralleelnõu, mille sisule on lisatud lahustit samas koguses ja samal viisil kui uuritava aine lisamisel. Neid nõusid on vaja, et standardaine lagunemise määramisega kontrollida lahusti võimalikku kahjulikku mõju.

Katse planeerimisel peab uurija arvestama, et parem on teha rohkem paralleelkatseid kui suurendada proovivõtukordade arvu. Vajalike nõude täpne arv oleneb lagunemise mõõtmise meetodist (vt punkt 1.8.9.1, kolmas lõik; punkt 1.8.9.4 ja 3. liide).



▼ **M1**

Igal proovivõtuajal võetakse igast katsenõust kaks osaproovi (nt 5 ml alikvoodid). Kui kasutatakse suurt arvu nõusid ja prooviks võetakse katsenõu kogu sisu, moodustatakse iga proov vähemalt kahe nõu sisust (vt punkt 1.8.9.1, esimene lõige).

1.8.9.3. *Nõude ettevalmistamine hõljumikatseks (mittekohustuslik)*

Katsenõudesse lisatakse nõutav maht katsevett ja vajaduse korral setet (vt punkt 1.8.5). Hõljumikatse nõud valmistatakse ette samal viisil kui pelaagilise katse nõud (vt punktid 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Parem on kasutada seerumipudeleid või samalaadse kujuga nõusid. Suletud nõud asetatakse loksutile horisontaalselt.  $^{14}\text{C}$ -märgiseta lendumatu uuritava ainega avatud nõud pannakse muidugi püstasendisse; sel juhul soovitatakse kasutada magnetsegajat ja klaasiga kaetud magnetilisi segamispulkasid. Vajaduse korral aereeritakse pudeleid nõuetekohase õhustatuse tagamiseks.

1.8.9.4. *Radiokeemiline määramine*

Eraldunud  $^{14}\text{CO}_2$  mõõdetakse kaudselt ja otse (vt 3. liide).  $^{14}\text{CO}_2$  kaudseks määramiseks kasutatakse järgmist vahet: katsevees või -hõljumis leiduva  $^{14}\text{C}$  algaktiivsusest lahutatakse summaarne jääkaktiivsus proovivõtuhetkel, mis mõõdetakse pärast proovi pH viimist väärtuseni 2–3 ja  $\text{CO}_2$  eemaldamist. Kuna anorgaaniline süsinik eemaldatakse, pärineb mõõdetav jääkaktiivsus üksnes orgaanilisest materjalist. Kaudset  $^{14}\text{CO}_2$  määramist ei kasutata, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad (vt 3. liide). Võimaluse korral tuleb igal proovivõtul mõõta otse vähemalt ühest katsenõust eralduv  $^{14}\text{CO}_2$  (vt 3. liide); see meetod võimaldab kontrollida nii massibilansi kui ka biolagunemist, kuid seda saab rakendada ainult suletud nõus tehtava katse korral.

Katse jooksul eraldunud  $^{14}\text{CO}_2$  otseks mõõtmiseks valmistatakse katseks ette rohkem nõusid. Otsest  $^{14}\text{CO}_2$  määramist soovitatakse siis, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad. Iga andmepunkti saamiseks viiakse katsenõu sisu pH väärtuseni 2–3 ja  $^{14}\text{CO}_2$  kogutakse sise- või välisabsorberisse (vt 3. liide).

$^{14}\text{C}$ -märgisega uuritava aine ja oluliste muundumissaaduste kontsentratsioonid võib määrata kas radiokromatograafiliselt (õhukese kihi kromatograafia, radioloogiline õhukese kihi kromatograafia) või radiokeemilise detektsiooniga kõrgefektiivse vedelikkromatograafia abil.

Soovi korral võib määrata ka, kuidas on faaside vahel jaotunud jääkradioaktiivsus (vt 1. liide), lagunemata uuritav aine ja muundumissaadused.

**▼ M1**

Massibilansi kontrollimiseks mõõdetakse katse lõpus otseselt  $^{14}\text{CO}_2$ , kasutades selleks eraldi katsenõu, millest ei ole katse käigus proove võetud (vt 3. liide).

**1.8.9.5. Keemiline analüüs**

Tundliku analüüsimeetodi olemasolu korral võib esmase biolagunemise hindamiseks kasutada radioaktiivse märgistamise asemel uuritava aine jääkkontsentratsiooni mõõtmist. Kui mineraliseerumise ulatuse mõõtmiseks kasutatakse radiomärgisega ainet, võib paralleelselt teha ka keemilise analüüsi, mis võimaldab saada lisateavet ja kontrollida meetodit. Keemilist analüüsi võib kasutada ka uuritava aine lagunemise käigus tekkinud muundumissaaduste mõõtmiseks, seda soovitatakse ainete puhul, mille mineraliseerumise poolestusaeg on üle 60 ööpäeva. Igal proovivõtukorral mõõdetakse ning registreeritakse (absoluutsetes ühikutes ja protsendina algsisaldusest) uuritava aine ja muundumissaaduste kontsentratsioonid. Üldiselt tuleb identifitseerida iga muundumissaadus, mille sisaldus teataval proovivõtukorral on  $\geq 10\%$  uuritava aine algkontsentratsioonist; identifitseerimata jätmine peab olema mõistlikult põhjendatud. Kui teatava muundumissaaduse kontsentratsioon katse jooksul pidevalt kasvab, võib see osutada selle saaduse püsivusele; sellepärast tuleb kaaluda sellise saaduse identifitseerimist ka siis, kui selle kontsentratsioon ei ületa eespool märgitud piirmäära. Kui uuritav aine võib kiiresti abiootiliselt muunduda (nt hüdrolüüsuda), tuleb kaaluda muundumissaaduste analüüsimist steriilsete kontrollkatsete abil. Muundumissaaduste identifitseerimise ja sisalduse mõõtmise vajadust kaalutakse iga juhtumi puhul eraldi ja põhjendatakse katseprotokollis. Orgaanilise lahustiga ekstraheerimist rakendatakse asjaomase analüüsimeetodi juhiste kohaselt.

Kui analüüs toimub hiljemalt 24 tundi pärast proovi võtmist, hoitakse proovi õhukindlas nõus 2–4 °C juures (eelistatav). Pikemaks säilitamiseks külmutatakse proov temperatuurini alla –18 °C või konserveeritakse keemiliselt. Proovi konserveerimiseks ei soovitata hapestamist, sest hapestatud proov võib olla ebapüsiv. Kui proovi ei analüüsita 24 tunni jooksul ja seda on vaja kauem säilitada, tuleb teha säilivusuuring ja tõendada, et uuritavad keemilised ained on temperatuuril alla –18 °C või konserveeritult säilitamisel stabiilsed. Kui asjaomane analüüsimeetod hõlmab ekstraheerimist lahustiga või tahkefaas-ekstraheerimist, tuleb aine ekstraheerida kohe pärast proovi võtmist või pärast proovi säilitamist külmutatult kuni 24 tundi.

Analüüsimeetodi tundlikkusest olenevalt võib olla vaja võtta suuremaid proove, kui on märgitud punktis 1.8.1. Katset on kerge teha 2–3-liitristes nõudes: igasse nõusse pannakse 1 liiter katsevett ja võetakse umbes 100-milliliitriseid proove.

▼ **M1****2. KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE****2.1. ANDMETE TÖÖTLEMINE****2.1.1. Andmete graafiline esitamine**

Proovivõtuajad ümardatakse täistundideks (välja arvatud juhul, kui aine laguneb oluliselt minutite või tundide jooksul), mitte täisööpäevadeks. Uuritava aine jääkaktiivsuse ( $^{14}\text{C}$ -märgisega aine) või jääkkontsentratsiooni (märgistamata aine) hinnatud väärtused esitatakse sõltuvalt ajast graafiliselt nii lineaarses kui ka poollogaritmilises skaalas (vt joonised 1a ja 1b). Kui on toimunud lagunemine, võrreldakse nõudega  $F_T$  saadud tulemusi nendega, mis on saadud nõudega  $F_S$ . Kui uuritava ainega nõude ( $F_T$ ) puhul saadud tulemuste keskvärtus erineb steriilsete nõudega ( $F_S$ ) saadud keskvärtusest vähem kui 10 %, võib oletada, et täheldatud lagunemine on valdavalt abiootiline. Kui lagunemise määr nõudes  $F_S$  on väiksem, siis võib neid andmeid kasutada nõudes  $F_T$  toimunud biolagunemise määra hindamisel parandina (vastav arv lahutatakse). Kui tehakse mittekoostuslik oluliste muundumissaaduste analüüs, esitatakse lisaks uuritava aine vähenemise graafikule ka muundumissaaduste tekkimist ja kadumist kajastavad graafikud.

Ootefaasi kestuse  $t_L$  hindamiseks ekstrapoleeritakse lagunemiskõvera (poollogaritmilise graafiku) lineaarne osa null-lagunemise tasemeni või määratakse ligikaudu 10 % lagunemise aeg (vt joonised 1a ja 1b). Poollogaritmiliselt graafikult leitakse esimest järku kiiruskonstandi  $k$  ja selle standardhälbe hinnang, kasutades lineaarset regressiooni  $\ln$  ( $^{14}\text{C}$  jääkaktiivsus või uuritava aine jääkkontsentratsioon) vs. aeg. Eriti  $^{14}\text{C}$  mõõtmise puhul tuleb kasutada ainult neid andmeid, mis kuuluvad ootefaasile järgnevasse lagunemiskõvera esimesse lineaarsesse osasse; paljude suure määramatusega andmete asemel on parem koguda väiksem arv representatiivseid andmeid. Antud juhul hõlmab määramatus vigu, mis on seotud mõõdetud  $^{14}\text{C}$  jääkaktiivsuse soovitatud otsese kasutamisega (vt edaspidi). Kui lagunemine on kahefaasiline, on mõnikord vaja arvutada kaks kiiruskonstanti. Selleks määratakse kindlaks lagunemiskõvera kaks faasi. Kui ühest ja samast nõust võetakse osaproove, arvutatakse kiiruskonstant  $k$  ja poolestusaeg  $t_{1/2} = \ln 2/k$  iga paralleelnõu jaoks eraldi; kui igal proovivõtukorral võetakse prooviks katsenõu kogu sisu, arvutatakse need parameetrid keskvärtuste alusel (vt punkt 1.8.9.2, viimane lõik). Esimese meetodi korral esitatakse iga paralleelnõu jaoks leitud kiiruskonstant ja poolestusaeg ning nende keskvärtused koos standardhälvetega. Uuritava aine kõrge kontsentratsiooni puhul võib lagunemiskõver (poollogaritmiline graafik) sirgjoonest märkimisväärselt kõrvale kalduda ja esimest järku kineetika ei kehti. Sel juhul ei ole poolestusaja määramisel mõtet. Piiratud andmevahemikus saab siiski rakendada pseudo-esimest järku kineetikat ja määrata poollagunemisaeg  $DT_{50}$  (aeg, mille jooksul laguneb 50 % ainest). Ent tuleb silmas pidada, et  $DT_{50}$  abil ei saa ennustada lagunemise ajalist kulgu väljaspool valitud andmevahemikku, sest  $DT_{50}$  iseloomustab ainult valitud andmekogumit. Kuna statistilisi arvutusi ja kõverate lähendamist hõlbustavad analüüsiprogrammid on kergesti kättesaadavad, on soovitatav kasutada asjaomast tarkvara.

▼ **M1**

Kui kasutatakse keemilist analüüsi, määratakse esmase lagunemise kiiruskonstant ja poolestusaeg samal viisil, nagu kirjeldati eespool mineraliseerumise üldmäära mõõtmise puhul. Kui esmane lagunemine on limiteeriv protsess, võib mõnikord kasutada ka lagunemise üldmäära iseloomustavaid andmepunkte. Seda võib teha, kuna  $^{14}\text{C}$  aktiivsuse mõõtmisest erinevalt on antud juhul otsene mõõtmine.

Kui kasutatakse  $^{14}\text{C}$ -märgisega ainet, koostatakse vähemalt katse lõpus massibilanss, mis väljendatakse lisatud aine algkontsentratsioonina protsentides.

2.1.2. **Jääkaktiivsus**

Orgaanilise aine  $^{14}\text{C}$ -märgisega osa lagunemisel läheb suurem osa isotoobist  $^{14}\text{C}$  üle  $^{14}\text{CO}_2$ -ks; muu osa kasutatakse biomassi kasvatamiseks ja/või rakuväliste ainevahetussaaduste sünteesimiseks. Järelikult ei muundu aine täielikult „lõplikul“ biolagunemisel kogu tema süsinik  $^{14}\text{CO}_2$ -ks. Biosünteesi produktidesse seotud  $^{14}\text{C}$  vabaneb aeglaselt  $^{14}\text{CO}_2$ -na hiljem toimuval teisesel mineraliseerumisel. Graafikutel, mis kajastavad orgaanilise  $^{14}\text{C}$  jääkaktiivsuse (mõõdetakse pärast  $\text{CO}_2$  eemaldamist) või eraldunud  $^{14}\text{CO}_2$  aktiivsuse sõltuvust ajast, esineb sellepärast pärast lagunemise lõppu järelfaas. See raskendab andmete kineetilist tõlgendamist ja sellepärast kasutatakse lagunemise kiiruskonstandi määramiseks tavaliselt ainult kõvera esimest osa, mis järgneb ootefaasile ja lõpeb enne, kui on lagunenu umbes 50 % ainek. Kui uuritav aine laguneb, on orgaanilise  $^{14}\text{C}$  üldine jääkaktiivsus alati suurem kui lagunemata uuritava ainega seotud  $^{14}\text{C}$  aktiivsus. Kui uuritava aine lagunemine on esimest järku reaktsioon ja  $\text{CO}_2$ -ni mineraliseerub konstantne osa  $\alpha$ , on  $^{14}\text{C}$  kadumise kõvera (summaarne orgaaniline  $^{14}\text{C}$  vs. aeg) algtõus võrdne  $\alpha$  ja uuritava aine (täpsemalt, uuritava aine  $^{14}\text{C}$ -märgisega osa) kontsentratsiooni kajastava kõvera tõusu korrutisega. Järelikult, kui kasutatakse orgaanilise  $^{14}\text{C}$  summaarse aktiivsuse mõõtmise tulemusi ilma parandusteta, on arvatud lagunemise kiiruskonstant tegeelikust väiksem. Mitmesugustel lihtsustavatel eeldustel põhinevaid meetodeid, kuidas mõõdetud radiokeemilise aktiivsuse järgi hinnata uuritava aine kontsentratsiooni, on kirjeldatud reas publikatsioonides (2, 9, 10, 11). Neid meetodeid on kõige lihtsam kasutada kiiresti lagundatavate ainete puhul.

2.2. **TULEMUSTE TÕLGENDAMINE**

Kui selgub, et k ei olene lisatud aine kontsentratsioonist (st uuritava aine eri kontsentratsioonidel arvutatakse enam-vähem ühesugused k väärtused), siis võib järeldada, et see esimest järku kiiruskonstant tõesti kirjeldab seda reaktsiooni kasutatud katsetingimustes (uuritav aine, veeproov, katsetemperatuur). Kui võrd saadud tulemust võib üldistada või ekstrapoleerida muudele süsteemidele, tuleb selgitada eksperdi hinnangu. Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni ja lagunemine ei järgi esimest järku kineetikat, ei saa katseandmeid kasutada esimest järku kiiruskonstandi või vastava poolestusaja otseseks määramiseks. Uuritava aine kõrge kontsentratsioonil saadud katseandmeid võib siiski kasutada mineraliseerumise üldmäära hindamiseks ja/või muundumissaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks kirjeldamiseks.

▼ **M1**

Kui on teada, millise kiirusega toimuvad teised aine kadu põhjustavad protsessid peale biolagunemise (nt hüdroolüüs või lendumine), võib biolagunemise ligikaudse kiiruse hindamisel lahutada need kiirused katses mõõdetud üldkiirusest. Andmeid hüdroolüüsi kohta võib saada näiteks steriilselt kontrollkatsest või kõrgemal uuritava aine kontsentratsioonil tehtud paralleelkatsest.

$^{14}\text{CO}_2$  kaudset ja otsest määramist (punkt 1.8.9.4 ja 3. liide) võib kasutada ainult selleks, et mõõta uuritava aine mineraliseerumist  $\text{CO}_2$ -ni.  $^{14}\text{C}$ -märgisega uuritava aine kontsentratsiooni ja oluliste muundumissaaduste tekke analüütiliseks määramiseks võib kasutada radiokromatograafiat (radioloogilist õhukese kihi kromatograafiat) või kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (punkt 1.8.9.4, kolmas lõik). Poolestusaega saab otse määrata juhul, kui lagunemisel ei teki olulisi muundumissaadusi (definiitsiooni kohaselt loetakse oluliseks muundumissaaduseks ainet, mille kontsentratsioon on vähemalt 10 % uuritava aine algkontsentratsioonist). Kui sellised olulised muundumissaadused siiski tekivad, tuleb andmeid üksikasjalikult hinnata. Selleks võib olla vaja muundumissaadusi korduvalt määrata ja/või identifitseerida (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik), välja arvatud juhul, kui muundumissaaduste edasist käitumist saab kogemuste (nt lagunemisteed käsitlevate andmete) alusel põhjendatult hinnata. Kuna see, millises ulatuses uuritava aine süsinik muundub  $\text{CO}_2$ -ks, sõltub oluliselt uuritava aine ja muude substraatide kontsentratsioonist, katsetingimustest ja mikroobikooslusest, ei saa kõnesoleva katsega, erinevalt lahustunud orgaanilise süsiniku kao mõõtmisest, otse määrata lõplikku biolagunemist, kuid tulemus on respiromeetrilise katse tulemusega sarnane. Mineraliseerumise määr on järelikult lõpliku biolagunemise minimaalsest tasemest väiksem või sellega võrdne. Täielikuma pildi saamiseks lõplikust biolagunemisest (mineraliseerumine ja sidumine biomassi) tehakse katse lõpus  $^{14}\text{C}$  faasi-jaotuse analüüs (vt 1. liide). Tahkete osakeste puuli seotud  $^{14}\text{C}$  jaguneb baktermassi seotud  $^{14}\text{C}$ -ks ja orgaanilistele tahketele osakestele sorbeerunud  $^{14}\text{C}$ -ks.

## 2.3. KATSE VASTAVUS NÕUETELE

Kui standardaine ei lagune eeldatud aja jooksul (aniliini ja naatriumbensoaadi eeldatav lagunemisaeg on tavaliselt alla kahe nädala), on katse nõuetelevastavus kaheldav ja vajab tõendamist; teine võimalus on korrata katset uue veeprooviga. Käesoleva meetodi kontrollimisel seitsme Euroopa labori vahelises ISO võrdluskatses oli aniliini lagunemise kiiruskonstandi väärtus 20 °C juures pärast kohanemisfaasi vahemikus 0,3–1,7 ööpäev<sup>-1</sup>, keskvärtus 0,8 ööpäev<sup>-1</sup> ja standardhälve ± 0,4 ööpäev<sup>-1</sup> ( $t_{1/2}$  = 0,9 ööpäeva). Ootefaas oli tavaliselt 1–7 ööpäeva. Kontrollitud veeproovides registreeriti bakterbiomassi sisalduseks  $10^3$ – $10^4$  kolooniaid moodustavat üksust ühes milliliitris. Toitainerikastes Kesk-Euroopa veeproovides oli lagunemiskiirus suurem kui Põhja-Euroopa oligotroofsetes veeproovides; see võib olla tingitud kas erinevast troofsusest või erinevustest varasemas kokkupuutumises keemiliste ainetega.

Radiomärgisega ainete korral peaks kogu määramissaagis (massibilanss) katse lõpus olema 90–110 %; märgiseta ainete korral peaks algfaasi määramissaagis katse alguses olema 70–110 %. Need saagisevahemikud on esitatud siiski üksnes sihtvahemikena ja neid ei tule kasutada katse nõuetele vastavuse kriteeriumina.

**▼ M1****3. KATSEPROTOKOLL**

Katseprotokollis märgitakse selgesti, kas tegemist on pelaagilise või hõljumikatsega; lisaks sellele esitatakse vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine ja standardaine (standardained):

- uuritava aine ja standardaine tavanimetused, keemilised nimetused (soovitavalt IUPACi ja/või CASi nimetused), CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse <sup>14</sup>C asukoht) ning olulised füüsikalised-keemilised omadused (vt punktid 1.5 ja 1.6);
- muundumissaaduste identifitseerimise ja mõõtmise standarditena kasutatud ainete keemilised nimetused, CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse <sup>14</sup>C asukoht) ning olulised füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava aine ja standardaine puhtusaste (lisandid);
- märgisega kemikaalide radiokeemiline puhtusaste ja eriaktiivsus (vajaduse korral).

Pinnavesi:

Võetud veeproovi kohta esitatakse vähemalt järgmised andmed:

- proovivõtukohta asukoht ja kirjeldus, kaasa arvatud saastelugu (võimaluse korral);
- proovivõtu kuupäev ja aeg;
- toitainesisaldus (üldlämmastik, ammoonium, nitritid, nitraadid, üldfosfor, lahustunud ortofosfaat);
- proovivõtu sügavus;
- proovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus);
- lahustunud ja summaarne orgaaniline süsinik;
- biokeemiline hapnikutarve;
- proovi võtmisel kohapeal määratud temperatuur ja pH;
- hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega);
- soolsus või juhtivus (mere- või riimvee puhul);
- hõljumisisaldus (häguse proovi puhul);
- proovivõtu asukohta käsitlev muu asjakohane teave, mis oli teada proovivõtu ajal (nt andmed jõe voolu- või merehoovuse kiiruse kohta proovi võtmise ajal või varem, naabruses esinenud suured heited ja nende laad, proovivõtule eelnenud ilmastikutingimused);

ning järgmised mittekohustuslikud andmed:

- mikroorganismide biomass (nt otse loendatud akridiinoranžiga värvunud rakkude arv või kolooniaid moodustavate üksuste arv);

▼ **M1**

- anorgaaniline süsinik;
- klorofüll a kontsentratsioon, mis on vetikate biomassi kajastav spetsiifiline näitaja.

Hõljumikatse korral esitatakse lisaks veel järgmised andmed sette kohta:

- setteproovi võtmise sügavus;
- sette väline iseloomustus (värvunud, muda-, aleuriit- või liivsete);
- lõimis (jämeteralise liiva, peeneteralise liiva, aleuriidi ja savi protsent);
- hõljuvaine kuivmassi sisaldus, g/l; orgaanilise süsiniku üldsisaldus või põletuskadu, mis on orgaanilise aine sisalduse näitaja;
- pH;
- hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega).

Katsetingimused:

- proovivõtust katseni möödunud ajavahemik, proovi hoidmine ja ettevalmistamine, katsekuupäevad;
- lisatud uuritava aine kogus, kontsentratsioon katses ja standardaine;
- uuritava aine lisamise viis, kaasa arvatud lahusti kasutamine;
- kasutatud pinnavee ja sademe maht ning iga proovivõtukorra puhul analüüsitud osaproovi maht;
- kasutatud katsesüsteemi kirjeldus.

Kui katse ei toimunud valguse juurdepääsuta, märgitakse hajuvalgustuse tingimused;

- teave steriilsete kontrollkatsete ettevalmistamise kohta (autoklaavimise temperatuur, aeg ja kordade arv);
- inkubatsioonitemperatuur;
- analüüsimeetodid ja radiokeemilise mõõtmise meetodid, massibilansi kontrollimiseks ja faasijaotuse mõõtmiseks (kui mõõdeti) kasutatud meetodid.
- paralleelkatsete arv.

Tulemused:

- saagis protsentides (vt punkt 1.7.1);
- kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus, kaasa arvatud avastamislävi ja mõõtmislävi (vt punkt 1.7.2);

**▼ M1**

- kõik mõõtmistulemused (koos proovivõtuaegadega) ja arvutatud väärtused esitatakse tabelina ja lagunemiskõverad graafiliselt; iga uuritava kontsentratsiooni ja iga paralleelnõu jaoks esitatakse logaritmilise graafiku tõusu iseloomustav lineaarse korrelatsiooni koefitsient, hinnanguline ootefaasi kestus ning (võimaluse korral) esimest järku või pseudo-esimest järku kiiruskonstant ja vastav poollagunemisaeg (või poolestusaeg,  $t_{50}$ );
- asjaomased väärtused (ootefaasi kestus, lagunemise kiiruskonstant, poollagunemisaeg või poolestusaeg,  $t_{50}$ ) esitatakse üksikute paralleelkatsete tulemuste keskmisena;
- lagunemiskõvera laadi ja uuritava aine kontsentratsiooni võimaliku mõju alusel liigitatakse katsesüsteem kohanenud või kohanemata süsteemiks;
- lõpliku massibilansi kontrolli ja faasijaotuse mõõtmiste tulemused;
- mineraliseerunud  $^{14}\text{C}$  osa ja esmase lagunemise lõpptase (kui see määrati analüüsiga);
- (vajaduse korral) lisatud ainete ja oluliste muundumissaaduste identifitseerimisandmed, molaarne kontsentratsioon ja protsent (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik);
- oletatav muundumistee (vajaduse korral);
- tulemuste arutelu.

**4. KIRJANDUS**

- 1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.
- 2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
- 3) Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.
- 4) Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.
- 5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.
- 6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
- 7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- 8) OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).



**▼ M1**

- 9) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.*47, 394–401.
- 10) Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of <sup>14</sup>C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274–283.
- 11) ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼ **M1***1. liide***<sup>14</sup>C jaotus faaside vahel**

Lisaks tavalistele orgaanilise <sup>14</sup>C jääkaktiivsuse mõõtmistele määratakse meetodi kontrollimiseks ka massibilanss, mille puhul mõõdetakse eraldunud <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> otse pärast selle püüdmist absorberisse (vt 3. liide). <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> eraldumine on biolagunemise otsene tõend, kuna abiootilisel lagunemisel või muude kaomehhanismide, nagu lendumise või sorptsiooni korral seda ei esine. Kasulikku lisateavet biolagunemise kohta annab mõõtmine, kuidas summaarne orgaaniline süsinik on jaotunud lahusefaasi (lahustunud orgaanilise <sup>14</sup>C aktiivsus) ja osakeste faasi (tahkete osakestega seotud orgaanilise <sup>14</sup>C aktiivsus) vahel; tahked osakesed eraldatakse membraanfiltrimise või tsentrifuugimisega. Tahkete osakestega seotud orgaanilise <sup>14</sup>C aktiivsusesse annavad panuse mikroobide biomassile ja muudele tahketele osakestele sorbeerunud uuritav aine ja uuritavast aimest pärinev süsinik, mida on kasutatud uue rakumaterjali sünteesiks ja seotud tahkete osakestena esineva biomassi fraktsiooni. Lahustunud orgaaniline <sup>14</sup>C määratakse biolagunemise lõpus (köveral lagunemine vs. aeg esineva platoo järgi).

Et valitud proovis määrata <sup>14</sup>C jääkaktiivsuse jaotus faaside vahel, filtritakse proov läbi membraanfiltrit poori suurusega 0,22 või 0,45 µm, mis on valmistatud uuritavat ainet praktiliselt mitteadsorbeerivast materjalist (võib sobida polükarbonaatfilter). Kui uuritava aine sorptsioon filtrile (kontrollitakse enne katset) on nii tugev, et seda ei saa jätta arvestamata, võib filtrimise asemel kasutada suure kiirendusega tsentrifuugimist (2 000 g; 10 min).

Filtraati või tsentrifugaati käideldakse 3. liites filtrimata proovi puhul kirjeldatud viisil. Membraanfilter lahustatakse sobivas stsintillatsioonivedelikus ja aktiivsus loendatakse tavalisel viisil, kusjuures kasutatakse kas ainult välisstandardi suhte meetodil saadud kustumisparandit või proovi oksüdeerijat. Tsentrifugimise korral resuspendeeritakse tahkete osakeste sade 1–2 ml destilleeritud vees ja asetatakse stsintillatsioonipudelis. Tsentrifugitopsi pestakse kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja pesuveed lisatakse stsintillatsioonipudelis. Vajaduse korral võib hõljumi fikseerida vedelikstsintillatsiooniloendamiseks ettenähtud geeli.

▼ **M1**

## 2. liide

**Poolpidev meetod**

Raskesti lagunevate ainete piisavaks lagundamiseks võib olla vajalik kuudepikune inkubeerimine. Kui esmase veeproovi omaduste säilitamiseks katsehõljumit ei uuendata, ei peaks katse kestus ületama tavaliselt 60 ööpäeva. Kui uuritava aine lagunemine algab esimese 60 ööpäeva jooksul, võib katset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani katsehõljumit uuendamata.

Mitmesuguste kaomehhanismide ning veeproovis leiduvate asendamatute toitainete ja esmaste süsiniksubstraatide ammendumise tõttu võib pika inkubatsiooniaja jooksul väheneda mikroobikoosluse mitmekesisus. Sellepärast soovitatakse aeglaselt lagunevate ainete lagunemiskiiruse nõuetekohaseks määramiseks kasutada poolpidevat katset. Kui kogemuste põhjal võib eeldada, et 20 % aine lagunemiseks on proovi vaja inkubeerida kolm kuud, tuleb katset alustada poolpidevas režiimis. Kui katset on alustatud portsrežiimis ja umbes 60 ööpäevaga ei ole nõutavat lagunemise määra saavutatud, võib hariliku portsrežiimi asendada poolpideva režiimiga. Kui on registreeritud oluline lagunemine (> 20 %), võib poolpideva režiimi peatada ja jätkata katset portsrežiimis.

Poolpideva katse puhul vahetatakse iga kahe nädala tagant umbes üks kolmandik katsehõljumi mahust värskest võetud veega, millele on lisatud uuritavat ainet algkontsentratsioonini. Ka mittekohustusliku hõljumikatse korral lisatakse vahetusveele setet algkontsentratsioonini (0,01–1 g/l). Hõljumikatse puhul on oluline, et ka veevahetuse jooksul säiliks täielikult suspendeeritud süsteem ning tahke aine ja vee viibeajad oleksid samad, vastasel juhul läheks kaduma taotletud sarnasus homogeense, fikseeritud faasideta veesüsteemiga. Sellepärast tuleks poolpideva režiimi kasutamisel valida suspendeeritud sette kontsentratsioon pigem selle vahemiku madalamas osas.

Uuritava aine lisamine ettenähtud viisil tähendab, et katsesuspensiooni osalisel uuendamisel ei ületata uuritava aine algkontsentratsiooni ja järelikult välditakse kõrge uuritava aine kontsentratsiooni puhul sageli esinevat kohanemisfaasi. Kuna katse käigus toimub nii reinokuleerimine kui ka ammendatud toitainete ja esmaste substraadivarude täiendamine, taastatakse algne mikroobikoosluse mitmekesisus ja katset võib põhimõtteliselt pikendada lõpmatult. Poolpideva režiimi kasutamisel on oluline silmas pidada, et uuritava aine jääkkontsentratsioonis tuleb teha parandid, mis arvestavad iga veevahetusega lisatud ja eemaldatud uuritava aine koguseid. Vähesorbeeruva aine puhul ei ole vaja teha vahet lahustunud uuritava aine kontsentratsiooni ja uuritava aine üldkontsentratsiooni vahel. Ainete puhul, mille  $\log K_{ow} < 3$  (ja tegemist on neutraalse lipofiilse ühendiga), on ettenähtud tingimustes (tahke aine sisaldus 0,1–1 g/l) sorptsioon tähtsusetu (< 5 %). Seda selgitab järgmine arvutusnäide. Tahke aine sisaldus 0,1 g/l vastab süsiniku sisaldusele ligikaudu 10 mg/l (süsiniku osa,  $f_c = 0,01$ ). Eeldame, et

uuritava aine  $\log K_{ow} = 3$ ,

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

$$\text{jaotuskoeffitsient } K_d = f_c \times K_{oc},$$

järelikult avaldub üldkontsentratsiooni lahustunud fraktsioon (C-vesi ( $C_w$ )/C-üld ( $C_t$ )) järgmiselt:

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

▼ **M1**

## 3. liide

**<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> määramine****<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> kaudne määramine**

Kui uuritav aine ei ole lenduv ega muundu lenduvateks muundumissaadusteks, on standardsete mõõtmiste korral kaudne meetod tavaliselt kõige väiksemat ajakulu nõudev ja kõige täpsem. Filtrimata 5-milliliitrised proovid pannakse lihtsalt stsintillatsioonipudelitesse. Sobiv proovi algaktiivsus on 5 000 – 10 000 lagunemist minutis (80–170 Bq) ja minimaalne algaktiivsus umbes 1 000 lagunemist minutis. Pärast 1–2 tilga kontsentreeritud H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> või HCl lisamist keskkonna hapestamiseks pH-ni 2–3 eraldatakse CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> eraldamiseks võib barboteerida õhku läbi proovi ligikaudu ½–1 tunni jooksul. Teine võimalus CO<sub>2</sub> eraldamiseks on loksutada proovi tugevasti 1–2 tundi (mikroplaatloksutil) või loksutada mõõdukalt hommikuni. CO<sub>2</sub> eraldumise täielikkust on vaja kontrollida (selleks pikendatakse barboteerimise või loksutamise aega). Seejärel lisatakse veeproovide puhul loendamiseks sobiv stsintillatsioonivedelik, proov homogeniseeritakse keerissegistil ja määratakse radioaktiivsus vedelikstsintillatsiooniloenduse abil, millest lahutatakse pimekatses leitud taustaktiivsus (F<sub>B</sub>). Kui katsevesi ei ole väga tugevasti värvunud ja tahkete osakeste sisaldus ei ole ülemäära suur, on kustumine kõigi proovide puhul tavaliselt ühetaoline ja piisab välisstandardi abil leitud kustumisparandist. Kui katsevesi on tugevasti värvunud, võib kustumisparandi leidmiseks olla vajalik sisestandardi lisamine. Suure tahkete osakeste sisalduse korral võib homogeense lahuse või geeli saamine olla võimatu või kustumine võib erinevates proovides olla väga erinev. Sellisel juhul võib kasutada järgmist suspensioonide uurimiseks mõeldud loendusmeetodit. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> kaudseks mõõtmiseks hõljumikatses eraldatakse faasid, tsentrifuugides 10 ml katsevee/katsehõljumi homogeenset proovi sobival kiirendusel (40 000 m/s<sup>2</sup>, 15 minutit). Veefaasi käideldakse eespool kirjeldatud viisil. <sup>14</sup>C aktiivsuse määramiseks tahkete osakeste faasis (tahkete osakestega seotud orgaanilise <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aktiivsus) resuspendeeritakse sade väikeses koguses destilleeritud vees, kantakse suspensioon üle stsintillatsioonipudelitesse ja lisatakse geeli moodustav stsintillatsioonivedelik (selleks on müügil spetsiaalsed stsintillatsioonivedelikud). Olenevalt tahkete osakeste laadist (nt orgaanilise aine sisaldusest) võib proovi digereerida koosolubilisatoriga hommikuni, homogeniseerida keerissegistil ja lisada seejärel stsintillatsioonivedelik. Tahkete osakestega seotud orgaanilise <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aktiivsuse määramiseks võib sademe ka põletada hapniku liias proovi oksüdeerija juuresolekul. Sellisel juhul tuleb alati kasutada sisestandardit, kusjuures kustumisparandite arvestamiseks võib olla vaja lisada sisestandard igale proovile eraldi.

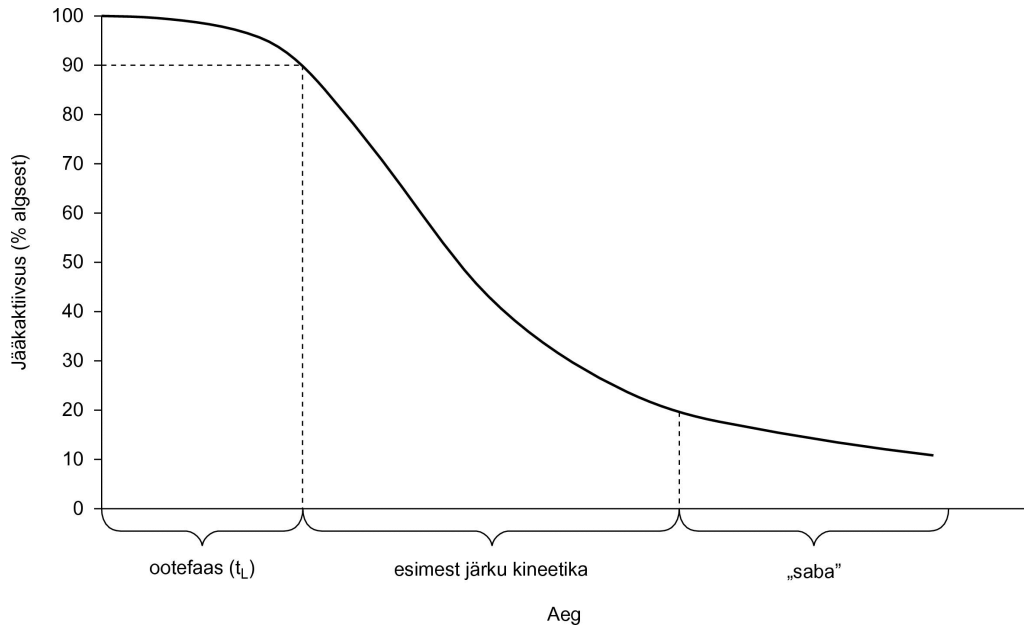
**<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> otsemääramine**

Kui eraldunud <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> määratakse otse, tuleb katseks ette valmistada rohkem nõusid ja võtta iga mõõtepunkti puhul prooviks ühe katsenõu kogu sisu, hapestada see pH-ni 2–3 ja koguda <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> siseabsorberisse (pannakse igasse katse nõusse katse alguses) või välisabsorberisse. Absorbeeriva keskkonnana võib kasutada leelist (1 N NaOH lahus või NaOH graanulid), etanoolamiini või mõnda etanoolamiini baasil valmistatud müügil olevat absorbenti. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> otsemõõtmise korral peavad katsenõud olema suletud butüülkummist septumitega.

▼ M1

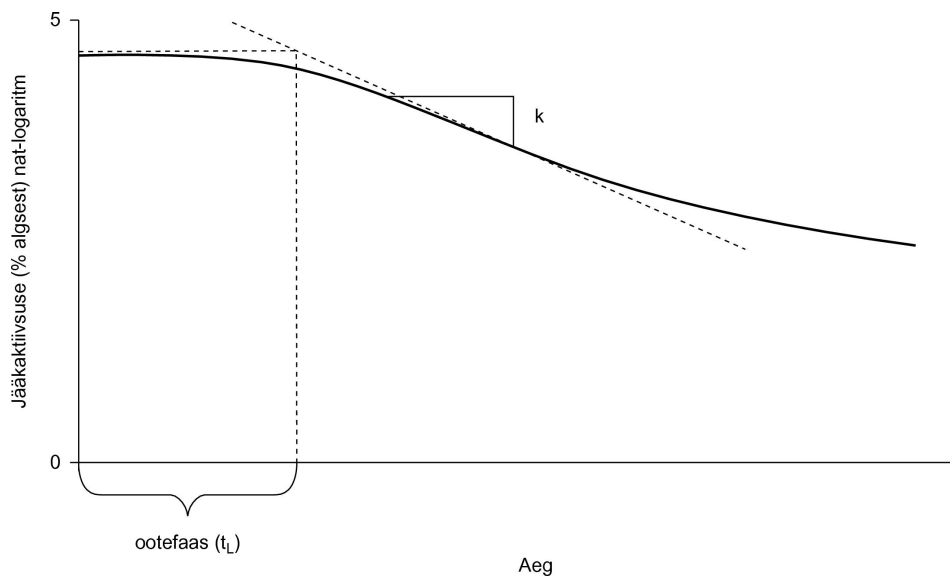
Joonis 1a

Naturaalses teljestikus (jäakaktiivsus vs. aeg) esitatud katseandmete näide



Joonis 1b

Poollogaritmilises teljestikus (naturaallogaritm jäakaktiivsusest vs. aeg) esitatud katseandmete näide



▼ **M6****C.26. PEREKONNA *LEMNA* TAIMEDE KASVU PIDURDUMISE KATSE**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 221 (2006). Meetod on ette nähtud kemikaalide mürgisuse hindamiseks perekonna *Lemna* (lemmel) mageveetaimedel. See põhineb olemasolevatel meetoditel (1, 2, 3, 4, 5, 6), kuid hõlmab neis tehtud muudatusi, mis kajastavad viimaste teadusuuringute ja mitut põhiküsimust käsitleva arutelu tulemusi. Käesolev katsemeetod on valideeritud rahvusvahelise võrdlusuuringuga (7).
2. Meetodis kirjeldatakse mürgisuse hindamist liikidel *Lemna gibba* ja *Lemna minor*, mida on põhjalikult uuritud ja mida kasutatakse eespool osutatud standardite kohaste katseobjektidena. Suurest fenotüübilisest varieeruvusest tulenevalt on *Lemna* liikide taksonoomia keeruline. Ehkki *Lemna* puhul võib täheldada geneetilist varieeruvust taimede tundlikkuses mürgistele kemikaalidele, ei ole selle varieeruvuse kohta praegu piisavalt andmeid, et soovitada kasutada käesoleva meetodi puhul mõnda konkreetset klooni. Tuleks silmas pidada, et katses ei kasutata puhaskultuuri, kuid eri katsetappides võetakse meetmeid muude organismidega saastumise minimeerimiseks.
3. Meetodis kirjeldatakse katse üksikasju uuendatava katselahuse (poolstaatiline või läbivoolurežiim) ja mitteuuendatava katselahuse (staatiline režiim) kasutamisel. Olenevalt katse eesmärgist ja regulatiivsetest nõuetest on soovitatav kaaluda poolstaatilise või läbivoolurežiimi kasutamist näiteks selliste kemikaalide puhul, mis kaovad lahusest kiiresti lendumise, fotolagunemise, sadenemise või biolagunemise tõttu. Täiendavad juhised on esitatud allikas 8.
4. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

5. Perekonna *Lemna* taimede eksponentsiaalselt kasvavatel monokultuuridel lastakse seitsme ööpäeva jooksul kokku puutuda eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga. Katse eesmärk on kirjeldada valitud mõõdetava muutuja alusel kvantitatiivselt kemikaali mõju vegetatiivsele kasvule nimetatud perioodi jooksul. Peamine mõõdetav muutuja on tallsujate võsude arv. Kuna mõni kemikaal võib mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju rohkem kui tallsujate võsude arvu, hinnatakse peale selle veel vähemalt ühte mõõdetavat muutujat (tallsujate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass). Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kasvuga kontrollrühmas ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi  $x$  (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $EC_x$  (nt  $EC_{50}$ ).
6. Katse lõppnäitaja on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse mõõdetava muutuja logaritmitud väärtuse suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmiste kasvu erikiiruste põhjal tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille puhul kasvukiirus väheneb teatud kindla protsendi  $x$  (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $E_rC_x$  (nt  $E_rC_{50}$ ).
7. Käesoleva meetodi puhul kasutatakse süsteemi vastust iseloomustava muutuja ka saagist, mille määramine võib olla vajalik mõnes riigis kehtivate regulatiivsete erinõuete täitmiseks. Saagis on määratletud kui kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetavate muutujate väärtuste vahe. Katselahuste seerias määratud saagiste põhjal arvutatakse kontsentratsioon, mille puhul saagis väheneb teatud kindla protsendi  $x$  (nt 50 %) võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $E_yC_x$  (nt  $E_yC_{50}$ ).

▼ **M6**

8. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC).

**TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

9. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega.
10. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes,  $pK_a$ ,  $K_{ow}$ , aururõhk ja biolagunduvus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. See aitab kindlaks teha, kas sellise kao ärahoidmiseks tuleks võtta konkreetseid meetmeid. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures.
11. Kui katsesöötme pH hoidmine on eriti tähtis, nt kui uuritakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid kemikaale, soovitatakse lisada söötme puhverainet (vt punkt 21). Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud allikas 8.

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

12. Katse on nõuetekohane, kui tallasjate võsude arvu kahekordistumise aeg kontrollrühmas on lühem kui 2,5 ööpäeva (60 tundi), mis vastab võsude arvu umbes seitsmekordsele suurenemisele seitsme ööpäeva jooksul ja keskmisele kasvu erikiirusele 0,275 ööpäeva kohta. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud söötmete ja katsetingimuste kasutamisel on see kriteerium staatilise katserežiimi puhul täidetav (5). Seda kriteeriumi on eeldatavalt võimalik täita ka poolstaatilise ja läbivoolurežiimi puhul. Kahekordistumisaeg arvutatakse punkti 49 kohaselt.

**VÕRDLUSKEMIKAAL**

13. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelises võrdlusuuringus (7) kasutatud võrdluskemikaale, näiteks 3,5-diklorofenooli. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

14. Kõik katsesöötme kokku puutuvad seadmed peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertest materjalist. Kultuuride kasvatamiseks ja katseteks kasutatavad klaasnõud peaksid olema steriilsed ja katsesöötmesse leostuda võivatest keemilistest saasteainetest puhastatud. Katsenõud peaksid olema piisavalt laiad, et kontrollnõudes kasvavad eri kolooniate tallusjad võsud ei ulatuks katse lõpus üksteise peale. Ei ole tähtis, kas juured puudutavad

**▼ M6**

katsenõu põhja, kuid on soovitatav, et lahuse sügavus igas nõus oleks vähemalt 20 mm ja lahuse maht vähemalt 100 ml. Kui need nõuded on täidetud, ei ole valitud katsenõu tüüp eriti oluline. Sobivaks on osutunud nii nõuete-kohaste mõõtmetege keeduklaasid, kristalliseerimisnõud kui ka klaasist Petri tassid. Katsenõud peavad olema kaetud, et vähendada aurumist ja juhuslikku saastumist, kuid samal ajal peab olema tagatud vajalik õhuvahetus. Sobivad katsenõud ja eriti nende katted ei tohi varjata valgust ega muuta selle spektrit.

15. Kultuure ja katsenõusid ei tohiks hoida samas kohas. Seepärast on kõige parem kasutada eraldi kasvukambreid, inkubaatoreid või ruume. Valgustus-tihedus ja temperatuur peavad olema reguleeritavad ja neid hoitakse konstantena (vt punktid 35–36).

**Katseorganism**

16. Käesoleva meetodi kohases katses kasutatakse katseorganismina lemmelt *Lemna gibba* või *Lemna minor*. Mürgisuse hindamise katses kasutatud lemleliikide lühikirjeldus on esitatud 2. liites. Taimne materjal võib pärineda kultuuride kollektsioonist, teisest laborist või loodusest. Loodusest kogutud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida vähemalt kaheksa nädalat katses kasutatavas söötmes. Loodusliku lähtekultuuri kogumiskohas ei tohi esineda ilmseid saasteallikaid. Teisest laborist või kultuuride kollektsioonist saadud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida samal viisil vähemalt kolm nädalat. Taimse materjali päritolu ning katses kasutatud liik ja kloon (kui see on teada) tuleks alati märkida katseprotokollis.
17. Tuleks kasutada monokultuure, mis ei ole nähtavalt saastunud muude organismide, näiteks vetikate või algloomadega. Lemle *L. minor* terved taimed moodustavad 2–5 tallusjast võsust koosneva koloonia; *L. gibba* tervete taimede koloonia võib koosneda kuni seitsmest tallusjast võsust.
18. Katses kasutatavate taimede kvaliteet ja ühetaolisus mõjutavad märkimisväärselt katsetulemust ning seepärast tuleks taimi hoolikalt valida. Tuleks kasutada kiirelt kasvavaid noori taimi, millel pole nähtavaid kahjustusi ega värvimuutusi (kloroos). Kvaliteetses kultuuris on palju vähemalt kahest tallusjast võsust koosnevaid kolooniaid. Ühekaupa esinevate tallusjate võsude rohkus osutab keskkonnastressile, nt toitainevaegusele; sellisest kultuurist saadud taimset materjali ei tohiks katses kasutada.

**Kultiveerimine**

19. Kultuuride hooldamissageduse vähendamiseks (nt kui teatava aja jooksul ei kavandata katseid lemlega) võib kultuure hoida vähendatud valgustusti-heduse ja madalama temperatuuri (4–10 °C) juures. Kultiveerimist kirjeldatakse üksikasjalikult 3. liites. Vetikate või muude organismidega saastumise tunnuste ilmnemisel võib olla vaja lemle tallusjate võsude osaproov pindsteriliseerida ja seejärel värskesse söötmesse üle viia (vt 3. liide). Ülejäänud saastunud kultuur tuleks sellisel juhul kõrvaldada.
20. Vähemalt seitse päeva enne katset viiakse piisav arv kolooniaid aseptiliselt värskesse steriilsesse söötmesse ja kolooniaid kasvatatakse katsetingimustes 7–10 ööpäeva.

**Katsesööde**

21. Liikide *Lemna minor* ja *Lemna gibba* puhul soovitatakse kasutada allpool kirjeldatud eri söötmeid. Tuleks hoolikalt kaaluda, kas lisada katsesöötmesse pH puhvrit (liigi *L. minor* puhul MOPS (4-morfoliinpropaanisulfoonhape, CASi nr 1132-61-2) ja *L. gibba* puhul NaHCO<sub>3</sub>), kui on kahtlus, et see võib reageerida uuritava kemikaaliga ja mõjutada kemikaali mürgisuse avaldumist. Võib kasutada ka Steinbergi söödet (9), kui järgitakse nõuetele vastavuse kriteeriume.



▼ **M6**

22. Liigi *L. minor* taimede kultiveerimiseks ja nendega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Rootsi Standardiinstituudi (SIS) lemlöödet modifitseeritud kujul. Selle söötmekoostis on esitatud 4. liites.
23. *L. gibba* kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada 4. liites kirjeldatud söödet 20X-AAP.
24. Liigi *L. minor* puhul ja ka *L. gibba* puhul võib nõuetele vastavuse kriteeriumide järgimise korral kasutada ka 4. liites kirjeldatud Steinbergi söödet.

**Katselahused**

25. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Uuritava kemikaali põhilahuse valmistamiseks lahustatakse kemikaal tavaliselt söötmes.
26. Üldjuhul ei tohiks uuritava kemikaali suurim kasutatav kontsentratsioon ületada kemikaali vees lahustuvust katsetingimustes. Sama ajal tuleks silmas pidada, et lemleliikide taimed ujuvad pinnal ja võivad kokku puutuda ka vee ja õhu piirpinnale koguneva kemikaaliga (nt vees raskesti lahustuv, hüdrofoobne või pindaktiivne kemikaal). Sellisel juhul puutuvad taimed kokku ka muu kui lahuses oleva materjaliga ning olenevalt uuritava kemikaali omadustest võib kemikaali kokkupuutekontsentratsioon olla suurem kui selle vees lahustuvus. Vees raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsenteeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamisel peaks selle lõppsisaldus olema võimalikult väike ( $\leq 100$  µl/l) ja tuleks märkida katseprotokollis ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleks kasutada lahusti või dispergeeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud allikas 8.

**Katse- ja kontrollrühmad**

27. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus lemlele on eelnevalt näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega kindlaks tehtud. Mürgisuse hindamise lõplikus katses tuleks üldjuhul kasutada vähemalt viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Kasutatavate kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks üldjuhul olla suurem kui 3,2, kuid kontsentratsiooni ja mõju vahelise nõrga sõltuvuse puhul võib siiski kasutada suuremat tegurit. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt kolme paralleelkultuuri.
28. Kasutatavate kontsentratsioonide valimisel kontsentratsioonivahemiku leidmise katse ja/või mürgisuse hindamise lõpliku katse jaoks tuleks arvestada järgmist.
  - $EC_x$  määramisel peaks  $EC_x$  väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusväärsus. Näiteks peaks  $EC_{50}$  määramisel suurim kasutatav kontsentratsioon olema suurem kui  $EC_{50}$  väärtus. Kui  $EC_{50}$  väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata.
  - Kui eesmärk on leida LOEC või NOEC, peaks väikseim kasutatav kontsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Peale selle peaks suurim kasutatav kontsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Vastasel juhul

▼ **M6**

tuleb katset korrata, kasutades teistsugust kontsentratsioonivahemikku (kui suurim kasutatav kontsentratsioon ei ole juba võrdne lahustuvuse piirkontsentratsiooniga või suurima nõutava kontsentratsiooniga, näiteks 100 mg/l).

29. Igas katses kasutatakse ka kontrollkultuure, mille puhul sööde, tallusjate võsude ja kolooniate arv, keskkonningimused ja katsemeetodid on samad kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul, kuid mis ei sisalda uuritavat kemikaali. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks lisaks valmistada kontrollkultuur, milles lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon on sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Paralleelsete kontrollnõude ja vajaduse korral lahustiga kontrollnõude arv peab olema vähemalt võrdne uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul kasutatavate nõude arvuga ning soovitatavalt sellest kaks korda suurem.
30. Kui ei ole vaja määrata NOEC väärtust, võib katseplaani muuta nii, et suurendataks uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab siiski olema vähemalt kolm.

**Kokkupuude**

31. Inokulum-kultuurist viiakse 2–4 nähtavast tallusjast võsust koosnevad kolooniad aseptilistes tingimustes juhuvaliku alusel üle katsenõudesse. Igas katsenõus peaks olema kokku 9–12 tallusjat võsu. Tallusjate võsude ja kolooniate arv peaks kõikides katsenõudes olema võrdne. Käesoleva meetodi rakendamisel saadud kogemustest ja võrdlusuuringu andmetest nähtub, et kui kasutada iga kontsentratsiooni kohta kolme paralleelkultuuri, millest igaühes on algselt 9–12 tallusjat võsu, on see piisav, et teha kindlaks eri kontsentratsioonidel täheldatav kasvukiiruse muutumine umbes 4–7 % võrra (saagise vähenemine 10–15 % võrra) (7).
32. Katsenõude paigutus inkubaatoris peab olema juhuslik, et vähendada asukohast tingitud temperatuuri ja valgustustiheduse erinevuste mõju. Samuti on vaja katsenõud mõõtmiste tegemise ajal või suurema sagedusega kas kindla skeemi alusel või juhuslikult ümber paigutada.
33. Kui püsivuse määramise eelkatses nähtub, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni ei ole võimalik katse vältel (7 ööpäeva jooksul) püsivana hoida, st kemikaali mõõdetud sisaldus langeb alla 80 % mõõdetud algsisaldusest, soovatakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul tuleks kolooniad katse jooksul vähemalt kahel korral (nt kolmandal ja viiendal katsepäeval) üle viia värskest valmistatud katse- ja kontroll-lahustesse. Värskesse söötmesse üleviimise sagedus sõltub uuritavast kemikaalst; väga ebapüsiva või lenduva kemikaali puhul võib selle sisalduse peaaegu püsivana hoidmiseks olla vaja tagada sagedasem üleviimine värskesse söötmesse. Mõnel juhul võib olla vaja kasutada läbivoolumeetodit (8, 10).
34. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta kokkupuudet taimelehtedele pritsimise teel; selle meetodi puhul vt allikas 11.

**Inkubeerimistingimused**

35. Tuleks kasutada päevalguse spektriga või külmvalget pidevat fluorestsentsvalgust, mille intensiivsus jääb vahemikku 85–135  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (vastab 6 500–10 000 luksile), mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui *Lemna* tallusjad võsud. Valgustustihedus ei tohiks katsepinna üheski punktis erineda valitud väärtusest üle 15 %. Valgustustiheduse mõõdetav väärtus sõltub

▼ **M6**

mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist. Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitmepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.

36. Temperatuur katsenõudes peaks olema  $24 \pm 2$  °C. Kontrollsöötme pH ei tohiks katse ajal tõusta rohkem kui 1,5 ühikut. Kui pH tõuseb üle 1,5 ühiku, ei loeta katset siiski nõuetele mittevastavaks, kui on võimalik tõendada, et nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud. Erijuhul, nt ebapüsiva kemikaali või metalli mõju uurimisel tuleb pH muutumisele pöörata erilist tähelepanu. Täiendavad juhised on esitatud allikas 8.

**Kestus**

37. Katse lõpetatakse, kui taimede viimisest katsenõudesse on möödunud seitse ööpäeva.

**Mõõtmised ja analüüsid**

38. Katse alguses loendatakse ja registreeritakse tallasjate võsude arv katsenõudes, jälgides, et arvesse võetakse kõik väljaulatuvad selgesti nähtavad tallasjad võsud. Normaalse või ebanormaalse välimusega tallasjate võsude arv määratakse katse alguses, vähemalt iga kolme ööpäeva järel (st vähemalt kaks korda 7-päevase katse jooksul) ja katse lõpus. Tuleks registreerida muutused taimede arengus, nt tallasjate võsude suuruses ja välimuses, nekroosi, kloroosi või puhetumise ilmingud, kolooniate lagunemine või ujuvuse vähenemine ning muutused juurte pikkuses ja välimuses. Samuti tuleks registreerida olulised muutused katsesöötmes (nt lahustumatu aine esinemine, vetikate kasv katsenõus).
39. Lisaks tallasjate võsude arvu määramisele katse jooksul hinnatakse ka uuritava kemikaali mõju ühele või mitmele järgmistest mõõdetavatest muutujatest:
- i) tallasjate võsude üldpindala,
  - ii) kuivmass,
  - iii) märgmass.
40. Tallasjate võsude üldpindala määramise eelis on asjaolu, et seda saab teha igas katse- ja kontrollnõus katse alguses, kestel ja lõpus. Kuiv- või märgmass tuleks määrata katse alguses inokulum-kultuuri representatiivse proovi alusel ning katse lõpus igast katse- ja kontrollnõust saadud taimse materjali alusel. Kui tallasjate võsude üldpindala ei mõõdetata, eelistatakse märgmassi määramisele kuivmassi määramist.
41. Tallasjate võsude üldpindala, kuivmassi ja märgmassi võib määrata järgmiselt.
- i) *Tallasjate võsude üldpindala*: kõigi kolooniate tallasjate võsude üldpindala võib määrata pildianalüüsi abil. Katsenõu ja taimede silueti võib jäädvustada videokaameraga (nt asetades nõu valguskastile) ja saadud kujutise digiteerida. Seejärel võib määrata tallasjate võsude üldpindala katsenõus, kasutades kalibreerimiseks teadaoleva pindalaga tasapinnalisi kujundeid. Tuleks jälgida, et katsenõu servast tingitud interferents ei segaks määramist. Teine, töömahukam meetod on teha katsenõust ja taimedest fotokoopia, lõigata välja kolooniate siluett ja määrata kolooniate pindala lehepindala analüsaatori või millimeetripaberi abil. Võib kasutada ka muid määramismeetodeid (nt kolooniate silueti pindalale ja pindalaühikule vastavate paberi kaalude suhte määramine).

▼ **M6**

ii) *Kuivmass*: igast katsenõust kogutakse kõik kolooniad ja neid loputatakse destilleeritud või deioniseeritud veega. Kolooniatelt eemaldatakse kuivatuspaberiga liigne vesi ja seejärel kuivatatakse neid 60 °C juures, kuni nende kaal enam ei muutu. Kuivmassi määramisel võetakse arvesse kõik juuretükid. Kuivmassi väljendatakse täpsusega vähemalt 0,1 mg.

iii) *Märgmass*: kõik kolooniad viiakse eelnevalt kaalutud polüstüreenist (või muust inertsest materjalist) katseklaasidesse, mille ümaras põhjas on väikesed avad läbimõõduga 1 mm. Katseklaase tsentrifuugitakse 10 minutit toatemperatuuril kiirusel 3 000 pööret minutis. Sel viisil kuivatatud kolooniaid sisaldavad katseklaasid kaalutakse uuesti ning märgmassi leidmiseks lahutatakse saadud tulemusest tühja katseklaasi mass.

## Mõõtmiste ja analüüside sagedus

42. Staatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta pH igas katsenõus katse alguses ja lõpus. Poolstaatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta värske katselahuse pH enne iga lahusevahetust ja määrata ka iga äratarvitatud lahuse pH.
43. Valgustustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui *Lemna* tallusjad võsud. Valgustustihedust tuleks katse jooksul mõõta vähemalt üks kord. Söötmel temperatuur kasvukambris, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitava jälgendusnõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas.
44. Uuritava kemikaali sisaldus määratakse katse ajal sobiva ajavahemiku tagant. Staatilise katse puhul tuleb uuritava kemikaali sisaldus määrata vähemalt katse alguses ja lõpus.
45. Poolstaatilise katse puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt 20 % piires nominaalväärtusest, tuleb selle sisaldus määrata kõigis värskelt valmistatud katselahustes ja samades lahustes nende väljavahetamise ajal (vt punkt 33). Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja püsiv (st jääb vahemikku 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil. Kõigil juhtudel on uuritava kemikaali sisaldus igal katses kasutataval kontsentratsioonil vaja enne katselahuse väljavahetamist määrata ainult ühes paralleelkultuuri nõus (või paralleelkultuuridest moodustatud koondproovis).
46. Läbivoolukatse puhul kasutatakse sama proovivõtorežiimi kui poolstaatilises katses, sealhulgas määramist katse alguses, kestel ja lõpus, kuid sel juhul ei ole äratarvitatud lahuse analüüsimine asjakohane. Sellises katses tuleks iga päev kontrollida lahjenduslahuse ja uuritava kemikaali või uuritavat kemikaali sisaldava põhilahuse voolukiirust.
47. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui  $\pm 20\%$ , võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui  $\pm 20\%$ , tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinevate väärtuste geomeetriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (8).

▼ **M6****Piirsalduskatse**

48. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesõötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on väiksem) mürgist mõju, võib teha piirsalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioon. Piirsalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele vastavuse kriteeriume; ainsa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema kaks korda rohkem. Kasvu analüüsimiseks kontroll- ja katserühmas võib keskvaartusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tallusjate võsude arvu kahekordistumise aeg**

49. Tallusjate võsude arvu kahekordistumise aja  $T_d$  leidmiseks ja katse nõuetele vastavuse sellekohase kriteeriumi täitmise kindlakstegemiseks (punkt 12) kasutatakse kontrollkultuuridest saadud andmeid ja järgmist valemit:

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

kus  $\mu$  on punktides 54–55 kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

**Uuritavad muutujad**

50. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju *Lemma* vegetatiivsele kasvule. Kuna eelistused ja regulatiivsed vajadused eri jurisdiktsioonides on erinevad, kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis kahte uuritavat muutujat. Et tagada katsetulemuste vastuvõetavus kõikides jurisdiktsioonides, tuleks vaadeldava mõju hindamisel kasutada mõlemat allpool kirjeldatud muutujat (a ja b).

a) *Keskmine kasvu erikiirus*: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt tallusjate võsude arvu logaritmi ja veel ühe uuritava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) logaritmitud väärtuse ööpäevasest muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas. Seda nimetatakse mõnikord ka suhteliseks kasvukiiruseks (12).

b) *Saagis*: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt katse lõpuks toimunud tallusjate võsude arvu ja veel ühe uuritava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) väärtuse muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas.

51. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja abil arvutatud mürgisuse väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvesse võtta. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad  $EC_x$  väärtused ( $E_r C_x$ ) üldjuhul suuremad kui saagisel põhinevad väärtused ( $E_y C_x$ ), kuna asjaomaste lähenemisiiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevuse; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse määratlus põhineb lemle üldisel piiramata eksponentsiaalsel kasvul kultuuris, kusjuures mürgisust hinnatakse kasvukiirusele avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri absoluutsest kasvu erikiirusest,

▼ **M6**

konsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõusust ega katse kestusest. Kui uuritav muutuja on aga saagis, sõltuvad tulemused kõikidest eespool nimetatud lisamuutujatest.  $E_y C_x$  väärtus sõltub katses kasutatud lemleliigi kasvu erikiirusest ja maksimaalsest kasvu erikiirusest, mis võib eri lemleliikidel ja isegi sama liigi eri kloonidel olla erinev. Seda uuritavat muutujat ei tohiks kasutada, kui võrreldakse lemleliikide või eri kloonide tundlikkust mürgiste kemikaalide suhtes. Ehkki keskmise kasvu erikiiruse kasutamine mürgisuse hindamiseks on teaduslikult paremini põhjendatud, käsitletakse käesolevas katsemeetodis mõnes jurisdiktsioonis kehtivate regulatiivsete nõuete järgimise võimaldamiseks ka saagisel põhinevat mürgisuse hindamist.

52. Mürgisuse hindamisel tuleks lähtuda tallusjate võsude arvust ja veel ühest mõõdetavast muutujast (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass), sest mõned kemikaalid võivad mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju enam kui tallusjate võsude arvu. Ainult tallusjate võsude arvu kasutamisel jääks selline mõju avastamata.
53. Tallusjate võsude arv ja täiendavalt määratud mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) väärtus kantakse iga mõõtmise puhul koos uuritava kemikaali kontsentratsiooni väärtusega tabelisse. Järgneval andmeanalüüsil, mille eesmärk on leida LOEC, NOEC või  $EC_x$ , kasutatakse igast üksikust paralleelkultuurist saadud väärtusi, mitte katserühma kohta arvutatud keskmisi väärtusi.

**Keskmine kasvu erikiirus**

54. Iga kontrollkultuuri ja uuritava kemikaaliga kultuuri puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus kasvu iseloomustavate muutujate – tallusjate võsude arvu ja veel ühe mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) – logaritmitud väärtuse suurenemise alusel järgmise valemi abil:

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

kus

- $\mu_{i-j}$  on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul  $i-j$ ,
- $N_i$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel  $i$ ,
- $N_j$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel  $j$ ,
- $t$  on ajavahemik  $i-j$ .

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

55. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseaja kohta (eespool esitatud valemis tähistab katse algust ajahetk  $i$  ja katse lõppu ajahetk  $j$ ). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmise kasvu erikiiruse keskväärtus ja tulemuste hajuvus. Peale selle hinnatakse kasvukiirust ka ajavahemike kaupa, näiteks logaritmitud kasvukõverate uurimise teel, et hinnata uuritava kemikaali mõju kokkupuuteaja jooksul. Ajavahemike kaupa arvutatud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse vahelised olulised erinevused osutavad pidevast eksponentsiaalsest kasvust kõrvalekaldumisele ning sel juhul on vaja kasvukõveraid üksikasjalikult uurida. Vastavalt konservatiivsele lähenemisviisile tuleks sel juhul võrrelda uuritava kemikaaliga kultuurides kasvu maksimaalse pidurdumiseni kulunud aja jooksul täheldatud kasvu erikiirust samal ajavahemikul kontrollkultuurides täheldatud kasvu erikiirusega.
56. Iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutatakse kasvukiiruse vähenemine  $I_r$  protsentides järgmise valemi abil:

**▼ M6**

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

kus

- %  $I_r$ : on keskmise kasvu erikiiruse vähenemise määr protsentides,
- $\mu C$ : on  $\mu$  keskvärtus kontrollrühmas,
- $\mu T$ : on  $\mu$  keskvärtus katserühmas.

**Saagis**

57. Kemikaali mõju saagisele määratakse lähtuvalt kahe mõõdetava muutuja – tallusjate võsude arvu ja veel ühe mõõdetava muutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või märgmassi) – väärtusest, mis mõõdetakse igas katsekultuuris katse alguses ja lõpus. Kuivmassi või märgmassi algväärtus määratakse tallusjate võsude proovist, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast kultuurist (vt punkt 20). Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides (%  $I_y$ ) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

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

kus

- %  $I_y$  on saagise vähenemise määr protsentides,
- $b_c$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas,
- $b_T$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

**Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine**

58. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (punkti 56 või 57 kohaselt arvutatud %  $I_r$  või %  $I_y$ ) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

**EC<sub>x</sub> leidmine**

59. EC<sub>x</sub> (nt EC<sub>50</sub>) hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest ( $E_r C_x$ ) kui ka saagisest ( $E_y C_x$ ), mis peaksid kumbki omakorda põhinema tallusjate võsude arvul ja ühel täiendaval mõõdetaval muutujal (tallusjate võsude üldpindalal, kuivmassil või märgmassil). Selle põhjuseks on asjaolu, et teatavad uuritavad kemikaalid mõjutavad tallusjate võsude arvu ja muid mõõdetavaid muutujaid erinevalt. Määratavad mürgisuse näitajad igal arvutataval kasvu pidurdumise tasemel  $x$  on seega neli EC<sub>x</sub> väärtust:  $E_r C_x$  (tallusjate võsude arv),  $E_r C_x$  (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass),  $E_y C_x$  (tallusjate võsude arv) ja  $E_y C_x$  (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass).

**Statistilised meetodid**

60. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli jaotuse kujule (13), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (13). Tuleks silmas pidada,

▼ **M6**

- et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsi-meetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleb kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid  $EC_x$  väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud allikates 14, 15 ja 16.
61. Kummagi uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal  $EC_x$  hinnangulised väärtused. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskvaartusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.
  62. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib  $EC_{50}$  hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusvärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (17).
  63. Et teha kindlaks LOEC ja selle alusel ka NOEC, on vaja võrrelda katserühmade keskvaartusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskvaartust võrreldakse seejärel kontrollrühmas saadud keskvaartusega, kasutades sobivat mitmese võrdluse või trenditesti meetodit. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (18, 19, 20, 21). Tuleb hinnata, kas kehtib ANOVA eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (22), näiteks Levene'i või Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamise. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised NOEC määramiseks on esitatud allikas 16.
  64. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda NOEC mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga  $EC_x$ . Kõnealuse lemmeldegaga tehtava katse jaoks ei ole sobivat  $x$  väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii  $EC_{10}$  kui ka  $EC_{20}$ .

**Katseprotokoll**

65. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline iseloomustus ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused, sealhulgas vees lahustuvuse piirkontsentratsioon;
- kemikaali identifitseerimisandmed (nt CASi number) ja puhtus (lisandid).

*Katseliik:*

- teaduslik nimetus, kloon (kui see on teada) ja päritolu.

*Katsetingimused:*

- kasutatud katserežiim (staatiline, poolstaatiline või läbivoolurežiim);
- katse alustamise kuupäev ja kestus;
- katsesööde;
- katseplaani kirjeldus: katsenõud ja nende katted, lahuste maht, kolooniate ja tallusjate võsude arv katsenõu kohta katse alguses;
- kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja asjakohane mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;



▼ **M6**

- põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;
- katsetemperatuur;
- valgusallikas, valgustustihedus ja valguse ühtlus;
- katse- ja kontrollsöötmete pH väärtused;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid ning kasutatud analüüsimeetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuringud, analüüsandmete standardhälbed või usalduspiirid);
- tallsujate võsude arvu ja muude mõõdetavate muutujate – kuivmassi, märgmassi või tallsujate võsude pindala – määramise meetodid;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

*Tulemused:*

- töötlemata andmed: tallsujate võsude arv ja muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga vaatluse ja analüüsi puhul;
- iga mõõdetava muutuja keskvärtus ja standardhälve;
- igale kontsentratsioonile vastav kasvukõver (soovitatakse koostada mõõdetava muutuja logaritmitud väärtuste põhjal, vt punkt 55);
- tallsujate võsude arvu kahekordistumise aeg või kasvukiirus kontrollkultuuris;
- uuritavate muutujate arvatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskvärtused ja variatsioonikordajad;
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;
- uuritavate muutujate kaudu määratud mürgisuse lõppnäitajad – nt EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral LOEC ja/või NOEC ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);
- katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;
- nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;
- tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

## KIRJANDUS

- (1) ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (uuesti kinnitatud 1998. aastal), lk 733–742. Väljaandes: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. USA Materjalide Katsetamise Ühing, West Conshohocken, PA.
- (2) USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712–C–96–156. 8 lk.
- (3) Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 lk.
- (4) Swedish Standards Institute (SIS) (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) of *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 lk (rootsi keeles).

▼ M6

- (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 lk.
- (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., ja 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. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (9) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon. 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. USA Keskkonnakaitseameti aruanne nr EPA-600/3-77 108, september 1977.
- (11) Lockhart, W. L., Billeck, B. N., ja 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., ja Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 481–483.
- (13) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 19: 713–718.
- (14) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O., ja Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157–167.
- (15) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modeling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485–1494.
- (16) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (17) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. 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., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29: 93–96.

▼ **M6***1. liide***Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

**Biomass** – populatsiooni elusaine kuivmass. Kuna käesoleva meetodi puhul mõõdetakse tavaliselt biomassi asendusparameetreid, näiteks tallusjate võsude arvu või pindala, tähistatakse mõistega „biomass” ka kõnealuseid asendusparameetreid.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kloroos** – tallusja võsu koe kolletumine.

**Kloon** – organism või rakk, mis on tekkinud ühest organismist mittesugulise paljunemise tulemusena. Samast kloonist pärit isendid on seega geneetiliselt identsed.

**Koloonia** – üksikisega ühendatud tallusjate ema- ja tütarvõsude kogum (tavaliselt 2–4 võsu). Mõnikord nimetatakse kolooniat ka taimeks.

**EC<sub>x</sub>** – katsesõötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Lemna* kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E<sub>r</sub>C” ja saagise puhul tähist „E<sub>y</sub>C”, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt E<sub>r</sub>C (tallusjate võsude arv).

**Läbivoolukatse** – katse, mille käigus katselahus pidevalt vahetub.

**Tallusjas võsu** – lemle lehtaoline üksikosa. See on väikseim paljunemisvõimeline osis, st isend.

**Puhetumine** – tallusja võsu küürdumine või tursumine.

**Kasv** – mõõdetava muutuja (nt tallusjate võsude arv, kuivmass, märgmass, tallusjate võsude pindala) väärtuse suurenemine katse kestel.

**Kasvukiirus** (keskmine kasvu erikiirus) – biomassi logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul.

**Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)** – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon LOEC (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud.

**Mõõdetav muutuja** – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva meetodi puhul on mõõdetavad muutujad tallusjate võsude arv, tallusjate võsude pindala, märgmass ja kuivmass.

**Monokultuur** – ühe liigi taimede kultuur.

**Nekroos** – protsess, mille tagajärjel tekib tallusja võsu surnud (st valge või hügrofaanne) kude.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC)** – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool LOEC väärtust.

**Fenotüüp** – organismi vaadeldavate tunnuste kogum, mis on määratud organismi geenide ja keskkonna vastasmõjuga.

**Uuritav muutuja** – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on tuletatud biomassi kirjeldava mis tahes mõõdetava muutuja põhjal vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis tuletatakse sellistest mõõdetavatest muutujatest nagu tallusjate võsude arv või pindala, märgmass või kuivmass.

**▼ M6**

**Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse** – katse, mille käigus katselahus teatava ajavahemiku järel perioodiliselt välja vahetatakse.

**Staatiline katse** – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Katse lõppnäitaja** – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

**Katsesööde** – täielik sünteetiline kasvukeskkond, mille pinnal katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

**Saagis** – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mis väljendab biomassi suurenemist katse vältel.

▼ **M6**

## 2. liide

**Lemleliikide kirjeldus**

Veetaimed üldnimetusega lemled (*Lemna* spp.) kuuluvad lemleliste (*Lemnaceae*) sugukonda, mis hõlmab paljusid ülemaailmse levikuga liike neljast perekonnast. Nende morfoloogilisi erinevusi ja taksonoomiat on ammendavalt kirjeldatud (1, 2). Mürgisuse hindamise katsetes kasutatakse tavaliselt parasvõõtlemele iseloomulikke liike *Lemna gibba* ja *Lemna minor*. Mõlemal liigil on veepinnal või vees ujuv litrikujuline vars (tallusjas võsu) ja iga tallusja võsu alakülje keskkohale kinnitub väga peenike juur. Lemled õitsevad harva ja paljunevad peamiselt vegetatiivselt uute tallusjate võsude moodustamise teel (3). Noored taimed on vanemate taimedega võrreldes heledamad, lühema juurega ja koosnevad kahest või kolmest eri suurusega tallusjast võsust. Tänu lemle väiksusele, lihtsale ehitusele, mittesugulisele paljunemisele ja lühikesele generatsiooniajale sobivad selle perekonna taimed väga hästi laboratoorseteks katseteks (4, 5).

Kuna tundlikkus uuritava kemikaali suhtes on tõenäoliselt liigiti erinev, saab tundlikkust eri kemikaalide suhtes võrrelda ainult ühe liigi piires.

Näited lemleliikide kasutamise kohta katsetes: viited liigiti

*Lemna aequinotalis*: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinotalis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Filosoofialitsensiaadi väitekiri 1996:2. Stockholmi Ülikooli süsteemikologia instituut.

*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*: USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712-C-96-156. 8 lk.

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

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

*Lemna gibba*: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (uuesti kinnitatud 1998. aastal), lk 733–742.

USA Keskkonnakaitseamet (1996). OPPTS 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp. (Avalik kavand.) EPA 712-C-96-156. 8 lk.

*Lemna paucicostata*: Nasu, Y., ja Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Con. Tox.* 10: 1959–1969.

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

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

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

## Lemleliikide kollektsioonid

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

**▼M6**

North Carolina State University  
Forestry Dept  
Duckweed Culture Collection  
Campus Box 8002  
Raleigh, NC 27695–8002  
USA  
Tel: +1 919 515 7572  
astomp@unity.ncsu.edu

Department of Applied Environmental Science (ITM), Stockholm University  
SE-106 91  
STOCKHOLM  
ROOTSI  
Tel: +46 8 674 7240  
Faks: +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)  
FG III 3.4  
Schichauweg 58  
12307 Berlin  
Saksamaa  
E-post: lemna@uba.de

**KIRJANDUS**

- (1) Hillman, W. S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev.* 27: 221–287.
- (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). 2. kd. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Šveits.
- (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. *Environ. Pollut. B* 11: 1–14.
- (5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* 52: 7–22.

**▼ M6***3. liide***Tüvikultuuri säilitamine**

Tüvikultuure võib säilitada pikemat aega madalal temperatuuril (4–10 °C), ilma et neid oleks vaja uuendada. Lemle tüvikultuuride sööde võib olla sama, mida kasutatakse katsetes, kuid võib kasutada ka muid toitainerikkaid söötmeid.

Teatav arv noori helerohelisi taimi viiakse kindla ajavahemiku järel aseptiliselt üle uude värskesse söötmega kultiveerimisnõusse. Subkultuuride inokuleerimise vaheaeg võib käesolevas liites soovitatud madala temperatuuri korral olla kuni kolm kuud.

Tuleks kasutada keemiliselt puhtaid (happega pestud) steriilseid klaasist kultiveerimisnõusid ja aseptilisi käitlemismeetodeid. Tüvikultuuri saastumisel näiteks vetikate või seentega tuleb võtta meetmed saastavate organismide kõrvaldamiseks. Vetikate ja enamiku muude saastavate organismide puhul võib selleks kasutada pindsteriliseerimist. Saastunud taimset materjalist võetakse proov ja lõigatakse ära taimede juured. Pärast seda loksutatakse taimset materjali tugevalt puhtas vees ja asetatakse 30 sekundiks kuni 5 minutiks 0,5-mahuprotsendilisse naatriumhüpokloriidi lahusesse. Seejärel loputatakse taimset materjali steriilse veega ja viiakse see mitmes osas üle värskesse söötmega kultiveerimisnõudesse. Sellise töötlemise tagajärjel surevad paljud tallusjad võsud, eriti kui töötlemisaeg on pikem, kuid mõni ellujäänud tallusjas võsu on tavaliselt saastavatest organismidest vaba. Selliseid tallusjaid võsusid saab kasutada uute kultuuride inokuleerimiseks.

## ▼M6

## 4. liide

## Söötmed

Liikide *L. minor* ja *L. gibba* jaoks soovitatakse kasutada eri söötmeid. Liigi *L. minor* puhul soovitatakse kasutada Rootsi Standardiinstituudi (SIS) söödet modifitseeritud kujul, samas kui liigi *L. gibba* puhul soovitatakse kasutada söödet 20X-AAP. Allpool on esitatud kummagi söötme koostis. Nende söötmete valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtusastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

## Rootsi Standardiinstituudi (SIS) lemlesööde

- Põhilahused I–V steriliseeritakse autoklaavimise (120 °C, 15 minutit) või membraanfiltrimise (poori läbimõõt umbes 0,2 µm) teel.
- VI põhilahus ja vajaduse korral valmistatav VII põhilahus steriliseeritakse membraanfiltrimise teel; neid lahuseid ei tohiks autoklaavida.
- Steriilseid põhilahuseid tuleks hoida jahedas ja valguse eest kaitstult. Põhilahused I–V tuleks kõrvaldada kuus kuud pärast valmistamist; VI põhilahuse ja vajaduse korral valmistatava VII põhilahuse säilivusaeg on üks kuu.

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l)
I	NaNO <sub>3</sub>	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0	20	C	2,3
V	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puhver)	490	490	—	—

Ühe liitri SISi söötme saamiseks lisatakse 900 ml deioniseeritud veele järgmised komponendid:



**▼ M6**

- 10 ml I põhilahust,
- 5 ml II põhilahust,
- 5 ml III põhilahust,
- 5 ml IV põhilahust,
- 1 ml V põhilahust,
- 5 ml VI põhilahust,
- 1 ml VII põhilahust (vajaduse korral).

*Märkus:* Täiendav VII põhilahus (MOPSi puhverlahus) võib olla vajalik teatavate uuritavate kemikaalide puhul (vt punkt 11).

Söötme pH reguleeritakse 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega väärtusele  $6,5 \pm 0,2$  ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega ühe liitri.

**Sööde 20X-AAP**

Põhilahuste valmistamiseks kasutatakse steriilset destilleeritud või deioniseeritud vett.

Steriilseid põhilahuseid tuleks hoida jahedas ja valguse eest kaitstult. Nendes tingimustes on põhilahuste säilivusaeg vähemalt 6–8 nädalat.

Söötme 20X-AAP viie toitainete põhilahuse (A1, A2, A3, B ja C) valmistamiseks kasutatakse reaktiivi puhtusastmega kemikaale. Söötme valmistamiseks lisatakse umbes 850 ml deioniseeritud veele 20 ml iga toitainete põhilahust. Söötme pH reguleeritakse 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega väärtusele  $7,5 \pm 0,1$  ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega ühe liitri. Seejärel filtritakse sööde läbi umbes 0,2 µm suuruste pooridega membraanfiltri steriilsesse nõusse.

Katses kasutamiseks ette nähtud sööde tehakse valmis 1–2 päeva enne kasutamist, et pH saaks stabiliseeruda. Enne kasutamist kontrollitakse söötme pH-d ja reguleeritakse seda vajaduse korral uuesti 0,1 või 1 M NaOH või HCl lisamisega, nagu on kirjeldatud eespool.

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
A1	NaNO <sub>3</sub>	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12	240	Mg	58,08
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	290	S	38,22
A3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,16	3,2	Fe	0,66

## ▼ M6

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl <sub>2</sub>	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7, µg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,012 mg/l	0,4 µg/l	Cu	0,80 µg/l
C	NaHCO <sub>3</sub>	15	300	Na; C	220; 43

(\*) Kui ei ole märgitud teisiti.

*Märkus:* teoreetiliselt vajalik vesinikkarbonaadi lõppsisaldus (mille puhul ei ole vaja pH-d märkimisväärselt reguleerida) ei ole 300 mg/l, vaid 15 mg/l. Varem, sealhulgas käesoleva meetodi valideerimiseks tehtud laboritevahelises võrdlusuuringus, on siiski kasutatud söödet 20X-AAP, milles vesinikkarbonaadi sisaldus on 300 mg/l. (Sims, I., Whitehouse, P., ja 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.)

#### Steinbergi sööde (vastavalt standardile ISO 20079)

Koostisainete sisaldus ja põhilahused

Standardi ISO 20079 puhul kasutatakse modifitseeritud Steinbergi söödet üksnes *Lemna minor*'i jaoks (kuna selle standardi puhul on lubatud kasutada ainult *Lemna minor*'it), kuid katsetest ilmneb, et selle söötmeaga võib saada häid tulemusi ka *Lemna gibba* puhul.

Söötme valmistamisel tuleks kasutada analüütilise või reaktiivi puhtusastmega kemikaale ja deioniseeritud vett.

Söötme valmistamiseks kasutatakse põhilahuseid või 10 korda kontsentreeritumat söödet (see on suurim kontsentratsioon, mille puhul sadenemist veel ei toimu).

Tabel 1.

#### Stabiliseeritud pH-ga Steinbergi sööde (modifitseeritud Altenburgeri järgi).

Koostisaine		Sööde	
Makrotoitained	Molekulmass	mg/l	mmol/l
KNO <sub>3</sub>	101,12	350,00	3,46
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236,15	295,00	1,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	90,00	0,66
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18	12,60	0,072
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,37	100,00	0,41

▼ **M6**

Koostisaine		Sööde	
Makrotoitained	Molekulmass	mg/l	mmol/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	120,00	1,94
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	287,43	180,00	0,63
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	241,92	44,00	0,18
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	197,84	180,00	0,91
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	270,21	760,00	2,81
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2.

**Põhilahused (makrotoitained).**

1. Makrotoitained (50 korda kontsentreeritud)	g/l
Põhilahus 1:	
KNO <sub>3</sub>	17,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63
Põhilahus 2:	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,00
Põhilahus 3:	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14,75

Tabel 3.

**Põhilahused (mikrotoitained).**

2. Mikrotoitained (1 000 korda kontsentreeritud)	mg/l
Põhilahus 4:	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120,0
Põhilahus 5:	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	180,0
Põhilahus 6:	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44,0
Põhilahus 7:	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180,0
Põhilahus 8:	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	760,00
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1 500,00

— Põhilahused 2 ja 3 võib omavahel kokku segada, samuti võib omavahel kokku segada põhilahused 4–7 (võttes arvesse vajalikke kontsentratsioone).

**▼ M6**

- Säilivusaja pikendamiseks autoklaavitakse põhilahused 121 °C juures 20 minuti jooksul või steriliseeritakse filtrimise teel (0,2 µm). Põhilahus 8 soovitatatakse tungivalt steriliseerida filtrimise teel (0,2 µm).

Vajaliku lõppkontsentratsiooniga modifitseeritud Steinbergi söötme valmistamine

- Umbes 900 ml deioniseeritud veele lisatakse sadenemist ära hoides 20 ml iga põhilahust 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).
- Lisatakse 1,0 ml iga põhilahust 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3).
- Söötme pH peaks olema  $5,5 \pm 0,2$  (pH reguleerimiseks lisatakse väikseim vajalik kogus NaOH või HCl lahust).
- Lahuse ruumala viiakse veega 1 000 milliliitriini.
- Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole söödet vaja täiendavalt steriliseerida. Valmissöötme steriliseerimise korral lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (20 minutit temperatuuril 121 °C).

Pikemaajaliseks säilitamiseks ette nähtud 10 korda kontsentreerituma modifitseeritud Steinbergi söötme valmistamine

- Umbes 30 ml veele lisatakse sadenemist ära hoides 20 ml iga põhilahust 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).
- Lisatakse 1,0 ml iga põhilahust 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3). Lahuse ruumala viiakse veega 100 milliliitriini.
- Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole söödet vaja täiendavalt steriliseerida. Valmissöötme steriliseerimise korral lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (20 minutit temperatuuril 121 °C).
- Söötme pH peaks lõppkontsentratsiooni juures olema  $5,5 \pm 0,2$ .

▼ **M4****C.27. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 218 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju setetes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus tentans*'i kohta olemas olevatel mürgisuse määramise katse eeskirjadel, mis on koostatud Euroopas (1, 2, 3) ja Põhja-Ameerikas (4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (10, 11).
2. Käesolevas katsemeetodis kasutatav kokkupuutesenaarium on sette rikastamine uuritava kemikaaliga. Sobiva kokkupuutesenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Sette kemikaaliga rikastamise stsenaarium on kavandatud settes püsivate kemikaalide akumulatsioon tasemete simuleerimiseks. Käesolevas kokkupuutesüsteemis rikastatakse sette-vee katsesüsteemis setet kemikaaliga.
3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutete suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutete puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks  $\log K_{ow} > 5$ ) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutete olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuutete arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendutud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans*'i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetsetel põhjustel vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnapäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.
4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnapäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.
5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:
  - väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriksi ning kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste settealike leidmiseks;
  - katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;
  - spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada.
6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

▼ **M4****KATSE PÕHIMÕTE**

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava keemikaaliga. Uuritavat ainet lisatakse settesse ja esimese kasvujärgu vastsed lisatakse seejärel katsenõudesse, milles kontsentratsioonid settes ja vees on tasakaalustunud. Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võidakse vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu  $x$  % vähenemise (näiteks  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$  jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatses määratud väärtustega.

**ANDMED UURITAVA AINE KOHTA**

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kättesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihi, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud väljaandes (12).

**VÕRDLUSKEMIKAALID**

9. Katse-eeskirjade ja -tingimuste täitmise usaldusväärsuse tagamiseks võib korrapäraselt katsetada võrdluskemikaale. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

**KATSE KEHTIVUS**

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

- kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);
- *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* valmikud peaksid kontrollnõudes välja arenema 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans*'i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;
- katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;
- vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 1,0$  °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

▼ **M4****MEETODI KIRJELDUS****Katsenõud**

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm<sup>2</sup>. Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

**Lügi valimine**

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius*'e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans*'i (4) ja *Chironomus yohimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisestest kultuurist.

**Sete**

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):

- a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;
- b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliiniisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
- c) 75–76 % (kuivmass) kvartsiiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm);
- d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;
- e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (CaCO<sub>3</sub>). Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (±0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

**▼ M4****Vesi**

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekllooritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l CaCO<sub>3</sub>-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

**Põhilahused – rikastatud setted**

16. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga rikastatud setted uuritava aine lahuse otse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava aine põhilahus segatakse spetsiaalselt koostatud settega rullimisseadme või söödasegaja abil või käsitsi. Vees halvasti lahustuva uuritava aine võib lahustada võimalikult väikses sobiva orgaanilise lahusti (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform) koguses. See lahus segatakse ühes katsenõus seejärel 10 g peene kvartslüivaga. Lahustil lastakse auruda ja see tuleb liivast täielikult kõrvaldada; seejärel segatakse liiv katsenõu jaoks sobivas koguses settega. Uuritava aine solubiliseerimiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lenduvaid aineid. Tuleks meeles pidada, et sette valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja liiva segust pärit liiva (s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud uuritav aine oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Vajaduse korral võib homogeensuse taseme määramiseks analüüsida alamproove.

**KATSE KAVANDAMINE**

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja tähteldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsalduskatset.

**Regressioonanalüüsi kavandamine**

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub>) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC<sub>x</sub>) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav kontsentratsioon on uuritud kontsentratsioonide vahemikus. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset kontsentratsiooni või ülespoole suuremat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat kontsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).



▼ **M4**

19. Kui tuleb hinnata  $EC_{50}$ , tuleks katse teha vähemalt viie kontsentratsiooniga ja iga kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid kontsentratsioone. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

**Täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni hindamise kavandamine**

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta kontsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega kontsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid kontsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $p = 0,05$ ). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaareneamise suhte puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

**Piirsalduskatse**

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsalduskatse (üks katsekontsentratsioon ja kontroll). Piirsalduskatse eesmärk on teha katse kontsentratsioonil, mis on piisavalt suur, et otsustajad võiksid uuritava aine mürgisuse välistada, ning piirsalduseks võetakse kontsentratsioon, mida eeldatavasti üheski olukorras ei teki. Soovitatakse kasutada 1 000 mg/kg (kuivmass). Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $p = 0,05$ ). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxon-Manni-Whitney testi. Valmikute väljaareneamise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

**KATSE KÄIK**

**Kokkupuutefingimused**

*Rikastatud sette-vee süsteemi valmistamine*

22. Uuritavate ainete lisamiseks soovitatakse kasutada rikastamismeetodit, mida on kirjeldatud katsemeetodis C.8 „Toksilisus vihmaussidele” (14). Rikastatud setted asetatakse nõudesse ja neile lisatakse kattev veekiht, et saada sette-vee ruumala suhe 1 : 4 (vt punktid 11 ja 15). Settekihi paksus peaks olema 1,5–3 cm. Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.
23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

▼ **M4***Püsikindluse tagamine*

24. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritava kemikaalil jaotuda vee ja sette vahel (3, 4, 6, 13). Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja kemikaalist ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel isegi kuni mitu nädalat (4–5 nädalat). Kuna paljud kemikaalid võivad sellise aja jooksul laguneda, ei oodata tasakaaluoleku teket, vaid soovitatakse 48-tunnist tasakaalustamise ajavahemikku. Kõnealuse täiendava tasakaalustamise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava aine kontsentratsioon katvas veekihis, pooriveses ja settes vähemalt suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil (vt punkt 38). Need uuritava aine analüütilised määramised võimaldavad arvutada massitasakaalu ja väljendada tulemusi mõõdetud kontsentratsioonide alusel.

*Katseorganismide lisamine*

25. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskest valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatul kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskest munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius* e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans* i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatsu* i puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Sääskede kasvujärke on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (6).
26. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 25 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeteta kontsentratsiooni määramise korral 80.

*Uuritavad kontsentratsioonid*

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiade vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekonsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.
28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

▼ **M4***Kontrollkatsed*

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatse-nõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19–20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), siis tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

*Katsesüsteem*

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

*Sööt*

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööt (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatoi* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi töötlemiste korral ja reguleerida, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks  $\log K_{ow} > 5$ ) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemise ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatselluloos).

*Inkubeerimistingimused*

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mull sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.
33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C ( $\pm 2$  °C). *C. tentans* i ja *C. yoshimatoi* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C ( $\pm 2$  °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksit.

**▼ M4***Kokkupuute kestus*

34. Kokkupuude algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. tentans*'i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

**Vaatlused***Väljaarenemine*

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ning täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.
36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult väljaarenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist munetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

*Kasvamine ja elulemus*

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katset alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid sõelutakse vastsete saamiseks 250 µm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

**Analüütilised mõõtmised***Uuritava aine kontsentratsioon*

38. Uuritava aine kontsentratsiooni analüütiliseks määramiseks settes võetakse sette proovid enne katse algust (s.o vastsete lisamist) vähemalt ühest nõust iga kokkupuutetaseme kohta. Soovitatakse, et katse alguses (vt punkt 24) ja lõpus analüüsitakse suurimal ja väikseimal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis.
39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

▼ **M4**

40. Tsentrifugeerimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

*Füüsikalised-keemilised parameetrid*

41. Katsenõude pH-d ja temperatuuri (vt punkt 10) tuleks mõõta asjakohasel viisil. Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

## KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

*Tulemuste töötlemine*

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emas-sääskede arengu kiirusele ning täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsides isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks  $\chi^2$ -r  $\times$  2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.
43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad kuivmassil ja väljendatakse kuivmassina, arvutatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud sette kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).
44. EC<sub>50</sub> või muu EC<sub>x</sub>-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC<sub>x</sub> usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC<sub>x</sub>-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.
45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatava toimeta kontsentratsioon / vähim täheldatava toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested* ANOVA). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

*Väljaarenemise määr*

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochran-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisher'i täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem, kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochran-Armitage'i või Fisher'i täpset testi, nagu on soovitatud (21).

▼ **M4**

Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv  $n_e$ , mis jagatakse lisatud vastsete arvuga  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kus:

ER = väljaarenemise määr

$n_e$  = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

$n_a$  = nõu kohta lisatud vastsete arv.

47. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnett testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.
48. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvatades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ( $\sin^{-1}$ ).
49. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse  $EC_x$ -väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

#### *Arengu kiirus*

50. Keskmine arengu aeg on keskmine ajavahemik vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegeliku arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogeensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab  $EC_x$ -väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).
51. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval  $x$  täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva  $x$  ja päeva  $x - 1$  vahel ( $1$  = kontrollimistevahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta ( $x$ ) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

**▼ M4**

kus:

$\bar{x}$  – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i – kontrollivahemiku indeks

m – kontrollivahemike maksimaalne arv

$f_i$  – kontrollivahemikul i välja arenenud sääskede arv

$n_c$  – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv ( $=\sum f_i$ )

$x_i$  – ajavahemikul i välja arenenud sääskede arengu kiirus

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

kus:

$\text{day}_i$  (päev<sub>i</sub>) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

$l_i$  – kontrolli vahemiku pikkus i (päevades, tavaliselt üks päev).

**Katseprotokoll**

52. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

*Uuritav aine:*

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);
- kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

*Katseorganismi liik:*

- kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;
- katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

*Katsetingimused:*

- kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;
- loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);
- spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (happikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);
- settekihi ja katva veekihi paksus;
- katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;

▼ **M4**

- katsenõud (materjal ja suurus);
- sette rikastamise meetod: kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;
- rikastatud sette-vee süsteemi stabiliseerimise tasakaaluoleku faas; kestus ja tingimused;
- inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

*Tulemused:*

- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõigi nende analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;
- vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;
- aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;
- väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;
- iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;
- vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;
- valmikute väljaarenemise protsent iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);
- täielikult välja arenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);
- mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC<sub>x</sub> (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeteta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekalldumise võimalik mõju katsetulemustele.

*KIRJANDUS*

- 1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H.Köpp. Berlin 1995.
- 2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- 3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- 4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- 5) 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.



▼ **M4**

- 6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- 7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- 8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- 9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- 10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- 11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.
- 12) 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.
- 13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- 14) Käesoleva lisa katsemeetod C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- 16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.
- 17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.
- 18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.
- 19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.
- 20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.
- 21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.
- 22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.
- 23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.
- 24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼ **M4**

*1. liide*

MÕISTED

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

**spetsiaalselt koostatud sete** (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

**kattev veekiht** – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

**poorivesi** – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

**rikastatud sete** – sete, millele on lisatud uuritavat ainet;

**uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

## 2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsi liiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).
2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

**Lahjendusvesi**

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, dekloritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

**Vastsete söötmine**

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemärk) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.
5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.
6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

**Väljaarenenud valmikute söötmine**

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

**▼ M4****Väljaarenemine**

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril  $20 \pm 2$  °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

**Munamassid**

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 munamassi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

**Uute kasvunõude ülesseadmine**

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

**Katselahuste M4 ja M7 valmistamine**

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ja  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kontsentratsioon sobiv.

**Kasvukeskkonna M7 valmistamine**

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitainete põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2 ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

**KIRJANDUS**

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.

## ▼ M4

Tabel 1

## Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl <sup>(1)</sup>	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl <sup>(1)</sup>	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

<sup>(1)</sup> Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.

<sup>(2)</sup> Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2

## Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabel 3

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus. Vitamiinide ühe põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahus**

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

*KIRJANDUS*

Eldnt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Eldnt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼ **M4**

## 3. liide

## SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

**Sette koostis**

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus $\leq 1$ mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartslüiv	Tera suurus: $> 50$ % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 $\mu\text{m}$	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisaldus $\geq 30$ %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 ( $\pm 0,5$ )
Kaltsiumkarbonaat	$\text{CaCO}_3$ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30–50

**Valmistamine**

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $5,5 \pm 0,5$ . Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril  $20 \pm 2$  °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema  $6,0 \pm 0,5$ . Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (lüiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

**Säilitamine**

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

**KIRJANDUS**

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10–20.

▼ **M4**

## 4. liide

**Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused**

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO <sub>3</sub> -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

(\*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

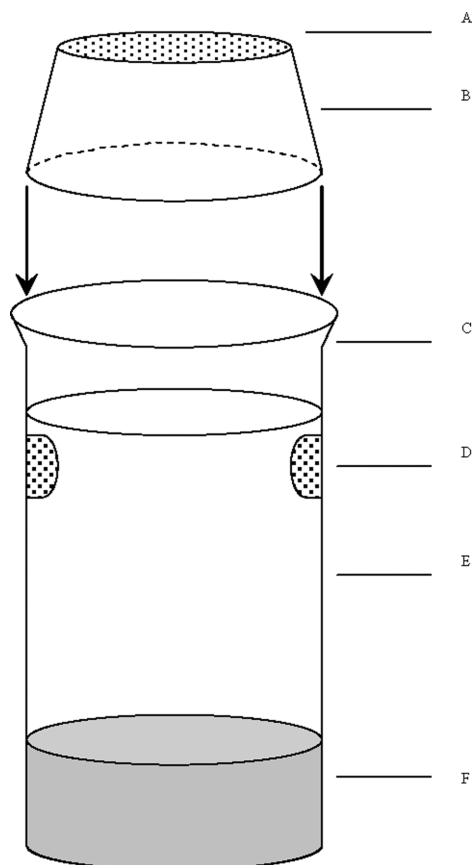


▼ **M4**

## 5. liide

**Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks**

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdreid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

D – söelaga kaetud veevahetusavad

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

E – vesi

C – tilata kokkupuutenõu

F – sete

▼ **M4****C.28. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 219 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju settes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb peamiselt BBA suunisel, milles kasutatakse sette-vee katsesüsteemi tehniliku mullaga ning veesamba kokkupuute stsenaariumiga (1). Selles võetakse samuti arvesse *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus tentans*'i kohta olemas olevaid mürgisuse määramise katse-eeskirju, mis on koostatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (10, 11).
2. Käesolevas katsemeetodis kasutatud kokkupuutestsenaarium on vee rikastamine. Sobiva kokkupuutestsenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Vee kokkupuutestsenaarium, mis hõlmab veesamba rikastamist, on kavandatud simuleerima pihustatud pestitsiidide hõljumist ja hõlmab esialgseid maksimaalseid kontsentratsioone pooriveses. See on kasulik ka muud tüüpi kokkupuudete puhul (sh keemilised lekked), v.a katseperioodist pikemate kogunemisprotsesside puhul.
3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutete suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutete puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks  $\log K_{ow} > 5$ ) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutete olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuutete arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendunud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans*'i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetset põhjust vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnapäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.
4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnapäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.
5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:
  - väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriksi ja kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste setteallikate leidmiseks;
  - katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;

## ▼M4

- spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada: mürgisuse andmed looduslike ja tehislise setetega tehtud katsetest olid mitme kemikaali puhul võrreldavad (2).
6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava ainega. Katse alguses pannakse esimese kasvujärgu vastsed katsenõudesse, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, ja seejärel lisatakse uuritav aine vette (vesi „rikastatakse” uuritava ainega). Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võib vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu x % vähenemise (näiteks EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub> jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatsetes määratud väärtustega.

## ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kätesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihi, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalise-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud (12).

## VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Võrdluskemikaale võib katsetada regulaarselt, et tagada katse-eeskirjade ja katsetingimuste täitmise usaldusväärsus. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks: lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

## KATSE KEHTIVUS

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:
- kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);
  - *C. riparius* 'e ja *C. yoshimatsui* valmikute väljaarenemine kontrollnõudes peaks toimuma 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans* 'i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;
  - katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;

**▼M4**

- vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 1,0$  °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

**MEETODI KIRJELDUS****Katsenõud**

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva vee kihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm<sup>2</sup>. Settekihi paksuse ja katva vee kihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

**Liigi valimine**

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius*'e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans*'i (4) ja *Chironomus yohimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisestest kultuurist.

**Sete**

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):
  - a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus  $\leq 1$  mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;
  - b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliiniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
  - c) 75–76 % (kuivmass) kvartslüüva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200  $\mu\text{m}$ );
  - d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;
  - e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku  $7,0 \pm 0,5$  lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ( $\text{CaCO}_3$ );
  - f) Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % ( $\pm 0,5$  %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

**▼ M4**

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

**Vesi**

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekllooritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l CaCO<sub>3</sub>-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

**Põhilahused – rikastatud vesi**

16. Katsekonsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada uuritav aine katsekeskkonnas. Mõnel juhul võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla vajalik lahusti või dispergendi kasutamine. Sobivad lahustid on atsetoon, etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergendid on Cremophor RH40, Tween 80, metüülselluloos (0,01 %) ja HCO-40. Solubiliseeriva aine kontsentratsioon lõplikus katse kasvukeskkonnas peaks olema minimaalne (s.o ≤ 0,1 ml/l) ja see peaks olema sama kõigi töötlemiste puhul. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju surusääsklaste vastsete elulemusele ega märgatavat negatiivset mõju surusääsklaste vastsetele, mida saab täheldada üksnes lahustiga tehtava kontrollkatse abil. Siiski tuleks teha kõik, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

**KATSE KAVANDAMINE**

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsalduskatset. Regressioonianalüüs on eelistatav statistilise hüpoteesi kontrollimise lähenemisviisile.

*Regressioonianalüüsi kavandamine*

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub>) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC<sub>x</sub>) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav

▼ **M4**

konsentratsioon on uuritud konsentratsioonide vahemikus. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset konsentratsiooni või ülespoole suurimat konsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat konsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).

19. Kui tuleb hinnata  $EC_{50}$ , tuleks katse teha vähemalt viie konsentratsiooniga ja iga konsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid konsentratsioone. Konsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate konsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate konsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

*Täheldatava toimeta konsentratsiooni / vähima täheldatava toimega konsentratsiooni hindamise kavandamine*

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta konsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega konsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat konsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid konsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $p = 0,05$ ). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaarenemise suhte puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisherit täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

*Piirsalduskatse*

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsalduskatse (üks katsekonsentratsioon ja kontroll). Piirsalduskatse eesmärk on näidata, et uuritava aine mürgine konsentratsioon on katsetatud piirkonsentratsioonist suurem. Käesolevas katsemeetodis soovituslikku konsentratsiooni ei esitata; see jäetakse reguleerivate asutuste otsustada. Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $p = 0,05$ ). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxon-Manni-Whitney testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisherit täpset testi.

**KATSE KÄIK**

**Kokkupuutetingimused**

*Rikastatud vee-sette süsteemi valmistamine*

22. Katsenõudesse lisatakse vähemalt 1,5 cm kihit tekimiseks vajalik kogus spetsiaalselt koostatud setet (vt punktid 13-14 ja 3. liide). Vett lisatakse 6 cm paksuse kihini (vt punkt 15). Settekihi ja veekihi paksuse suhe ei tohiks ületada 1 : 4 ja settekihi paksus ei tohiks olla suurem kui 3 cm. Sette-vee süsteem tuleks jätta enne katseorganismide lisamist seitsmeks päevaks kerge aeratsiooni tingimustesse (vt punkt 14 ja 3. liide). Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.

▼ **M4**

23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

*Katseorganismide lisamine*

24. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskelt valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatut kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskelt munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius*'e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans*'i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatu* puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Säaskede kasvujärke on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (6).

25. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 24 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni määramise korral 80.

26. 24 tundi pärast vastsete lisamist rikastatakse uuritavat ainet katva veekihi sambasse ja alustatakse uuesti kerget aereerimist. Uuritava aine lahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks katteveekiht ilma setet mõjutamata ettevaatlikult segada.

*Uuritavad kontsentratsioonid*

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiade vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekontsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.

28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemuse alusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

*Kontrollkatsed*

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatsenõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19–20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

## ▼ M4

*Katsesüsteem*

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

*Sööt*

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööd (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatsui* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi kokkupuute- ja kontrollkatsete puhul, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks  $\log K_{ow} > 5$ ) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemise ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatselluloos).

*Inkubeerimistingimused*

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mulli sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.
33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C (±2 °C). *C. tentans*’i ja *C. yoshimatsui* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (±2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksit.

*Kokkupuute kestus*

34. Kokkupuute algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius*’e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. tentans*’i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

## VAATLUSED

*Väljaarenemine*

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgiatele tundlatele kergesti äratuntavad.



▼ **M4**

36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult välja arenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist muetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

*Kasvamine ja elulemus*

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katsed alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid sõelutakse vastsete saamiseks 250 µm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

**Analüütilised mõõtmised***Uuritava aine kontsentratsioon*

38. Katse alguses (eelistatavalt tund aega pärast uuritava aine lisamist) ja lõpus tuleb analüüsida suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis. Setteproovi võtmine katse alguses võib katsesüsteemi mõjutada (näiteks katse vastsete eemaldamine), seega tuleks analüütiliste näitajate määramiseks kasutada katse alguses ja katse ajal vajaduse korral täiendavaid katsenõusid (vt punkt 39). Sette mõõtmised ei pruugi olla vajalikud, kui uuritava aine jaotumine vee ja sette vahel on võrreldavates tingimustes (näiteks sette ja vee suhe, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) tehtud vee/sette uuringu käigus täpselt määratud.

39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

40. Tsentrifugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

▼ **M4***Füüsikalis-keemilised parameetrid*

41. Katsenõude pH-d, lahustunud hapniku sisaldust katsevees ja temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

## KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

*Tulemuste töötlemine*

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emas-sääskede arengu kiirusele ja täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsidis isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks  $\chi^2$ -r  $\times$  2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.
43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad katva veekihi kontsentratsioonidel, arvatatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).
44. EC<sub>50</sub> või muu EC<sub>x</sub>-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC<sub>x</sub> usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC<sub>x</sub>-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.
45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks tähtsate toimetega kontsentratsioon / vähim tähtsate toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested* ANOVA). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

*Väljaarenemise määr*

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochrani-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisherit täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochrani-Armitage'i või Fisherit täpset testi, nagu on soovitatud (21).
47. Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv  $n_e$ , mis jagatakse lisatud vastsete arvuga  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼ **M4**

kus:

$ER$  = väljaarenemise määr

$n_e$  = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

$n_a$  = nõu kohta lisatud vastsete arv.

48. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnetti testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.
49. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ( $\sin^{-1}$ ).
50. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse  $EC_x$ -väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

*Arengu kiirus*

51. Keskmine arengu aeg väljendab keskmist ajavahemikku vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegeliku arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogeensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab  $EC_x$ -väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).
52. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval  $x$  täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva  $x$  ja päeva  $x - 1$  vahel ( $1$  = kontrollimiste vahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta ( $x$ ) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

kus:

$\bar{x}$  – keskmine arengu kiirus nõu  $i$  kohta

$i$  – kontrollivahemiku indeks

$m$  – kontrollivahemike maksimaalne arv

**▼ M4**

$f_i$  – kontrollivahemikul  $i$  välja arenenud sääskede arv

$n_e$  – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv ( $= \sum f_i$ )

$x_i$  – ajavahemikul  $i$  välja arenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1 / \left( \text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

kus:

$\text{day}_i$  (päev <sub>$i$</sub> ) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

$l_i$  – kontrollivahemiku pikkus  $i$  (päevades, tavaliselt üks päev).

**Katseprotokoll**

53. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

*Uuritav aine:*

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);
- kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

*Katseorganismi liik:*

- kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;
- katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

*Katsetingimused:*

- kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;
- loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);
- spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);
- settekihi ja katva veekihi paksus;
- katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;
- katsenõud (materjal ja suurus);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuritud kontsentratsioonide saamine;

▼ **M4**

- uuritava aine manustamine: kasutatud kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;
- inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

*Tulemused:*

- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;
- vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;
- aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;
- väljaarenenud isas- ja emassäaskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;
- iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;
- vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;
- valmikute väljaareneamise protsent iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassäased kokku);
- täielikult väljaarenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassäased kokku);
- mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks  $EC_x$  (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

*KIRJANDUS*

- 1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H. Köpp. Berlin 1995.
- 2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- 3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- 4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- 5) 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.
- 6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼ **M4**

- 7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- 8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- 9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- 10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- 11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.
- 12) 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.
- 13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- 14) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- 16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.
- 17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.
- 18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.
- 19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.
- 20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.
- 21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.
- 22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.
- 23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.
- 24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼ **M4**

*1. liide*

MÕISTED

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

**spetsiaalselt koostatud sete** (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

**kattev veekiht** – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

**poorivesi** – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

**rikastatud vesi** – katsevesi, millele on lisatud uuritavat ainet;

**uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

## 2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus* 'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsi liiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).
2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksit) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

**Lahjendusvesi**

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, dekloritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

**Vastsete söötmine**

4. *Chironomus* 'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemärk) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeenne segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.
5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.
6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

**Väljaarenenud valmikute söötmine**

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.



**▼ M4****Väljaarenemine**

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril  $20 \pm 2$  °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

**Munamassid**

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 muna-massi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.
10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

**Uute kasvunõude ülesseadmine**

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

**Katselahuste M4 ja M7 valmistamine**

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ja  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kontsentratsioon sobiv.

**Kasvukeskkonna M7 valmistamine**

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitainete põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2, ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

Tabel 1

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
$\text{LiCl}$ (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M4**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitri deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl <sup>(1)</sup>	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1) (2)</sup>	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1) (2)</sup>	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.

(2) Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused**

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabel 3

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus**

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

*KIRJANDUS*

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.

Eldt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Eldt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼ **M4**

## 3. liide

## SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

**Sette koostis**

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus $\leq 1$ mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartslüiv	Tera suurus: $> 50$ % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 $\mu\text{m}$	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisaldus $\geq 30$ %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 ( $\pm 0,5$ )
Kaltsiumkarbonaat	$\text{CaCO}_3$ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30–50

**Valmistamine**

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $5,5 \pm 0,5$ . Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril  $20 \pm 2$  °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema  $6,0 \pm 0,5$ . Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

**Säilitamine**

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

**KIRJANDUS:**

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10–20.

▼ **M4**

## 4. liide

**Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused**

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO <sub>3</sub> -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

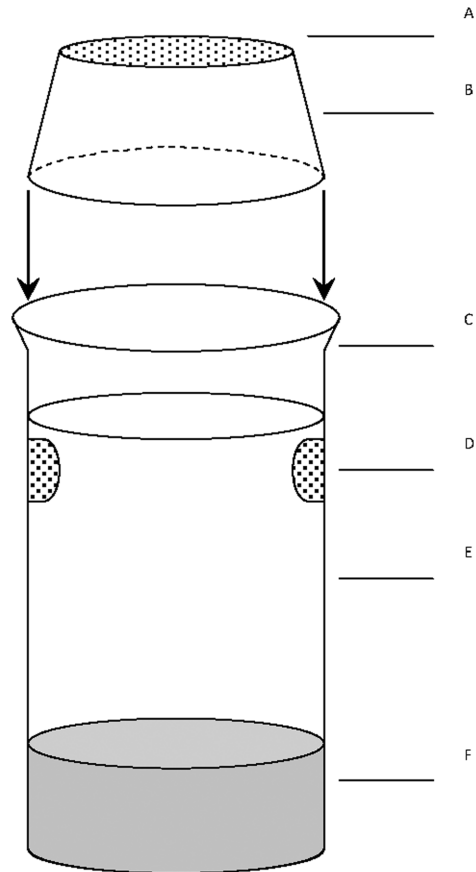
(\*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼ **M4**

## 5. liide

**Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks**

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdreid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

D – sõelaga kaetud veevahetusavad

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

E – vesi

C – tilata kokkupuutenõu

F – sete

▼ **M4****C.29. KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO<sub>2</sub> SULETUD NÕUDES (VABARUUMI KATSE)**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 310 (2006). Käesolev katsemeetod on sõelumismeetod kemikaalide kiire biolagundatavuse hindamiseks ning see annab samalaadset teavet kui käesoleva lisa peatüki C.4 meetoditena C.4-A kuni C.4-F kirjeldatud kuus katsemeetodit. Seega võib käesoleva katsemeetodi alusel positiivse tulemuse saanud kemikaali pidada kiiresti biolagundatavaks ning seepärast ka keskkonnas kiiresti lagunevaks.
  
2. Halvasti lahustuvate ja tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide uurimisel on esimene valik tavaliselt olnud süsinikdioksiidi (CO<sub>2</sub>) meetod (1), mida kasutatakse juba ammu ja mis põhineb Sturmil algsel katsel (2), millega hinnatakse orgaaniliste kemikaalide biolagundatavust mikroobide toimel moodustunud süsinikdioksiidi mõõtmise teel. Seda on samuti kasutatud lahustuvate (kuid mitte lenduvate) kemikaalide puhul, kuna süsinikdioksiidi teket peavad paljud ainsaks kindlaks tõendiks mikroobide tegevuse kohta. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist võivad põhjustada füüsikalise-keemilised protsessid (adsorbeerumine, lendumine, sadestumine, hüdroolüüs) ning ka mikroobide tegevus ja mõned mittebioloogilised hapniku sidumise reaktsioonid; harva tekib CO<sub>2</sub> orgaanilistest kemikaalidest abiootilisel teel. Algses ja muudetud Sturmil katses (1, 2) kõrvaldatakse CO<sub>2</sub> vedelfaasist absorbeerimisnõudesse läbipuhumisega (s.o CO<sub>2</sub> kõrvaldamiseks töödeldud õhu barboteerimisega läbi vedeliku), aga Larsoni versioonis (3, 4) kantakse CO<sub>2</sub> reaktsiooninõust üle absorbeerijasse CO<sub>2</sub>-vaba õhu suunamisega läbi vabaruumi ja katsenõu pideva raputamise. Reaktsiooninõud raputatakse ainult Larsoni muudetud versiooni puhul; segamine on standardis ISO 9439 (5) ette nähtud ainult lahustumatute ainete puhul ja algses Ameerika Ühendriikide versioonis (6), mõlemas kasutatakse vabaruumi õhu asendamise asemel läbipuhumist. Teises Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseameti meetodis (7), mis põhineb Gledhilli meetodil (8), on raputatav reaktsiooninõu keskkonnast isoleeritud ja tekkiv CO<sub>2</sub> kogutakse otse gaasifaasist sisemisse leelispüüdurisse nagu klassikalistes Warburgi-Barcrofti respirometri korbides.
  
3. Mitme kemikaali puhul on näidatud, et standardse muudetud Sturmil katse kasutamisel koguneb anorgaaniline süsinik kasvukeskkonda (9). Aniliini (kontsentratsioon 20 mg C/l) lagundamisel leiti anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon olevat lausa 8 mg/l. Seega ei väljenda leelispüüdurisse kogutud CO<sub>2</sub> lagunemise ajal mikrobioloogiliselt tekkinud CO<sub>2</sub> tegelikku kogust. Järelikult ei ole uuritava kemikaali kiiresti biolagunevaks klassifitseerimise tingimus, et > 60 % maksimaalsest teoreetiliselt tekkida võivast CO<sub>2</sub> kogusest tuleb koguda kümnepäevase ajavahemiku vältel (10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva), täidetud mõne kemikaali puhul, mis lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise alusel klassifitseeritaks kiiresti biolagunevaks.
  
4. Kui lagunemise protsent on eeldatavast väiksem, võib anorgaaniline süsinik olla kogunenud katselahusesse. Sel juhul võib lagunemist hinnata muude kiire biolagundatavuse katsete abil.

▼ **M4**

5. Muud Sturmi meetodi puudused (keerukas, aeganõudev, suurem katsevea tekke tõenäosus, mitte kasutatav lenduva kemikaali puhul) sundisid varem otsima gaasi läbijuhtimise asemele Gledhilli meetodile alternatiivset suletud nõu meetodit (10, 11). Boatman *et al.* (12) vaatasid varasemad meetodid läbi ja võtsid kasutusele suletud vabaruumi süsteemi, milles CO<sub>2</sub> lasti inkubatsiooni lõpus kasvukeskkonna hapestamise teel vabaruumi. CO<sub>2</sub> mõõdeti gaaskromatograafia / anorgaanilise süsiniku analüüsi abil vabaruumist automaatselt võetud proovides, aga vedelfaasis lahustunud anorgaanilist süsinikku ei võetud arvesse. Kasutatud nõud olid väga väikesed (20 ml) ja sisaldasid ainult 10 ml kasvukeskkonda, mis tekitas raskusi; näiteks oli raske lisada lahustumatu uuritava kemikaali vajalikku väga väikest kogust ja/või inokuleeritud kasvukeskkonnas ei pruukinud olla piisavalt või üldse mikroorganisme, kes suudavad uuritavat kemikaali lagundada.
  
6. Need probleemid on ületatud Struijsi ja Stoltenkampi (13) ning Birch'i ja Fletcheri (14) sõltumatute uuringutega. Viimati nimetatud autoreid inspireerisid nende kogemused seadmega, mida kasutati anaeroobse biolagunemise katses (15). Esimesena nimetatud meetodi (13) kohaselt mõõdeti CO<sub>2</sub> vabaruumis pärast hapestamist ja tasakaalustamist ning teise meetodi (14) puhul mõõdeti lahustunud anorgaaniline süsinik nii gaasilises kui ka vedelfaasis ilma töötlemiseta; üle 90 % tekkinud anorgaanilisest süsinikust leiti vedelfaasis. Mõlemal meetodil on eeliseid Sturmi katse ees, kuna nende katsesüsteem on kompaksem ja lihtsamini kasutatav, saab uurida ka lenduvaid kemikaale ning tekkinud CO<sub>2</sub> mõõtmise viivituste võimalus on välditud.
  
7. Kaks nimetatud lähenemisviisi on ühendatud ISO vabaruumi CO<sub>2</sub> standardmeetodis (16), millega on tehtud laboritevaheline võrdluskatse (17), nimetatud standardmeetod on käesoleva katsemeetodi alus. Samal viisil on Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseametis (18) kasutatud kahte lähenemisviisi. Soovitatud on CO<sub>2</sub> mõõtmise kahte meetodit, nimelt vabaruumi CO<sub>2</sub> pärast hapestamist (13) ja anorgaaniline süsinik vedelfaasis pärast leelise liia lisamist. Viimati nimetatud meetodi võttis kasutusele Peterson naftaettevõtjate Euroopa assotsiatsiooni keskkonna ning tööohutuse ja töötervishoiu toetamiseks (CONCAWE) tehtud kõnealuse vabaruumi meetodi (mida on muudetud iseenesliku biolagunemise mõõtmiseks) laboritevahelise võrdluskatse ajal (19). Käesoleva lisa peatükis C.4 esitatud kiire biolagundatavuse meetodite läbivaatamisega seoses 1992. aastal tehtud muudatused (20) on kaasatud käesolevasse katsemeetodisse ja seega on tingimused (kasvukeskkond, kestus jne) muudel puhkudel samad kui läbivaadatud Sturmi katses (20). Birch ja Fletcher (14) on näidanud, et käesoleva vabaruumi katsega väga sarnased tulemused saadi läbivaadatud katsemeetodite OECD laboritevahelises võrdluskatses samade kemikaalidega (21).

**KATSE PÕHIMÕTE**

8. Uuritavat kemikaali, tavaliselt 20 mg C/l, kui ainsat süsiniku ja energia allikat inkubeeritakse puhvermineraalsoolade kasvukeskkonnas, millesse on külvatud mikroorganismide segapopulatsioon. Katse tehakse suletud pudelites, milles on vaba ruum õhu jaoks; see tagab hapnikuvaru aeroobseks biolagunemiseks. Uuritava kemikaali täielikust aeroobsest biolagunemisest põhjustatud CO<sub>2</sub> teke määratakse sel viisil, et mõõdetakse katsepudelites tekkinud anorgaaniline süsinik ja lahutatakse sellest inokuleerimata kasvukeskkonda sisaldavates kontrollkatse nõudes tekkinud anorgaaniline süsinik. Biolagunemise ulatus väljendatakse protsendina anorgaanilise süsiniku tekkimise maksimaalsest teoreetilisest kogusest, mis arvutatakse algselt lisatud uuritava kemikaali (orgaanilise süsiniku) koguse alusel.
  
9. Võimalik on mõõta ka lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määra ja/või uuritava kemikaali esmase biolagunemise ulatust (20).



## ▼M4

## ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

10. Lagunemise protsendi arvutamiseks peab uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava kemikaali puhul aitab mõõdetud või arvatud Henry seaduse konstant leida sobiva vabaruumi ja vedeliku koguse suhte. Sobiva katsekonsentratsiooni valimiseks ning halba biolagundatavust näitavate tulemuste tõlgendamiseks on kasulik omada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele: kui ei ole teada, kas uuritav kemikaal inhibeerib mikroobide tegevust, soovitatakse kaasata inhibitsiooni kontrollrühm (vt punkt 24).

## MEETODI KASUTUSALA

11. Katset kasutatakse nii vees lahustuvate kui ka mittelahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, kuid tuleks tagada uuritava kemikaali hea dispersioon. Soovitatud vabaruumi ja vedeliku koguse suhte 1 : 2 kasutamisel on võimalik uurida lenduvaid kemikaale Henry seaduse konstandiga kuni  $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ , kuna vabaruumis oleva uuritava kemikaali osakaal ei ületa sel juhul veel 1 % (13). Lenduvama kemikaali uurimisel võib kasutada väiksemat vabaruumi, aga piiravaks teguriks võib olla selle biosaadavus, eriti kui kemikaal on vees halvasti lahustuv. Kasutaja peab siiski tagama, et vabaruumi ja vedeliku koguse suhe ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et täieliku aeroobse biolagunemise toimumiseks oleks piisavalt hapnikku (vältige näiteks substraadi suure kontsentratsiooni ja väikse vabaruumi mahu kasutamist). Suuniseid selle kohta võib leida väljaannetes (13, 23).

## VÕRDLUSKEMIKAALID

12. Katse korrektse läbiviimise kontrollimiseks tuleks paralleelselt katsetada teadaoleva biolagunevusega võrdluskemikaali. Vees lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel võib selleks kasutada aniliini, naatriumbensoati või etüleen-glükooli ja halvasti lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel 1-oktanol (13). Nimetatud kemikaalide biolagunemine peab 14 päeva jooksul jõudma > 60 %-ni maksimaalsest teoreetiliselt võimalikust anorgaanilise süsiniku kogusest.

## REPRODUTSEERITAVUS

13. Meetodi ISO standardi kohases laboritevahelises võrdluskatses (17) saadi soovitatud tingimuste kasutamisel 20 mg C uuritava kemikaaliga liitri kohta järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikordaja (%)	Laborite arv
Aniliin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Katsesisene variatsioon (korratavus) oli aniliini puhul hea ja variatsioonikordajad ei olnud peaaegu üheski katses suuremad kui 5 %. Kahel juhul, kui korratavus oli halvem, oli suurem variatsioon tõenäoliselt põhjustatud suuremahulisest anorgaanilise süsiniku tekkimisest kontrollkatses. Korratavus oli 1-oktanolil halvem, kuid jäi 79 % katsete puhul ikkagi alla 10 %. See katsesisene suurem variatsioon võis olla põhjustatud doseerimisvigadest, kuna suletud katsepudelitesse tuli lisada väike kogus (3–4 µl) 1-oktanolit. Uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooni kasutamisel on tulemuseks suuremad variatsioonikordajad, eelkõige kontsentratsioonil, mis on väiksem kui 10 mg C/l. Seda on võimalik osaliselt vältida, vähendades anorgaanilise süsiniku üldkontsentratsiooni inokulumis.

▼ **M4**

14. ELi laboritevahelises võrdluskatses, milles lisati viit pindaktiivset ainet koguses 10 mg C/l (24), saadi järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikordaja (%)	Laborite arv
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17	45	10
Diisooktüül-sulfosuktsinaat (anioonne)	72	22	9
Heksadetsüültrimetüülammooniumkloriid (katioonne) (*)	75	13	10
Isononüülfenool(etoksülaat) <sub>9</sub> (mitteioonne)	41	32	10
Kookosamiid-propüüldimetüülhüdrosü-sulfobetain (amfoteerne)	60	23	11

(\*) Mürgisuse neutraliseerimiseks lisati SiO<sub>2</sub>.

Tulemused näitavad, et enamasti oli variatsioon suurem halvemini lagunenuid pindaktiivsete ainete puhul. Katsesisene variatsioon oli väiksem kui 15 % enam kui 90 % juhtudest ja suurim variatsioon jäi vahemikku 30–40 %.

**MÄRKUS.** Enamik pindaktiivseid aineid ei ole individuaalsed ained, vaid kujutavad endast selliste isomeeride, homologide jne segu, mis lagunevad pärast erinevaid iseloomulikke ooteperioode ja erineva kineetilise kiirusega. Seetõttu on kõverad „hägused”, venivad, mistõttu ei pruugita kümnapäevase ajavahemiku jooksul jõuda nõutava 60 % väärtuseni, kuigi iga aine eraldi katsetatuna jõuaks kümne päevaga > 60 % väärtuseni. Seda võib täheldada ka muude keerukate segude puhul.

#### MEETODI KIRJELDUS

##### *Seadmed*

15. Tavalised laboriseadmed ja

a) klaasist seerumipudelid, mis on suletud butüülkummist korki ja pealevalt-sitava alumiiniumkapsliga. Soovitav suurus on nn 125 ml pudel, mille kogumaht on ligikaudu 160 ml (sel juhul peaks iga pudeli maht olema teadaolevalt 160 ± 1 ml). Kui tulemused vastavad punktides 66 ja 67 kirjeldatud tingimustele, võib kasutada väiksemaid nõusid;

b) süsiniku analüsaator või muu mõõteseade (näiteks gaaskromatograaf) anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks;

▼ **M4**

- c) suure täpsusega süstlad gaasi- ja vedelikeproovide võtmiseks;
- d) orbitaalloksuti reguleeritud temperatuuriga keskkonnas;
- e) varustatus CO<sub>2</sub>-vaba õhuga; selle tagamiseks juhitakse õhk läbi kaltsiumhüdroksiidi ja naatrium-/kaaliumhüdroksiidi segu graanulite või kasutatakse (soovi korral) gaaside segu koostisega 80 % N<sub>2</sub> ja 20 % O<sub>2</sub> (vt punkt 28);
- f) membraanfiltrimiseseade poori suurusega 0,20–0,45 µm (soovi korral);
- g) orgaanilise süsiniku analüsaator (soovi korral).

*Reagendid*

16. Kogu katse vältel tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid reagente.

*Vesi*

17. Tuleks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, mille orgaanilise süsiniku kogusisaldus on ≤ 1 mg/l. See moodustab ≤ 5 % algsest orgaanilise süsiniku sisaldusest, mis lisatakse soovitatud doosi uuritava kemikaaliga.

*Mineraalsooli sisaldava kasvukeskkonna põhilahused*

18. Põhilahused ja mineraalsooli sisaldav kasvukeskkond on samalaadsed kui standardis ISO 14593 (16) ja meetodi C.4 kiire biolagundatavuse katsetes (20). Suurema ammooniumkloriidi kontsentratsiooni kasutamine (2,0 g/l 0,5 g/l asemel) peaks olema vajalik ainult väga erandlikel juhtudel, näiteks siis, kui uuritava kemikaali kontsentratsioon on > 40 mg C/l. Põhilahuseid tuleks säilitada jahutatult ja need tuleks ära visata kuue kuu möödumisel või varem, kui esineb sadestumise või mikroobide kasvu märke. Valmistatakse järgmised põhilahused:

- a) kaaliumdivesinikfosfaat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 8,50 g;

dikaaliumvesinikfosfaat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 21,75 g;

dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 33,40 g;

ammooniumkloriid (NH<sub>4</sub>Cl) 0,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini. Lahuse pH peaks olema 7,4 (±0,2). Kui see ei ole nii, tuleks valmistada uus lahus;

- b) kaltsiumkloriidihüdraat (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 36,40 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

- c) magneesiumsulfaatheptahüdraat (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 22,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

- d) raud(III)kloriidheksahüdraat (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) 0,25 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini ning lisage üks tilk kontsentreeritud HCl.

*Mineraalse kasvukeskkonna valmistamine*

19. Segage 10 ml lahust a ligikaudu 800 ml veega (punkt 17), seejärel lisage 1 ml lahuseid b, c ja d ning lisage vett 1 liitrini (punkt 17).

*Muud reagentid*

20. Kontsentreeritud ortofosforhape (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (> 85 massiprotsenti).

▼ **M4***Naatriumhüdroksiidi lahus 7M*

21. Lahustage 280 g naatriumhüdroksiidi (NaOH) 1 liitris vees (punkt 17). Määrake saadud lahuses lahustunud anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja võtke seda näitajat katsetulemuse arvutamisel arvesse (vt punktid 55 ja 61), pidades eelkõige silmas punktis 66 esitatud kehtivuse kriteeriumi (b). Kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon on liiga suur, siis valmistage uus lahus.

*Uuritav kemikaal*

22. Valmistage vees (punkt 17) või kasvukeskkonnas (punkt 19) vees piisavalt lahustuva uuritava kemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon; vajalik võib olla põhilahuse pH reguleerimine. Põhilahust tuleks lisada mineraalse kasvukeskkonnale, et saada lõplik orgaanilise süsiniku kontsentratsioon vahemikus 2–40 mg C/l, eelistatavalt 20 mg C/l. Kui kasutatakse sellest väiksemat kontsentratsiooni, võib väheneda katse täpsus. Täpse mõõtesüstla abil võib nõudesse lisada lahustuvat või lahustumatut vedelat kemikaali. Halvasti lahustuva või lahustumatu uuritava kemikaali puhul võib vaja minna erimeetodit (25). Valikud on järgmised:

- a) teadaoleva kaalutud koguse otse lisamine;
- b) enne lisamist ultraheliga dispergeerimine;
- c) dispergeerimine emulgaatoriga; sel juhul tuleb enne lisamist kindlaks teha, kas emulgaator mõjutab (inhibeerib või stimuleerib) mikroobide tegevust;
- d) vedela uuritava kemikaali või sobiva lenduva lahusti abil saadud lahuse adsorbeerimine inertsele kandjale või tugimaterjalile (näiteks klaaskiudfilter), millele järgneb lahusti (kui seda kasutati) aurustamine ja teadaoleva koguse otse lisamine;
- e) teadaolev kogus uuritava kemikaali lahust kergesti lenduvas lahustis viiakse tühja katsenõusse ja aurustatakse seejärel lahusti.

Alapunktide c, d ja e puhul kasutatavaid aineid või lahusteid tuleb katsetada, et teha kindlaks nende võimalik stimuleeriv või inhibeeriv mõju mikroobide tegevusele (vt punkti 42 alapunkt b).

*Võrdluskemikaal*

23. Valmistage vees (punkt 17) (lahustuva) võrdluskemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon (20 mg C/l).

*Inhibeerimise kontroll*

24. Uuritavad kemikaalid sageli ei lagune kiire biolagunemise hindamiseks kasutatavates tingimustes. Üks võimalikke põhjusi on see, et uuritav kemikaal inhibeerib katses kasutataval kontsentratsioonil inokulumi. Katseprojekti võib lisada inhibeerimise kontrollkatse, et teha (tagantjärele) kindlaks inhibeerimine kui võimalik põhjus või mõjutav tegur. Alternatiivselt võib inhibeerimise kontrollkatsega kõnealuse mõju välistada ja näidata, et lagunemise puudumine või vähene lagunemine on põhjustatud üksnes vastupidavusest mikroobide rünnakule katse tingimustes. Et saada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta (aerobsetele) mikroorganismidele, valmistage katse kasvukeskkonnas lahus, mis sisaldab uuritavat kemikaali ja võrdluskemikaali (punkt 19) vastavalt igal lisatud kontsentratsioonil (vt punktid 22 ja 23).

▼ **M4***Inokulum*

25. Inokulumi saamiseks võib kasutada mitmeid allikaid: aktiivmuda; reovee väljavool (kloorimata); pinnavesi ja muld või nimetatute segu (20). Võrdluskemikaali abil tuleks kontrollida sellise inokulumi biolagundavat toimet. Olenemata lähtematerjalist ei tohiks kasutada uuritava kemikaaliga varem kokku puutunud mikroorganisme, kui meetodit kasutatakse kiire biolagundatavuse katsena.

Hoiatus. Aktiivmuda, reovesi ja reovee väljavool sisaldavad haigusetekiitajaid ja neid tuleb käsitleda ettevaatusega.

26. Kogemuste põhjal on optimaalne inokulumi kogus selline, mis
- on piisav asjakohase biolagunemise tagamiseks;
  - lagundab võrdluskemikaali kindlaksmääratud protsendi võrra (vt punkt 66);
  - tagab lõppsegus  $10^2 - 10^5$  kolooniaid moodustava ühiku olemasolu milliliitri kohta;
  - tagab aktiivmuda kasutamisel lõppsegus tavaliselt hõljuvaine kontsentratsiooni 4 mg/l, võib kasutada kontsentratsioone kuni 30 mg/l, kuid need võivad märkimisväärselt suurendada CO<sub>2</sub> tekkimist kontrollkatsetes (26);
  - ei sisalda rohkem kui 10 % uuritava kemikaaliga lisatavast orgaanilise süsiniku lähtekontsentratsioonist;
  - võimaldab lisada tavaliselt 1–10 ml inokulumi 1 liitri katselahuse kohta.

*Aktiivmuda*

27. Aktiivmuda kogutakse värskelt reoveepuhasti või peamiselt olmereovett töötleva laborimöödus seadme aeratsiooninõust. Vajaduse korral tuleks suured osakesed sõelumisega kõrvaldada (sõelaava näiteks 1 mm<sup>2</sup>) ja muda tuleks hoida kuni kasutamiseni aeroobsena.
28. Alternatiivselt võib aktiivmuda pärast suurte osakeste kõrvaldamist lasta settida või tsentrifugeida (näiteks 1 100 × g 10 minuti vältel). Supernatant valatakse ära. Muda võib pesta mineraalse lahusega. Suspenderige kontsentreeritud hõljuvaine mineraalses toitekeskkonnas, et saada kontsentratsioon 3–5 g tahkeid osakesi liitri kohta. Seejärel aereerige, kuni on vaja.
29. Muda tuleks võtta tavapärasest töökorrast puhastist. Suure koormusega puhastist pärinevat või inhibiitoreid sisaldavat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda seatakse või tsentrifugeeritakse, kõrvaldatakse supernatant ja suspenderitakse muda uuesti järgmises koguses mineraalses toitekeskkonnas. Seda korratakse, kuni muda peaks olema vaba liigest substraadist või inhibiitorist.
30. Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljuvaine kuivkaalu määramiseks.
31. Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljuvaint / l). Muda töödeldakse Waringi segistis keskmisel kiirusel 2 min. Segatud muda seatakse 30 minutit või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulumina kontsentratsioonil u 10 mg/l mineraalse kasvukeskkonna kohta.

▼ **M4**

32. CO<sub>2</sub> teket kontrollkatsetes on võimalik vähendada veel sellega, et muda aereeritakse järgmise päevani õhuga, mis ei sisalda CO<sub>2</sub>. Sellises katses kasutatakse inokulumi kontsentratsiooni 4 mg aktiivmuda tahkeid osakesi 1 liitri kohta (13).

*Reovee teisene väljavool*

33. Inokulumi võib saada ka valdavalt olmereovett töötleva puhasti või laborimöödu seadme sekundaarsest väljavoolust. Säilitage proovi aeroobsetes tingimustes ja kasutage seda võtmise päeval või laske sellel vajaduse korral kohaneda. Väljavool tuleks filtrida läbi jämefiltrit, et eemaldada suured osakesed, ja seejärel mõõta pH.
34. Väljavoolu anorgaanilise süsiniku sisalduse vähendamiseks puhutakse filtraadist läbi CO<sub>2</sub>-vaba õhku (punkti 15 alapunkt e) ühe tunni vältel, hoides ortofosforhappe abil pH väärtust 6,5 (punkt 20). Algne pH taastatakse naatriumhüdroksiidiga (punkt 21) ja pärast ligikaudu üks tund kestnud settimist võetakse inokulatsiooniks vajalik kogus supernatanti. Sellise barboteerimisega vähendatakse inokulumi anorgaanilise süsiniku sisaldust. Kui inokulumi kasutati näiteks filtritud barboteeritud väljavoolu maksimaalset soovituslikku kogust (100 ml/l), jäi kontrollnõudes olev anorgaanilise süsiniku kogus vahemikku 0,4 kuni 1,3 mg/l (14), mis moodustas 2–6,5 % uuritava kemikaaliga lisatud süsinikusisaldusest 20 mg C/l juures ja 4–13 % 10 mg C/l juures.

*Pinnavee*

35. Proov võetakse asjakohasest pinnaveest. Seda tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval. Proov peaks vajaduse korral olema kontsentreeritud filtrimise või tsentrifuugimisega. Igas katsenõus kasutatud inokulumi maht peaks vastama punktis 26 esitatud kriteeriumidele.

*Muld*

36. Maapinnast kuni 20 cm sügavuselt võetakse asjakohane mullaproov. Kivid, taimejäänused ja selgrootud tuleks mullaproovist eemaldada enne selle sõelumist läbi 2 mm avaga sõela (kui proov on kohe sõelamiseks liiga märg, kuivatage seda sõelamise võimaldamiseks osaliselt õhu käes). Proovi tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval (kui proovi transportitakse lõdvalt kinniseotud mustas polüetüleenkotis, siis võib seda kotis säilitada 2–4 °C juures kuni ühe kuu vältel).

*Inokulumi kohanemine*

37. Inokulumi võib lasta kohaneda katsetingimustega, kuid mitte uuritava kemikaaliga. Kohanemine võib vähendada CO<sub>2</sub> teket kontrollkatsetes. Kohanemine hõlmab aktiivmuda katsetemperatuuril aereerimist niiske CO<sub>2</sub>-vaba õhuga 5–7 päeva jooksul pärast muda lahjendamist katse kasvukeskkonnas kontsentratsioonini 30 mg/l.

**KATSE KÄIK***Pudelite arv*

38. Katse jaoks vajalike pudelite arv (punkti 15 alapunkt a) oleneb analüüside sagedusest ja katse kestusest.
39. On soovitatav analüüsida piisavate ajavahemike järel kolme pudelit, et oleks võimalik määrata kindlaks kümnepäevane ajavahemik. Katse lõpus analüüsitakse vähemalt viit katsepudelit (punkti 15 alapunkt a) komplektidest a, b ja c (vt punkt 42), et saaks arvutada biolagunemise keskmise protsendilise näitaja 95 % usaldusvahemikku.

▼ **M4***Inokuleeritud kasvukeskkond*

40. Inokulumi kasutatakse kontsentratsioonil 4 mg aktiivmuda tahkeid kuivi osakesi ühe liitri kohta. Vahetult enne kasutamist valmistage piisavalt inokuleeritud kasvukeskkond, lisades näiteks 2 ml töödeldud aktiivmuda (punktid 27–32) kontsentratsiooniga 2 000 mg/l 1 liitrile mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19). Reovee sekundaarse väljavoolu kasutamise korral lisage kuni 100 ml väljavoolu (punkt 33) 900 ml mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19) ja lahjendage kasvukeskkonnaga 1 liitrini.

*Pudelite ettevalmistamine*

41. Inokuleeritud kasvukeskkonna alikvoodid sisestatakse paralleelproovide pudelitesse, et saada vabaruumi ja vedeliku suhe 1 : 2 (näiteks 160 ml mahuga pudelitesse lisage 107 ml). Võib kasutada ka muud suhtarvu, kuid seejuures tuleb arvesse võtta punktis 11 esitatud hoiatust. Ükskõik kumba tüüpi inokulumi kasutamise puhul tuleb jälgida, et inokuleeritud kasvukeskkond oleks piisavalt segatud, et selle saaks ühtlaselt jaotada katsepudelitesse.
42. Valmistatakse ette järgmise sisuga pudelite komplektid (punkti 15 alapunkt a):
- a) uuritavat kemikaali sisaldavad katsenõud (tähis  $F_T$ );
  - b) ainult katse kasvukeskkonda ja inokulumi sisaldavad kontrollnõud (tähis  $F_B$ ); neisse tuleb lisada ka kõik kemikaalid, lahustid, ained või klaaskiudfiltrid, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks katsenõudesse;
  - c) nõud võrdluskemikaaliga (tähis  $F_C$ ) katse õige läbiviimise kontrollimiseks;
  - d) vajaduse korral uuritava kemikaali võimaliku inhibeeriva mõju kontrollimise nõud (tähis  $F_D$ ), mis sisaldavad nii uuritavat kemikaali kui ka võrdluskemikaali samal kontsentratsioonil kui vastavalt pudelid  $F_T$  ja  $F_C$  (punkt 24);
  - e) nõud (tähis  $F_S$ ) nagu punktis a võimaliku abiootilise lagunemise kontrollimiseks, millesse lisatakse 50 mg/l  $HgCl_2$  või mis steriliseeritakse muul viisil (näiteks autoklaavimine).
43. Vees lahustuvad uuritavad kemikaalid ja võrdluskemikaalid lisatakse põhilahustena vees (punktid 22, 23 ja 24), et saada kontsentratsioon 10–20 mg C/l.
44. Lahustumatu uuritav kemikaal ja lahustumatu võrdluskemikaal lisatakse pudelitesse sobival viisil (vt punkti 22 alapunktid a–e), olenevalt uuritava kemikaali laadist ja lisamise meetodist kas enne või pärast inokuleeritud kasvukeskkonna lisamist. Kui kasutatakse punkti 22 alapunktides a–e nimetatud meetodit, tuleks kontrollpudeleid  $F_B$  (punkti 42 alapunkt b) töödelda samal viisil, kuid ilma uuritavat kemikaali või võrdluskemikaali lisamata.
45. Lenduv uuritav kemikaal tuleks mikrosüstla abil sisestada suletud pudelisse (punkt 47). Doos arvutatakse sisestatava koguse ja uuritava kemikaali tiheduse alusel.
46. Vajaduse korral tuleks nõudesse lisada vett, et kõigis nõudes oleks ühesugune vedelikukogus. Tuleb tagada, et vabaruumi ja vedeliku suhe (enamasti 1 : 2) ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et vabaruumis on piisavalt hapnikku täieliku biolagunemise võimaldamiseks.

▼ **M4**

47. Kõik pudelid suletakse seejärel näiteks butüülkummist vahekorgi ja alumiiniumkapsliga. Lenduv uuritav kemikaal tuleks lisada selles etapis (punkt 45). Kui katselahuses jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni vähenemist ning kui anorgaanilise süsiniku algkontsentratsiooni (steriilne kontrollkatse, punkti 42 alapunkt e) või muid näitajaid määratakse aja nullpunktis, siis eemaldatakse asjaomane proov katsenõust. Katsenõu ja selle sisu tuleb seejärel kõrvaldada.
48. Suletud pudelid asetatakse pöördloksutile (punkti 15 alapunkt d), mille loksutuskiirus on piisav pudeli sisu hästi segatuna ja suspensioonis hoidmiseks (näiteks 150 kuni 200 pööret minutis), ja inkubeeritakse pimedas temperatuuril  $20 \pm 1$  °C.

*Proovide võtmine*

49. Proovide võtmise kava sõltub ooteperioodist ja uuritava kemikaali biolagunemise kineetilise kiirusest. Pudelid analüüsitakse proovivõtu päeval; proove võetakse vähemalt iga nädal või sagedamini (näiteks kaks korda nädalas), kui on vaja koostada täielik lagunemiskõver. Loksutist võetakse nõutav arv  $F_T$ ,  $F_B$  ja  $F_C$  paralleelproovide pudeleid ning, kui neid kasutatakse, siis ka  $F_I$  ja  $F_S$  pudeleid (vt punkt 42). Katse kestus on tavaliselt 28 päeva. Kui biolagunemise kõver näitab, et enne 28 päeva möödumist on jõutud platooni, siis võib katse lõpetada enne 28. päeva. Võtke proovid viiest pudelist, mis on hoitud 28. päeva analüüsi jaoks, ja kasutage tulemusi, et arvutada biolagunemise protsendi usalduspiirid või variatsioonikordaja. Inhibeerimise ja abiootilise lagunemise kontrollkatsete pudeleid ei ole vaja võtta proovideks sama sagedasti kui teisi pudeleid; piisab proovi võtmisest 1. ja 28. päeval.

*Anorgaanilise süsiniku analüüs*

50. CO<sub>2</sub> tekkimine pudelites inkubeerimise ajal tehakse kindlaks anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni suurenemise mõõtmisega. Katse jooksul tekkinud anorgaanilise süsiniku koguse mõõtmiseks on kaks soovitatud meetodit, mida on kirjeldatud allpool. Kuna meetodid võivad anda veidi erineva tulemuse, tuleks katse vältel neist kasutada ainult ühte.
51. Meetodit a soovitatakse juhul, kui kasvukeskkond võib tõenäoliselt sisaldada näiteks klaasfilterpaberi ja/või lahustumatu uuritava kemikaali jääke. Kui süsiniku analüsaatorit ei ole, siis võib selle analüüsi teha gaaskromatograafia. Vabaruumi gaasi analüüsimise käigus on tähtis, et pudelid oleksid katsetemperatuuril või sellele lähedal. Meetod b võib olla lihtsam laborile, kes kasutab anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks süsiniku analüsaatorit. On tähtis, et CO<sub>2</sub> karbonaadiks muundamiseks kasutatav naatriumhüdroksiidi lahus (punkt 21) oleks kas värskest valmistatud või selle anorgaanilise süsiniku sisaldus oleks teada, et seda saaks katsetulemuste arvutamisel arvesse võtta (vt punkti 66 alapunkt b.)

*Meetod a: hapestamine pH-ni < 3*

52. Enne iga analüüsi partiid kalibreeritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase anorgaanilise süsiniku standardi abil (näiteks 1 massiprotsent CO<sub>2</sub> N<sub>2</sub>-s). Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse kontsentreeritud ortofosforhapet (punkt 20), et viia kasvukeskkonna pH väärtusele < 3 (näiteks 107 ml katse kasvukeskkonnale lisatakse 1 ml). Pudelid pannakse tagasi loksutile. Pärast ühetunnist loksutamist katsetemperatuuril võetakse pudelid loksutilt, iga pudeli vabaruumist võetakse gaasi alikvoort (näiteks 1 ml) ja süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Anorgaanilise süsiniku mõõdetud kontsentratsioon väljendatakse ühikutes mg C/l.



▼ **M4**

53. Selle meetodi põhimõte seisneb asjaolus, et pärast hapestamist tasemele pH < 3 ja tasakaalustamist 20 °C juures on katsepudelites CO<sub>2</sub> vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise tasakaalukonstant 1,0, kui seda mõõdetakse kontsentratsioonina (13). Seda tuleks katsesüsteemi puhul vähemalt üks kord järgmiselt tõendada.

Valmistage ette pudelid, mis sisaldavad 5 ja 10 mg/l anorgaanilist süsinikku, kasutades veevaba naatriumkarbonaadi (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) lahust CO<sub>2</sub>-vabas vees, mis on valmistatud kontsentreeritud ortofosforhappe abil (punkt 20) vee pH viimisega väärtuseni 6,5, lahuse barboteerimisega järgmise päevani CO<sub>2</sub>-vaba õhuga ja pH viimisega neutraalseks leelise abil. Kontrollige, et vabaruumi mahu ja vedelikoguse suhe oleks sama kui katsete puhul (näiteks 1 : 2). Hapestage ja tasakaalustage punktis 52 kirjeldatud viisil ning mõõtko anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon nii vabaruumis kui ka vedelfaasis. Kontrollige, et need kaks kontsentratsiooni langeksid katsevea piires kokku. Kui need kokku ei lange, peaks katse tegija meetodid üle vaatama. Seda anorgaanilise süsiniku vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul; seda võib eeldatavasti teha kalibreerimise ajal.

54. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks proovid võtta eraldi (hapestamata) pudelite vedelfaasist, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

*Meetod b: CO<sub>2</sub> muundamine karbonaadiks*

55. Enne iga analüüside partiid kalibritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase standardi abil, näiteks naatriumvesinikkarbonaadi (NaHCO<sub>3</sub>) lahusega CO<sub>2</sub>-vabas vees (vt punkt 53) anorgaanilise süsiniku vahemikus 0–20 mg/l. Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse naatriumhüdrosiidi lahust (7M, punkt 21) (näiteks 107 ml kasvukeskkonna kohta lisatakse 1 ml) ja pudeleid loksutatakse tund aega katsetemperatuuril. Kõigisse konkreetsel päeval kasutatavatesse pudelitesse süstitakse sama NaOH lahust; katse eri proovivõtukordadel aga ei ole vaja kasutada sama lahust. Kui kõigil proovivõtukordadel on vaja mõõta anorgaanilise süsiniku absoluutsed väärtused kontrollkatsetes, tuleb iga kasutamise ajal määrata NaOH lahuses anorgaaniline süsinik. Pudelid võetakse loksutiilt ja neil lastakse settida. Iga nõu vedelfaasist võetakse süstlaga vajalik kogus (näiteks 50 – 1 000 µl). Proov süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse ja registreeritakse anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Kasutatav analüsaator peab olema kohandatud selle meetodiga saadavate leeliseliste proovide mõõtmiseks.
56. Selle meetodi põhimõte seisneb selles, et pärast leelise lisamist ja loksutamist on anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis ebaoluline. Katsesüsteemis tuleks seda vähemalt üks kord kontrollida anorgaanilise süsiniku standardiga, leelise lisamise, tasakaalustamise ja anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mõõtmisega nii vabaruumis kui ka vedelfaasis (vt punkt 53). Kontsentratsioon vabaruumis peaks olema nullilähedane. Kõnealust CO<sub>2</sub> peaaegu täieliku neeldumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul.
57. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks eraldi pudelite vedelfaasist (leelist lisamata) võtta proovid, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada veel muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

**▼ M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste arvutamine**

58. Kui eeldada uuritava kemikaali 100 % mineraliseerumist CO<sub>2</sub>-ni, on kontrollnõus tekkivale CO<sub>2</sub>-le lisandunud maksimaalne teoreetiliselt võimalik anorgaanilise süsiniku sisaldus (ThIC) võrdne igasse katsepudelisse katse alguses lisatud orgaanilise süsiniku kogusisaldusega (TOC), s.o:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}$$

Anorgaanilise süsiniku kogumass TIC (mg) igas pudelis on:

$$\begin{aligned} \text{TIC} &= (\text{mg C vedelikus} + \text{mg C vabaruumis}) && \text{võrrand 1,} \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned}$$

kus:

$V_L$  = vedeliku kogus pudelis (liitrites);

$C_L$  = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vedelikus (mg/l süsinikuna);

$V_H$  = kogus vabaruumis (liitrites);

$C_H$  = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis (mg/l süsinikuna).

Anorgaanilise süsiniku kogumassi (TIC) arvutamist käesolevas katses anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks kasutatud kahe analüüsimeetodi korral on kirjeldatud allpool punktides 60 ja 61. Biolagunemise protsent (% D) leitakse kummalgi juhul järgmiselt:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{võrrand 2,}$$

kus:

$\text{TIC}_t$  = anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) katsepudelis ajal t;

$\text{TIC}_b$  = keskmine anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) kontrollpudelis ajal t;

TOC = katsenõusse algselt lisatud anorgaanilise süsiniku kogumass (mg).

Biolagunemise protsent % D arvutatakse katse ( $F_T$ ), võrdluskatse ( $F_C$ ) ja (kui seda kasutatakse) inhibeerimise seire kontrollkatse ( $F_I$ ) pudelites kuni iga proovivõtuajani tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi alusel.

59. Kui katse vältel suureneb oluliselt anorgaanilise süsiniku kogumass steriilsetes kontrollnõudes ( $F_S$ ), siis võib järeldada, et uuritav kemikaal laguneb abiootiliselt, ja seda tuleb võrrandis 2 D arvutamisel arvesse võtta.

**Hapestamine pH väärtusele < 3**

60. Kuna hapestamisel pH väärtusele < 3 ja tasakaalustamisel muutuvad anorgaanilise süsiniku kogumassi kontsentratsioonid vedelfaasis ja gaasifaasis võrdseks, siis on vaja mõõta ainult gaasifaasi anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Seega saab võrrandi 1 alusel tuletada  $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$ , kus  $V_B$  on seerumipudeli maht.

**CO<sub>2</sub> muundamine karbonaadiks**

61. Selle meetodi puhul tehakse arvutused võrrandi 1 järgi, aga ebaolulist anorgaanilise süsiniku kogust gaasifaasis ei võeta arvesse, s.o  $V_H \times C_H = 0$ , ja  $\text{TIC} = V_L \times C_L$ .

▼ **M4****Tulemuste väljendamine**

62. Biolagunemise kõvera saamiseks kantakse graafikule biolagunemise protsent  $D$  sõltuvalt inkubatsiooniajast ning võimaluse korral näidatakse ootefaas, biolagunemise faas, kümnepäevane ajavahemik ja platoofaas (s.o faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks). Kui  $F_T$  paralleelkatsetes saadakse võrreldavad väärtused (erinevus  $< 20\%$ ), koostatakse keskmistatud kõver (vt 2. liite joonis 1); kui tulemused ei ole võrreldavad, koostatakse kõver iga nõu kohta. Määratakse platoofaasi biolagunemise protsendi keskvärtus või hinnatakse suurim väärtus (näiteks kui kõver hakkab platoofaasis langema); viimati nimetatud juhul on tähtis kontrollida, et väärtus ei oleks võõrväärtus. Katseprotokollis tuleb see biolagunemise maksimaalne tase märkida kui „uuritava kemikaali biolagunemise määr”. Kui katsenõude arv ei ole piisav platoofaasi kindlakstegemiseks, kasutatakse keskvärtuse arvutamiseks katse viimasel päeval mõõdetud andmeid. Viimane nimetatud väärtus, viie paralleelkatse keskmine, näitab biolagunemise protsendi määramise täpsust. Samuti tuleb registreerida kümnepäevase ajavahemiku lõpus saadud näitaja.
63. Samal viisil koostatakse võrdluskemikaali  $F_C$  biolagunemise kõver ning (kui seda kasutatakse) abiootilise kõrvaldamise kontrolli  $F_S$  ja inhibeerimise kontrolli  $F_I$  kõver.
64. Uuritava kemikaalita kontrollkatsetes ( $F_B$ ) oleva anorgaanilise süsiniku kogumass registreeritakse; samuti toimitakse  $F_S$  (abiootiline kontroll) nõude puhul, kui katses kasutati kõnealuseid kontrollnõusid.
65.  $F_I$  nõude puhul arvutatakse  $D$  teoreetiliselt võimaliku anorgaanilise süsiniku tekkimise alusel, lähtudes ainult segus oleva võrdluskemikaali sisaldusest. Kui 28. päeval  $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI})^{(2)} / D_{FC}] \times 100 > 25\%$ , siis võib eeldada, et uuritav kemikaal inhibeeris inokulumi tegevust, ja see võib seletada katse tingimustes saadud  $D_{FT}$  madalat väärtust. Sel juhul võib katset korrata, kasutades väiksemat uuritava kemikaali kontsentratsiooni ning eelistatavalt vähendades lahustunud anorgaanilise süsiniku sisaldust inokulumis ja uuritava kemikaalita kontrollnõudes tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi, kuna vastasel juhul vähendab väiksem kontsentratsioon meetodi täpsust. Alternatiivselt võib kasutada muud inokulumi. Kui kolvis  $F_S$  (abiootiline) täheldatakse anorgaanilise süsiniku kogumassi olulist suurenemist ( $> 10\%$ ), siis võis esineda abiootilist lagunemist.

**Tulemuste kehtivus**▼ **M7**

66. Katset peetakse nõuetekohaseks, kui:
- võrdluskemikaali sisaldavates nõudes  $F_C$  on keskmine lagunemise protsent  $> 60\%$  inkubatsiooni 14. päevaks ja ning
  - kontrolli nõudes  $F_B$  on anorgaanilise süsiniku kogusisalduse keskmine kogus katse lõpus  $< 3$  mg C/l.

Kui need piirmäärad ei ole täidetud, tuleks katset korrata muust allikast pärit inokulumiga ja/või kasutatud meetodid tuleks läbi vaadata. Näiteks kui probleem on rohke anorgaanilise süsiniku tekkimine kontrolli nõudes, tuleks kasutada punktides 27–32 kirjeldatud meetodit.

<sup>(1)</sup> Lagunemise protsent  $F_C$  nõudes, mis sisaldavad võrdlusainet.

<sup>(2)</sup> Lagunemise protsent  $F_I$  nõudes.

**▼ M4**

67. Kui uuritava kemikaali lagundamisel ei saavuta 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku sisaldusest ja inhibeerivat mõju ei täheldatud (punkt 65), võib katset korrata inokulumi suurema kontsentratsiooniga (kuni 30 mg/l aktiivmuda ja 100 ml väljavoolu / l) või muudest allikatest saadud inokulumiga, eelkõige siis, kui lagunemine jäi vahemikku 20–60 %.

**Tulemuste tõlgendamine**

68. Selles katses näitab biolagunemine > 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku tasemest kümnepäevase ajavahemiku jooksul, et uuritav kemikaal on aeroobsetes tingimustes kiirelt biolagundatav.
69. Kui nõutud kriteerium – 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku kogusest – ei ole täidetud, määratakse pudelites oleva kasvukeskkonna pH (ilma hapestamata või leelistamata); väärtus alla 6,5 võib viidata nitrifikatsiooni toimumisele. Sel juhul tuleb katset korrata puhverlahuse suurema kontsentratsiooniga.

**Katseprotokoll**

70. Koostatakse tabel, milles on % D väärtused iga katse ( $F_T$ ), võrdluse ( $F_C$ ) ja (kui seda kasutati) inhibeerimise kontrollnõu ( $F_I$ ) iga proovivõtu päeva kohta. Kui paralleelproovide pudelite kohta saadakse võrreldavad tulemused, siis koostatakse keskmise % D ajast sõltuvuse graafik. Registreeritakse anorgaanilise süsiniku kogumass kontrollnõudes ( $F_B$ ) ja lahustunud orgaaniline süsinik ja/või muud näitajad steriilsetes kontrollnõudes ( $F_S$ ) ning nende kõrvaldamise protsent.
71. Määratakse % D keskvärtus platoofaasis või suurim väärtus, kui biolagunemise kõver platoofaasis langeb, ning esitatakse see uuritava kemikaali lagunemise määrana. Tähtis on tagada, et viimati nimetatud juhul ei oleks suurim näitaja võõrväärtus.
72. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav kemikaal:*

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

*Katsetingimused:*

- viide käesolevale katsemeetodile;
- kasutatud katsesüsteemi kirjeldus (näiteks nõu maht, vabaruumi ja vedeliku suhe, segamise meetod jne);
- uuritava kemikaali ja võrdluskemikaali lisamine katsesüsteemi: kasutatud kontsentratsioonid ja igasse katsepudelisse lisatud süsiniku kogus ning lahustite kasutamine;
- andmed kasutatud inokulumi kohta, iga eeltöötlemine ja kohandamine;
- inkubatsioonitemperatuur;
- anorgaanilise süsiniku analüüsi põhimõtte valideerimine;
- kasutatud anorgaanilise süsiniku analüsaatori (ja muude kasutatud analüüsimetodite) peamised omadused;
- paralleelproovide arv.

*Tulemused:*

- mõõdetud biolagundatavuse andmed ja arvutatud väärtused tabeli kujul;

**▼M4**

- katse- ja võrdluskemikaali lagunemise protsendi sõltuvus ajast graafikuna, ootefaas, lagunemisfaas, kümnepäevane ajavaheemik ja tõus;
- kõrvaldamise protsent platoofaasis, katse lõpus ja pärast kümnepäevast ajavaheemikku;
- iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;
- kõik muud andmed, mis on kasutatud katsemeetodi puhul asjakohased;
- tulemuste arutelu.

*KIRJANDUS*

- 1) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine – CO<sub>2</sub> eraldumise katse (meetod C.4-C)”.
- 2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J.A., Oil Chem Soc.* 50: 159–167.
- 3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153–1161.
- 4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195–1210.
- 5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- 6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- 7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- 8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922–929.
- 9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801–812.
- 10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181–185.
- 11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51–53.
- 12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233–243.
- 13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204–211.
- 14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507–524.
- 15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527–1550.

**▼ M4**

- 16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO<sub>2</sub> headspace test).
- 17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO<sub>2</sub> biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813–1822.
- 18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- 19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219–3235.
- 20) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.
- 21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
- 22) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse”.
- 23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319–327.
- 24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO<sub>2</sub> method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- 25) ISO 10634 (1996) 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.

▼ **M4**

## 1. liide

## LÜHENDID JA MÕISTED

**IC** – anorgaaniline süsinik.

**ThCO<sub>2</sub>** – teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib uuritava kemikaali teadaolevast või mõõdetud süsinikusisaldusest uuritava kemikaali täielikul mineraliseerumisel; seda väljendatakse ka uuritava kemikaali mg kohta tekkinud süsinikdioksiidi mg-dena.

**DOC** – lahustunud orgaaniline süsinik (*dissolved organic carbon*) on lahuses olev orgaaniline süsinik või süsinik, mis läbib 0,45-mikromeetrise filtri või jääb supernatanti 15-minutilise tsentrifuugimisel ligikaudu 4 000 g (ligikaudu 40 000 m/s<sup>2</sup>) juures.

**DIC** – lahustunud anorgaaniline süsinik (*dissolved inorganic carbon*).

**ThIC** – teoreetiline anorgaanilise süsiniku sisaldus (*theoretical inorganic carbon*).

**TIC** – anorgaanilise süsiniku kogusisaldus (*total inorganic carbon*).

**Kiiresti biolagundatav** – hinnanguline klassifikatsioon sellise kemikaali kohta, mis on läbinud konkreetsed kindlaks määratud lõpliku biolagunemise sõelumiskatsed; kõnealused katsed on nii ranged, et kõnealust kemikaali võib pidada kiiresti ja täielikult biolagundatavaks veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes.

**Kümnepäevane ajavahemik** – 10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

**Iseeneslik biolagundatavus** – klassifikatsioon kemikaalide kohta, mille (esmase või lõpliku) biolagunemise kohta on mis tahes biolagundatavuse katses saadud kindlad tulemused.

**Täielik aeroobne biolagunemine** – saavutatud lagunemise määr, mille korral mikroorganismid on uuritava kemikaali täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalsooladeks ja uuteks mikroobirakkudeks (biomassiks).

**Mineraliseerumine** – mineraliseerumine on orgaanilise kemikaali täielik lagunemine CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH<sub>4</sub>-ks, CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>O-ks anaeroobsetes tingimustes.

**Ootefaas** – aeg katse algusest kuni ajani, millal lagundava toimega mikroorganismid on aklimatiseerunud ja/või kohanenud ja uuritava kemikaali või orgaanilise aine biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (näiteks 10 % maksimaalsest teoreetilisest biolagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemetodi täpsusest).

**Lagunemisfaas** – aeg ootefaasi lõpust ajani, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

**Platoofaas** – platoofaas on faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks.

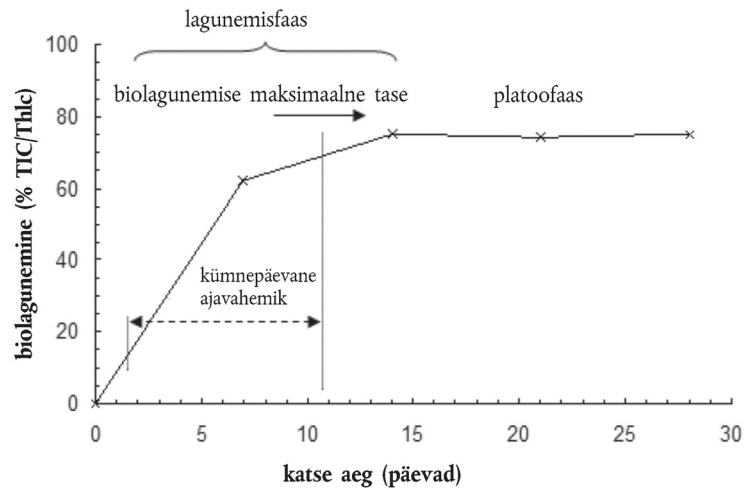
**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

2. liide

**Biolagunemise kõvera näide**

Joonis 1

**1-oktaanooli biolagunemine CO<sub>2</sub> vabaruumi katses**

Mõisted

biolagunemine

lagunemisfaas

biolagunemise maksimaalne tase

platoofaas

kümnepäevane ajavahemik

katse aeg (päevad)



▼ **M4****C.30. BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 317 (2010). Keskkonnale avalduva mõjuga seotud katsemeetoditest avaldati „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse” (käesoleva lisa peatükk C.13 (49)) ja „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides” (53) vastavalt 1996. aastal ja 2008. aastal. Vesikeskkonna bioakumulatsiooni andmete ekstrapoleerimine sellistele mullaorganismidele nagu vihmaussid on keeruline, kui üldse võimalik. Uuritava kemikaali lipofiilsusel põhinevaid mudelarvutusi, vt näiteks kirjanduse loetelust 14 ja 37, kasutatakse praegu mullas toimuva kemikaalide bioakumulatsiooni hindamiseks, näiteks ELi tehnilises juhenddokumendis (19). Keskkonnaosa-põhise katsemeetodi vajadusega on juba tegeldud, vt näiteks 55. Selline meetod on eelkõige tähtis teisese mürgisuse hindamiseks mullas elavate loomade toiduahelates (4). Mitmes riiklikus katsemeetodis käsitletakse bioakumulatsiooni muudes organismides kui kalad, vt näiteks kirjanduse loetelust 2 ja 72. USA Materjalide Katsetamise Ühing (3) on välja töötanud meetodi bioakumulatsiooni mõõtmiseks saastunud mullas elavates vihmaussides (*Eisenia fetida*, Savigny) ja valgehiimuklastes. Rahvusvaheliselt tunnustatud meetod bioakumulatsiooni määramiseks rikastatud mullas parandab kemikaalide riskihindamist maapealsetes ökosüsteemides (vt näiteks 25, 29).
2. Mulda söövad selgrootud puutuvad kokku mullas olevate kemikaalidega. Nende loomade hulgas on mulla väheharjasussidel mulla struktuuri ja toime säilitamisel tähtis osa (15, 20). Mulla väheharjasussid elavad mullas ja osaliselt maapinnal (eelkõige metsavarise kihis); nad on biomassi mõistes sageli kõige rikkalikum liik (54). Mulla bioturbatsiooni teel ja olles toiduks teistele loomadele võivad need loomad suurel määral mõjutada kemikaalide biosaadavust muudele organismidele, nagu selgrootud röövloomad (näiteks röövlestad ja -põrnikad (näiteks 64) või selgroogsed röövloomad (näiteks rebased ja kajakad) (18, 62). Mõnd mulla väheharjasusside liiki, keda praegu ökotoksikoloogilistes katsetes kasutatakse, on kirjeldatud 5. liites.
3. USA Materjalide Katsetamise Ühingu standardjuhend mulla mürgisuse või bioakumulatsiooni laborikatsete tegemise kohta *Lumbricidae* sugukonda kuuluva vihmaussiga *Eisenia fetida* ja *Enchytraeidae* sugukonda kuuluva valgehiimukaga *Enchytraeus albidus* (3) annab palju üliolulisi ja kasulikke andmeid käesoleva mullas toimuva bioakumulatsiooni katsemeetodi kasutamise kohta. Käesolevas katsemeetodis viidatud täiendavad dokumendid on käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse” (49) ja OECD katsejuhend nr 315 „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides” (53). Käesoleva katsemeetodi jaoks on tähtsad teabeallikad ka praktilised kogemused mulla bioakumulatsiooni uuringutega ja asjaomased väljaanded (näiteks 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78, 79).
4. Käesolev katsemeetod on peamiselt kasutatav stabiilsete neutraalsete orgaaniliste kemikaalide puhul, mis kalduvad adsorbeeruma mullal. Käesoleva katsemeetodi abil võib olla võimalik uurida mullaga seonduvate stabiilsete metallorgaaniliste ühendite bioakumulatsiooni. Seda saab kasutada ka metallide ja muude mikroelementide puhul.

## EELTINGIMUSED

5. Mulla väheharjasussides kemikaali bioakumulatsiooni mõõtmise katseid on tehtud raskmetallidega (vt näiteks 63) ja püsivate orgaaniliste kemikaalidega, millel on väike log  $K_{ow}$  väärtus vahemikus 3,0–6,0, vt näiteks 40. Neid katseid kasutatakse järgmiste ainete puhul:

— kemikaalid, mille log  $K_{ow}$  on suurem kui 6,0 (väga hüdrofoobsed kemikaalid);

▼ M4

- kemikaalid, mis kuuluvad teadaolevalt elusorganismides bioakumuleeruda võivate orgaaniliste kemikaalide hulka, näiteks pindaktiivsed või väga suure adsorptsioonivõimega kemikaalid;
  - kemikaalid, mille struktuuri alusel võib oletada bioakumulatsiooni, näiteks teadaolevalt bioakumuleeruvate kemikaalide analoogid;
  - metallid.
6. Enne uuringu alustamist tuleks uuritava kemikaali kohta teha kindlaks sellised andmed nagu tavanimetus, keemiline nimetus (eelistatavalt Rahvusvahelise Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) nimetus), struktuurivalem, CASi registreerimisnumber, puhtus, ohutusabinõud, säilitamistingimused ja analüüsimeetodid. Lisaks peaks olema teada järgmine teave:
- a) lahustuvus vees;
  - b) oktanooli/vee jaotuskoefitsient,  $K_{ow}$ ;
  - c) mulla/vee jaotuskoefitsient,  $K_{oc}$ ;
  - d) aururõhk;
  - e) lagunduvus (näiteks mullas, vees);
  - f) teada olevad metaboliidid.
7. Võib kasutada radiomärgistatud või radiomärgistamata uuritavat kemikaali. Analüüsi lihtsustamiseks soovitatakse siiski kasutada radiomärgistatud kemikaali. Otsus tehakse tuvastuspiiride alusel või lähtudes sellest, kas on vaja mõõta uuritavat lähtekemikaali ja metaboliite. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali ja mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust, siis on tähtis, et mullas ja katseorganismis leiduvates radiomärgisega jääkides määrataks uuritava lähtekemikaali panus ja muude märgisega kemikaalide panus, näiteks statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus võetud proovides, et oleks võimalik arvutada uuritava lähtekemikaali ja asjakohaste mulla metaboliitide bioakumulatsioonitegur (vt punkt 50). Siin kirjeldatud meetodit võib olla vaja muuta, näiteks selleks, et tagada piisav biomass radiomärgistamata orgaanilise uuritava kemikaali või metallide mõõtmiseks. Kui mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust (vedelik-stsintillatsiooni loenduriga pärast ekstraheerimist, põletamist või koe lahustamist), põhineb bioakumulatsioonitegur uuritaval lähtekemikaalil ja metaboliitidel. Eelistatavalt peaks bioakumulatsiooniteguri arvutamine põhinema uuritava lähtekemikaali kontsentratsioonil organismides ja radioaktiivsete jääkide kogusisaldusel. Seejärel tuleks arvutada bioakumulatsiooniteguri alusel elustiku-mulla akumulatsioonitegur, mis on normeeritud ussi lipiidisisalduse ja mulla orgaanilise süsiniku sisalduse järgi, et erinevate bioakumulatsiooni katsete tulemusi oleks võimalik võrrelda.
8. Peaks olema teada uuritava kemikaali mürgisus katses kasutatava liigi jaoks, näiteks toimet avaldav kontsentratsioon (EC<sub>x</sub>) või letaalne kontsentratsioon (LC<sub>x</sub>) omastamisfaasis (vt näiteks 19). Kasutatava analüüsimeetodi järgi tuleks uuritava kemikaali kontsentratsioon valida nii, et see oleks eelistatavalt ligikaudu 1 % kemikaali ägedast asümptootilisest LC<sub>50</sub> väärtusest ja vähemalt kümme korda suurem kui kemikaali tuvastamispiir mullas. Andmete olemasolu korral tuleks eelistada subletaalsete näitajate pikaajaliste uuringutega saadud mürgisusnäitajaid (51, 52). Kui selliseid andmeid ei ole, annab kasulikku teavet ägeda mürgisuse katse (vt näiteks 23).

▼ **M4**

9. Kättesaadav peaks olema asjakohane teadaoleva täpsuse ja tundlikkusega analüüsimeetod kemikaali kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks katselahustes, mullas ja bioloogilises materjalis, samuti andmed proovi valmistamise ja säilitamise kohta ning materjali ohutuskaardid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid mullas ja usside kudedes. Kui kasutatakse  $^{14}\text{C}$ -märgisega uuritavat kemikaali, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o  $\text{Bq mol}^{-1}$ ) ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent. Uuritava kemikaali eriradioaktiivsus peaks olema piisavalt suur, et võimaldada analüüsi, ja katses kasutatavad kontsentratsioonid ei tohiks olla mürgised.
10. Katsed on võimalik teha tehismullaga või loodusliku mullaga. Enne katse algust tuleks teada kasutatava loodusliku mulla omadusi, näiteks mulla või selle koostisosade päritolu, pH-d, orgaanilise süsiniku sisaldust, osakeste suurusjaotust (liiva, tolmu ja savi protsent) ning veemahutavust (3, 48).

**KATSE PÕHIMÕTE**

11. Uuritava kemikaali bioakumulatsiooni iseloomustavate parameetrite hulka kuuluvad bioakumulatsioonitegur, omastamise kiiruskonstant ( $k_s$ ) ja kõrvaldamise kiiruskonstant ( $k_e$ ). Mõisted on esitatud 1. liites.
12. Katse koosneb kahest faasist: omastamise (kokkupuute) faas ja kõrvaldamise (kokkupuutejärgne) faas. Omastamisfaasi ajal puutuvad paralleelproovide usside rühmad kokku mullaga, mida on rikastatud uuritava kemikaaliga. Lisaks katseloomadele hoitakse identsetes tingimustes, aga ilma uuritava kemikaalita, usside kontrollrühmi. Mõõdetakse katseorganismide kuivkaalu ja lipiidisisaldust. Seda võib teha kontrollrühma ussidega. Kontrollrühma usside ja mullaproovide analüüsimise teel on võimalik leida analüütilised taustnäitajad (kontrollnäitajad). Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Kõrvaldamisfaas on alati vajalik, v.a juhul, kui kokkupuutefaasi ajal uuritavat kemikaali oluliselt ei omastatud. Kõrvaldamisfaas annab teavet kiiruse kohta, millega uuritavat kemikaali katseorganismidest väljutatakse (vt näiteks 27). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, peaks kineetiliste parameetrite (kineetiline bioakumulatsioonitegur, omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstant/-konstandid) määramine põhinema eelistatavalt omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi tulemuste samaaegsel sobitamisel kineetilise mudeliga. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni ussides/ussidel jälgitakse katse kõigi faaside vältel.
13. Omastamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel kuni 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), kuni on jõutud statsionaarse olekuni (11, 12, 67). Statsionaarne olek on saavutatud, kui ussides oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse graafik jääb ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud kolme järjestikuse proovi kontsentratsioonianalüüsi tulemused ei erine üksteisest statistiliste võrdluste (näiteks variatsioonanalüüs, regressioonanalüüs) alusel rohkem kui  $\pm 20\%$ .
14. Kõrvaldamisfaas hõlmab katseorganismide ülekandmist nõudesse, mis sisaldavad sama substraati ilma uuritava kemikaalita. Kõrvaldamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel 14 päeva vältel (valgeliimuklased) või 21 päeva vältel (vihmaussid), v.a juhul, kui varasemad analüütilised määramised näitasid uuritava kemikaali jääkide 90 % vähenemist ussides. Uuritava kemikaali kontsentratsioon ussides kõrvaldamisfaasi lõpus teatakse kõrvaldamata jääkidenähtena. Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur

▼ **M4**

arvutatakse eelistatavalt ussides oleva kontsentratsiooni (Ca) ja mullas oleva kontsentratsiooni (Cs) suhtena näilise statsionaarse oleku korral ja ka kineetilise bioakumulatsioonitegurina, mis on mullast omastamise kiiruskonstandi ( $k_s$ ) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi ( $k_e$ ) (vt mõisted, 1. liide) suhe; seejuures eeldatakse esimest järku reaktsiooni kineetikat (vt arvutused, 2. liide). Kui esimest järku reaktsiooni kineetika ei ole ilmselgelt kohaldatav, tuleks kasutada muid mudeleid.

15. Omastamise kiiruskonstant, kõrvaldamise kiiruskonstant (või muude mudeliga seotud konstandid), kineetiline bioakumulatsioonitegur ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse teoreetilise mudeli võrranditest (vt juhised, 2. liide). Mudeli sobivust katseandmetega saab hinnata näiteks korrelatsioonikordaja või determinatsioonikordaja järgi (kui kordaja läheneb 1-le, kirjeldab mudel katseandmeid hästi) või hii-ruut-testiga. Mudeli sobivust võib samuti näidata määratava parameetri standardhälbe või usaldusvahemiku suurus.
16. Väga lipofiilse uuritava kemikaali katsetulemuste varieeruvuse vähendamiseks tuleks bioakumulatsioonitegureid väljendada lipiidisisalduse ja orgaanilise süsiniku sisalduse suhte alusel (kg mulla orgaanilist süsinikku ussi lipiidisisalduse kg kohta). See lähenemisviis põhineb asjaolul, et mõne kemikaalikliki puhul on bioakumulatsiooni tõenäosus selgelt seotud lipofiilsusega; kalade puhul on see täpselt kindlaks tehtud (47). Kõnealuste kemikaalide bioakumulatsioon sõltub kalade lipiidisisaldusest. Põhjaloomade puhul on leitud samalaadseid korrelatsioone, vt näiteks 30, 44. See korrelatsioon on samuti tõendatud mulla väheharjasusside puhul, vt näiteks 5, 6, 7, 14. Kui usside biomassi on piisavalt, saab katseloomade lipiidisisalduse määrata samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava kemikaali kontsentratsiooni. Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi.

**KATSE KEHTIVUS**

17. Katse kehtivuse tagamiseks peavad nii kontrollrühmade kui ka katseryhmade puhul olema täidetud järgmised kriteeriumid:
- katse lõpus ei tohiks kogusuremus omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal ületada 10 % (vihmaussid) või 20 % (valgeliimuklased) kasutatud usside koguarvust;
  - *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* puhul ei tohiks omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi lõpus mõõdetud keskmine massi kadu ületada 20 % võrrelduna algse toorkaaluga kummagi faasi alguses.

**MEETODI KIRJELDUS****Katses kasutatavad liigid**

18. Bioakumulatsiooni katsetamisel soovitatakse kasutada mitut mulla väheharjasusside liiki. Enim kasutatavaid liike *Eisenia fetida* või *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*) või *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* või *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*) on kirjeldatud 5. liites.

▼ **M4****Seadmed**

19. Tuleks olla tähelepanelik, et vältida seadmete kõigis osades selliste materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat kemikaali adsorbeerida või muid kemikaale eraldada ja avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Koostöös koormuse määraga, s.o katseusside arvuga, võib kasutada tavapäraseid riskülikukujulisi või silindrilisi nõusid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist ja on sobiva mahuga. Katse kasvukeskkonnaga kokku puutuvates seadmetes võib kasutada roostevaba terast, plastikut või klaasi. Katse nõud peaksid olema korralikult kaetud, et vältida usside põgenemist, võimaldades samas piisavat õhuvarustust. Suure adsorptsioonikoefitsiendiga kemikaalide korral (näiteks sünteetilised püretroidid) võib olla vaja kasutada silaannitud klaasi. Sellistel juhtudel tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata (49). Tuleks takistada radiomärgistatud uuritavate ainete ja lenduvate kemikaalide väljapääsemist. Katsenõudest auruvate jääkide väljapääsemise vältimiseks tuleks kasutada separaatoreid (näiteks klaaspudelid gaasi pesemiseks), mis sisaldavad sobivaid absorbente.

**Muld**

20. Katsemuld peaks olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseorganismidel selles elada ja eelistatavalt paljuneda aklimatiseerumise ja katse ajavahemike vältel, ilma et neil tekiks ebatavalisi muutusi välimuses või ebatavalist käitumist. Ussid peaksid saama mulda kaevuda.
21. Katsetes soovitatakse substraadina kasutada käesoleva lisa peatükis C.8 (48) kirjeldatud tehismulda. Bioakumulatsiooni katsetes kasutatava tehismulla valmistamine ja soovitused tehismulla säilitamiseks on esitatud 4. liites. Õhu käes kuivatatud tehismulda võib kuni kasutamiseni säilitada toatemperatuuril.
22. Katsemullana ja/või kultuuri kasvumullana võib siiski kasutada looduslikku mulda saastumata kohtadest. Loodusliku mulla kirjeldamisel tuleks esitada vähemalt järgmised andmed: päritolu (võtmise koht), pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus ja veesisalduse protsent (3). Kasulikku teavet peaks andma mulla või selle koostisosade mikrosaasteainete analüüsi tegemine enne kasutamist. Kui kasutatakse põllumulda, siis ei tohiks seda olla töödeldud taimekaitsevahenditega ega väetatud töödeldud loomade sõnnikuga vähemalt üks aasta ning orgaanilise väetisega vähemalt kuus kuud enne proovivõttu (50). Loodusliku mulla käsitlemise meetodeid enne väheharjussidega tehtavates ökotoksikoloogilistes laborikatsetes kasutamist on kirjeldatud väljaandes 3. Loodusliku mulla puhul tuleks laboris säilitamise aeg hoida võimalikult lühikesena.

**Uuritava kemikaali kasutamine**

23. Uuritav kemikaal viiakse mulla sisse. Seejuures tuleks arvesse võtta kemikaali füüsikalise-keemilisi omadusi. Vees lahustuv uuritav kemikaal tuleks enne mullaga segamist vees täielikult lahustada. Halvasti vees lahustuva uuritava kemikaali puhul soovitatakse üks või mitu (tehisluku) mulla koostisosa katta uuritava kemikaaliga. Näiteks kvartsi liiva või osa sellest võib immutada sobivas orgaanilises lahustis lahustatud uuritava kemikaaliga; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Kemikaaliga kaetud mullakomponendi saab seejärel segada niiske mulla sisse. Selle meetodi

▼ **M4**

peamine eelis on see, et lahustit mulda ei lisata. Kui kasutatakse looduslikku mulda, võib uuritavat kemikaali lisada mulla õhu käes kuivatatud osa rikastamise teel, nagu on kirjeldatud eespool tehniliku mulla puhul, või uuritava kemikaali ja niiske mulla segamisega, kasutades seejärel aurustamise etappi (kui kasutatakse lahustit). Üldiselt tuleks võimaluste piires vältida niiske mulla kokkupuudet lahustitega. Arvestada tuleks järgmist (3):

- kui vee asemel kasutatakse muud lahustit, peaks see olema veega segunev ja/või seda peaks olema võimalik kõrvaldada (näiteks aurustada), nii et mulda jääb ainult uuritav kemikaal;
  - kui kasutatakse lahusti kontrollrühma, ei ole negatiivne kontrollrühm vajalik. Lahusti kontrollkatses tuleks kasutada mullale lisatud lahusti suurimat kontsentratsiooni ja lahusti peaks olema samast partiist, mida kasutati põhilahuse valmistamisel. Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis.
24. Veep ja orgaanilistes lahustites halvasti lahustuva kemikaali korral võib soovitud katsekonsentratsiooni saamiseks segada uuritava kemikaali kogusega 2,0–2,5 g (näiteks uhmri ja nuiaga abil) peeneks jahvatatud kvartslüüva katsenõu kohta. See kvartslüüva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelnevalt niisutatud mullale ning segatakse sellega põhjalikult läbi ja lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saada sobiv niiskusesisaldus. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Protseduuri korratakse iga katsekonsentratsiooni puhul ja samuti valmistatakse ette sobiv kontrollkatsenõu, kus on 2,0–2,5 g peeneks jahvatatud kvartslüüva katsenõu kohta.
25. Pärast rikastamist tuleks määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas. Enne katseorganismide lisamist tuleks kontrollida, et uuritav kemikaal oleks mullas jaotunud ühtlaselt. Katseprotokollis kirjeldatakse rikastamiseks kasutatud meetodit ja esitatakse konkreetse rikastamismeetodi valimise põhjused (24).
26. Ideaaljuhul tuleks enne organismide lisamist kindlaks teha, et mulla- ja pooriveefaasi vahel on tekkinud tasakaaluolek; soovituslik on neljapäevane ajavahemik 20 °C juures. Veep halvasti lahustuva orgaanilise kemikaali puhul võib adsorbeerunud ja lahustunud fraktsiooni tegeliku tasakaaluolekuni jõudmiseks kuluda päevi või kuid. Olenevalt uuringu eesmärgist, näiteks keskkonnatingimuste imiteerimisel, võib rikastatud mulda vanandada kauem, näiteks metallide puhul kolm nädalat temperatuuril 20 °C (22).

#### **Katseorganismide kultuurid**

27. Usse tuleks eelistatavalt pidada alalises laborikultuuris. Suunised *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* ning *Enchytraeidae* sugukonna liikide laborikultuuri meetodite kohta on esitatud 5. liites (vt ka 48, 51, 52).
28. Katsetes kasutatavatel ussidel ei tohiks olla nähtavaid haigusi, hälbeid ega parasitiidid.

#### **KATSE KÄIK**

29. Katseorganismid puutuvad uuritava kemikaaliga kokku omastamisfaasi ajal. Omastamisfaasi kestus peaks olema 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), v.a juhul, kui tõendatakse statsionaarse olekuni jõudmist.

▼ **M4**

30. Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Esimene proov tuleks võtta 4–24 tunni möödumisel kõrvaldamisfaasi algusest. 21-päevase omastamisfaasi ja 21-päevase kõrvaldamisfaasi proovivõtu ajakavade näidised on esitatud 3. liites.

**Katseorganismid**

31. Mitme mulla valgeliimuklase liigi isendi kaal on väga väike (näiteks märgkaal 5–10 mg isendi kohta *Enchytraeus albidus*’e puhul ja veel väiksem *Enchytraeus crypticus*’e või *Enchytraeus luxuriosus*’e puhul); kaalu mõõtmiseks ja keemiliste analüüside tegemiseks võib olla vaja koondada paralleelproovi katsenõude ussid (s.o ühe koeanalüüsi tulemuse saamiseks kasutatakse kõiki paralleelproovi nõu usse). Igale paralleelproovile lisatakse 20 valgeliimuklase isendit ja kasutada tuleks vähemalt kolme paralleelproovi. Kui uuritava kemikaali analüütiline tuvastuspiir on kõrge, võib osutada vajalikuks kasutada rohkem usse. Suurema isendi massiga katseliikide (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*) korral võib kasutada ühte isendit sisaldavaid paralleelproovide nõusid.
32. Katses kasutatavad vihmaussid peaksid olema sarnase massiga (näiteks *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* isendi mass peaks olema 250–600 mg). Valgeliimuklaste (näiteks *Enchytraeus albidus*’e) pikkus peaks olema ligikaudu 1 cm. Kõik konkreetsetes katses kasutatavad ussid peaksid olema sama päritoluga ja tegemist peaks olema *clitellum*’iga täiskasvanud isenditega (vt 5. liide). Kuna looma mass ja vanus võivad bioakumulatsioonitegurit mõjutada (näiteks erineva lipiidisisalduse ja/või munade olemasolu tõttu), tuleks need parameetrid täpselt registreerida ja neid tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Lisaks sellele võivad kokkupuutefaasi vältel lisanduda kookonid, mis mõjutavad samuti bioakumulatsioonitegurit. Keskmiste märg- ja kuivmasside hindamiseks soovitatakse enne katset kaaluda katseusside alamproovi.
33. Tuleks kasutada suurt mulla ja usside suhtarvu, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni vähenemine mullas omastamisfaasi ajal oleks minimaalne. *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* korral on soovituslik vähemalt 50 g mulla kuivmassi ussi kohta ja valgeliimuklaste puhul vähemalt 10–20 g mulla kuivmassi katsenõu kohta. Nõud peaksid sisaldama 2–3 cm (valgeliimuklasted) või 4–5 cm (vihmaussid) mullakihti.
34. Katses kasutatud ussid kõrvaldatakse kultuurist (näiteks valgeliimuklasted juveliiripintsettide abil). Täiskasvanud isendid kantakse üle töötlemata katsemulda aklimatiseerumiseks ja neid söödetakse (vt punkt 36). Kui katsetingimused erinevad kultuuri tingimustest, peaks ussidele katsetingimustega kohanemiseks piisama 24–72-tunnisest aklimatiseerumisfaasist. Pärast aklimatiseerumist loputatakse vihmausse, tõstes nad puhta veega klaasnõusse (näiteks Petri tassile), ja seejärel kaalutakse vihmaussid enne katsemulda panemist. Enne kaalumist tuleks liigne vesi ussi küljest kõrvaldada, puudutades ussiga õrnalt tassi serva või kuivatades ettevaatlikult veidi niisutatud paberrätikuga.
35. Tuleks jälgida katseorganismide kaevumiskäitumist ja see tuleks registreerida. Vihmaussidega tehtavates katsetes kaevuvad loomad (kontrollrühmas ja töötlusrühmas) tavaliselt paari tunniga mulla sisse; seda tuleks kontrollida usside katsenõudesse panemisest hiljemalt 24 tunni möödumisel. Kui vihmaussid mulda ei kaevu (näiteks omastamisfaasist rohkem kui poole

**▼ M4**

möödumisel rohkem kui 10 %), siis see näitab, et kas ei ole katsetingimused sobivad või ei ole katseorganismid terved. Sellisel juhul tuleks katse peatada ja seda tuleks korrata. Valgeliimuklased elavad peamiselt mullaosakestevahelistes poorides ja nende välispind võib ümbritseva substraadiga sageli ainult osaliselt kokku puutuda; kaevunud ja mittekaevunud valgeliimuklaste kokkupuude eeldatakse olevat samaväärne ning eeldatakse, et valgeliimuklaste mittekaevumise puhul ei pruugi katse kordamine vajalik olla.

**Söötmine**

36. Vähese orgaanilise süsiniku kogusisaldusega mulla kasutamise korral tuleks ette näha söötmine. Tehismulla kasutamise korral soovitatakse vihmaussidele iga nädal (s.o usse tuleks sööta kord nädalas) sööta 7 mg kuivatatud sõnniku mulla kuivmassi g kohta ja valgeliimuklaste puhul iga nädal 2–2,5 mg jahvatatud kaerahelbeid mulla kuivmassi g kohta (11). Esimene söödakogus tuleks segada mullaga vahetult enne katseorganismide lisamist. Eelistatavalt tuleks kasutada sama tüüpi sööta, mida kasutatakse kultuuris (vt 5. liide).

**Valgus ja temperatuur**

37. Katse tuleks teha kontrollitud valgustustsükliga 16 tundi valgust / 8 tundi pimedust, valgustatus katsenõu piirkonnas eelistatavalt 400–800 luksi (3). Katsetemperatuur peaks olema kogu katse vältel  $20 \pm 2$  °C.

**Katsekontsentratsioonid**

38. Kasutatakse ühte kontsentratsiooni. Täiendava(te) kontsentratsiooni(de) kasutamise vajadust tuleks põhjendada. Kui uuritava kemikaali mürgisus (EC<sub>x</sub>) on ligilähedane analüütilise tuvastuspiiriga, siis on soovitatav kasutada suure eriradioaktiivsusega radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Metallide puhul peaks kontsentratsioon ületama koe ja mulla taustaset.

**Paralleelproovid**

39. Kineetiliste mõõtmiste puhul (omastamisfaas ja kõrvaldamisfaas) peaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovide arv olema vähemalt kolm iga proovivõtupunkti kohta. Ettevalmistatud paralleelproovide koguarv peaks olema piisav, et hõlmata kõik proovivõtuajad omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal.
40. Kui lahustina kasutatakse ainult vett, tuleks bioloogiliste vaatluste ja mõõtmiste jaoks (näiteks kuiv- ja märgmassi suhe, lipiidisisaldus) ning usside ja mulla taustkontsentratsioonide analüüsiks ette näha vähemalt 12 negatiivse kontrollrühma paralleelproovinõu (millest neljast võetakse proov alguses, neljast omastamise lõpus ja neljast kõrvaldamise lõpus). Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustavat ainet, tuleks lisaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovidele kasutada ka lahusti kontrollrühma (neljast paralleelproovi nõust tuleks võtta proov alguses, neljast omastamisfaasi lõpus ja neljast kõrvaldamisfaasi lõpus), mis hõlmab kõiki koostisosi peale uuritava aine. Sel juhul võib samuti ette näha negatiivse kontrollrühma neli täiendavat paralleelproovi nõud (ilma lahustita) valikuliseks proovivõtuks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelproove võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Soovitatakse ette näha piisav kogus täiendavaid paralleelproovi varunõusid (näiteks kaheksa) kemikaaliga töötlemise ja kontrollrühma(de) jaoks.



▼ **M4****Mulla kvaliteedi mõõtmise sagedus**

41. Mulla pH-d, niiskusesisaldust ja temperatuuri (pidevalt) katseruumis tuleks mõõta omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi alguses ja lõpus. Kord nädalas tuleks kontrollida mulla niiskusesisaldust, kaaludes katsenõusid ja võrreldes tegelikku massi katse alguse esialgse massiga. Veekadu tuleks kompenseerida deioniseeritud vee lisamisega.

**Usside ja mulla proovide võtmine ja analüüsimine**

42. Vihmausside ja valgeliimuklaste bioakumulatsiooni katsete omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajakava näidis on esitatud 3. liites.
43. Katsenõudest võetakse mullaproov, et määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon enne usside lisamist ning omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid ussides ja mullas. Tavaliselt mõõdetakse mulla kogukontsentratsioone. Soovi korral võib mõõta poorivee kontsentratsioone; sel juhul tuleks enne uuringu alustamist formuleerida põhjendus ja ette näha asjakohased meetodid ning esitada need katseprotokollis.
44. Ussidest ja mullast võetakse proovid vähemalt kuuel korral omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi vältel. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal on stabiilne, võib mullaproovide arvu vähendada. Omastamisfaasi alguses ja lõpus soovitatakse analüüsida vähemalt kolme paralleelproovi. Kui omastamisfaasi lõpus mõõdetud kontsentratsioon mullas erineb algsest kontsentratsioonist rohkem kui 30 %, tuleks analüüsida ka muudel kuupäevadel võetud mullaproove.
45. Kõrvaldage konkreetse paralleelproovi ussid igal proovivõtukorral mullast (näiteks pärast paralleelproovi mulla laotamist madalale alusele ja kasutades usside tõstmiseks pehmeid juveliiripintsette) ja loputage neid kiiresti veega madalas klaasis või terasalusel. Eemaldage liigne vesi (vt punkt 34). Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad, sh nende soolestiku sisu, viivitamata.
46. Vihmaussidel (*Eisenia* sp.) tuleks lasta seejärel oma soolestiku sisu öö jooksul väljutada, näiteks kaetud Petri tassil olevale niiskele filterpaberile (vt punkt 34). Pärast väljutamist tuleks teha kindlaks usside kaal, et hinnata katse vältel võimalikku biomassi vähenemist (vt kehtivuse kriteeriumid punktis 17). Valgeliimuklaste kaalumise ja kudede analüüs viiakse ellu ilma väljutamiseta, kuna see on nende usside väiksuse tõttu tehniliselt keerukas. Pärast lõplikku massi määramist tuleks ussid viivitamata kõige asjakohasema meetodi abil surmata (näiteks vedela lämmastiku abil või külmutamisega temperatuurini alla  $-18$  °C).
47. Kõrvaldamisfaasi ajal asendavad ussid saastunud soolestiku sisu puhta mullaga. See tähendab, et vahetult enne kõrvaldamisfaasi võetud väljutamata soolestiku sisuga usside (praegusel juhul valgeliimuklased) proovid sisaldavad saastunud mulda. Veekeskonna väheharjasusside puhul eeldatakse, et pärast esialgset 4–24-tunnist kõrvaldamisfaasi on enamik saastunud soolestiku sisust asendatud puhta settega, vt näiteks 46. Samalaadsetest tulemustest on teatatud vihmausside puhul radiomärgistatud kaadmiumi ja tsingi akumulatsiooni uuringutes (78). Väljutamata soolestiku sisuga valgeliimuklaste puhul võidakse käsitada kõnealust kõrvaldamisfaasi esimese proovi kontsentratsiooni kui kudede kontsentratsiooni pärast soolestiku tühjendamist. Uuritava aine kontsentratsiooni saastamata mullast tingitud lahjenemise arvessevõtmiseks kõrvaldamisfaasis võib hinnata soolestikusisalduse massi ussi märgmassist / ussi tuha massist või ussi kuivmassi / ussi tuha massi suhetest.

**▼ M4**

48. Mulla- ja ussiproove tuleks eelistatavalt analüüsida viivitamata pärast kõrvaldamist (s.o 1–2 päeva jooksul), et vältida lagunemist või muid kadusid, ja katse vältel on soovitatav arvutada ligikaudseid omastamis- ja kõrvaldamismäärasid. Kui analüüs tehakse hiljem, tuleks proove säilitada sobiva meetodi abil, näiteks sügavkülmutamise teel ( $\leq -18$  °C).
49. Tuleks kontrollida, et keemilise analüüsi täpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava kemikaali saagis mulla- ja ussiproovidest oleks kõnealuse meetodi jaoks rahuldav; tuleks registreerida ekstraktsiooni tõhusus, tuvastuspiir ja määramispiir. Samuti tuleks kontrollida, et kontrollnõudes ei oleks uuritava kemikaali kontsentratsioon suurem tausttasemest. Kui uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis Ca on kontrollrühma ussides  $> 0$ , tuleks seda arvestada kineetiliste parameetrite arvutamisel (vt 2. liide). Kõiki proove tuleks kogu katse vältel käsitleda nii, et minimeeritaks kaod ja saastumine (näiteks proovivõtuseadmele uuritava kemikaali adsorbeerumise tõttu).
50. Radiomärgistatud uuritava kemikaaliga töötamisel on võimalik analüüsida lähteainet ja metaboliite. Uuritava lähtekemikaali ja metaboliitide kvantitatiivne määramine statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus annab olulist teavet. Proove tuleks seejärel „puhastada”, et oleks võimalik määrata eraldi uuritava lähtekemikaali kogust. Kui mõne metaboliidi radioaktiivsus moodustab üle 10 % analüüsitud proovi(de) koguradioaktiivsusest, on soovitatav kõnealused metaboliidid tuvastada.
51. Uuritava kemikaali üldsaagis ning ussides, mullast ja aurunud uuritava kemikaali püüdmiseks kasutatavatest absorbente sisaldavatest püüduritest (kui neid kasutatakse) määratud saagised tuleks registreerida ja esitada katseprotokollis.
52. Konkreetsest katsenõust võetud isendite proovide koondamine on lubatav vihmaussist väiksemate valgeliumuklaste puhul. Kui koondamine tähendab paralleelproovide arvu vähenemist, piirab see statistilisi meetodeid, millega on võimalik andmeid töödelda. Kui on vaja kasutada teatavat statistilist meetodit ja tagada andmete täpsus, tuleks proovide koondamist arvestades kasutada katses piisavat arvu paralleelproovidega katsenõusid selle tagamiseks.
53. On soovitatav, et bioakumulatsioonitegur oleks väljendatud nii summaarse kuivmassi funktsioonina kui ka vajaduse korral (näiteks väga hüdrofoobse kemikaali puhul) lipiidisisalduse funktsioonina. Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada asjakohaseid meetodeid (selleks tuleks kasutada mõnd olemasolevat meetodit, vt näiteks 31, 58). Nende meetodite puhul kasutatakse ekstraheerimist kloroformi/metanooliga. Klooritud lahustite kasutamise vältimiseks tuleks siiski kasutada Blighi ja Dyeri meetodi (9) muudetud versiooni (17). Kuna eri meetodid ei pruugi anda sama tulemust, on tähtis kirjeldada kasutatud meetodit. Kui see on võimalik, s.o kui usside kude on piisavalt, tuleks lipiidide analüüs teha ideaaljuhul sama proovi või ekstraktiga, mida kasutati uuritava kemikaali analüüsiks, kuna lipiidid tuleb ekstraktist sageli kõrvaldada, enne kui ekstrakti on võimalik kromatograafiliselt analüüsida (49). Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi; lipiidisisaldust on vaja teada bioakumulatsiooniteguri näitajate normeerimiseks. Viimasel juhul väheneb seadmete saastumine uuritava kemikaaliga.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

54. Uuritava kemikaali omastamise kõvera saamiseks kantakse aritmeetilises skaalas graafikule kemikaali kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis sõltuvana ajast. Kui kõver on jõudnud platoole või statsionaarsesse olekusse (vt mõisted, 1. liide), arvutatakse statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur järgmise võrrandi alusel:

$$\frac{C_a \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}{C_s \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}$$

$C_a$  on uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis;

$C_s$  on uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas.

55. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta, tuleks statsionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel määrata kiiruskonstantidel põhinev kineetiline bioakumulatsioonitegur, nagu on kirjeldatud allpool:

- määratakse akumulatsioonitegur ( $BAF_K$ ) suhtena  $k_s/k_e$ ;
- omastamise ja kõrvaldamise kiirused arvutatakse eelistatavalt ühel ajal (vt 2. liide, võrrand 11);
- kõrvaldamise kiiruskonstant ( $k_e$ ) määratakse tavaliselt kõrvaldamise kõvera alusel (s.o kõrvaldamisfaasis ussides leiduva uuritava aine kontsentratsiooni graafikust). Omastamise kiiruskonstant  $k_s$  arvutatakse seejärel  $k_e$  ja  $C_a$  väärtuse alusel, mis tuletatakse omastamise kõverast – nende meetodite kirjeldus on esitatud 2. liites. Kineetilise bioakumulatsiooniteguri ja kiiruskonstantide  $k_s$  ja  $k_e$  saamiseks eelistatud meetod on kasutada arvutis mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid. Kui kõrvaldamine ei ole ilmselgelt esimest järku, tuleks kasutada keerukamaid mudeleid.

**Katseprotokoll**

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav kemikaal:*

- kogu kättesaadav teave, milles käsitletakse uuritava kemikaali ägedat ja pikaajalist mürgisust (näiteks  $EC_{x}$ ,  $LC_{x}$ , täheldatava toimeta kontsentratsioon) mullas elavatele väheharjasussidele;
- puhtus, füüsikaline olek ja füüsikalise-keemilised omadused, näiteks  $\log K_{ow}$ , lahustuvus vees;
- kemikaali tunnusandmed; uuritava aine päritolu, kasutatud lahusti nimetus ja kontsentratsioon;
- kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis märgistatud aatomite täpne asukoht, eriradioaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

*Katseliik:*

- teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltöötused, aklimatiseerumine, vanus, suuruse vahemik jms.

▼ **M4***Katsetingimused:*

- kasutatud katsemeetod;
- kasutatud valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);
- katse kava (näiteks katsenõude arv ja suurus, mulla mass ja mullakihi paksus, paralleelproovide arv, usside arv paralleelproovi kohta, katsekonsentratsioonide arv, omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi kestus, proovivõtu sagedus);
- katsenõu materjali valiku põhjendus;
- uuritava aine valmistamise ja kasutamise meetod ning samuti konkreetse meetodi valimise põhjused;
- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed katsenõudes ning hälvete arvutamise meetod;
- tehismulla koostisosade päritolu või looduslike kasvukeskkondade kasutamisel mulla päritolu, eeltöötlemise kirjeldus, kontrollrühmade tulemused (elulemus, biomassi teke, paljunemine), mulla omadused (pH, orgaanilise süsiniku kogusisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus, veesisalduse protsent katse alguses ja lõpus ning kõik muud tehtud mõõtmised);
- üksikasjalik teave mulla- ja ussiproovide töötlemise kohta, sh andmed uuritava aine valmistamise, säilitamise, rikastamismeetodite, ussidest ja mullast ekstraheerimise ja analüüsimise meetodite (ning täpsuse) kohta ning lipiidisisalduse kohta (kui mõõdeti) ja uuritava aine analüüsisaagiste kohta.

*Tulemused:*

- kontrollrühma usside ja iga katsenõu usside suremus ning mis tahes täheldatud ebatavaline käitumine (näiteks mulla vältimine, mittepaljunemine valgeliimuklastega tehtavates bioakumulatsiooni katsetes);
- mulla ja katseorganismide kuivmassi ja märgmassi suhe (mis on vajalik normeerimise jaoks);
- usside märgmassid igal proovivõtuajal; vihmausside puhul märgmassid katse alguses ja igal proovivõtukorral enne ja pärast soolestiku tühjendamist;
- katseorganismide lipiidisisaldus (kui määrati);
- kõverad, mis näitavad uuritava kemikaali omastamise ja kõrvaldamise kineetikat ussides ja statsionaarse olekuni jõudmiseks vajalikku aega;
- $C_a$  ja  $C_s$  (standardhälbe ja vahemikuga, kui see on asjakohane) kõigi proovivõtuagega kohta ( $C_a$  väljendatud g-des kogu keha märg- ja kuivmassi  $kg^{-1}$  kohta,  $C_s$  väljendatud g-des mulla märg- ja kuivmassi  $kg^{-1}$  kohta). Kui on vaja leida elustiku-mulla akumulatsioonitegur (näiteks eri lipiidisisaldusega loomadega tehtud katsete tulemuste võrdlemiseks), võib  $C_a$  olla väljendatud ka g-des organismi lipiidisisalduse  $kg^{-1}$  kohta ja  $C_s$  võib olla väljendatud g-des mulla orgaanilise süsiniku  $kg^{-1}$  kohta;
- samuti võib esitada järgmised näitajad: bioakumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg alusel ussi  $kg^{-1}$  kohta), mullast omastamise kiiruskonstant  $k_s$  (väljendatuna mulla g alusel usside  $kg^{-1}$  ja päeva $^{-1}$  kohta) ning kõrvaldamise kiiruskonstant  $k_e$  (väljendatuna päeva $^{-1}$  kohta); elustiku-mulla akumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg-des orgaanilise süsiniku  $kg^{-1}$  kohta ja ussi lipiidisisalduse alusel);

▼ **M4**

- kui neid mõõdetakse, siis lähtekemikaali protsendid, metaboliidid ja seotud jäägid (s.o uuritava kemikaali protsent, mida ei saa tavapäraste ekstraheerimismeetodite abil ekstraheerida), mis on tuvastatud mullas ja katseloomades;
- andmete statistiliste analüüside jaoks kasutatud meetodid.

*Tulemuste hindamine:*

- tulemuste vastavus kehtivuskriteeriumidele, mis on loetletud punktis 17;
- ootamatud või ebatavalised tulemused, näiteks uuritava kemikaali mitte-täielik kõrvaldamine katseloomadest.

*KIRJANDUS*

- 1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- 2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- 3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- 4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.
- 5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.
- 6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.
- 7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.
- 8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.
- 9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.
- 10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.
- 11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- 12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.
- 13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼ **M4**

- 14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91–100.
- 15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2–29.
- 16) Didden WAM (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.
- 17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- 18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140–145.
- 19) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93, komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ (ELT L 396, 30.12.2006, lk 1).
- 20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). *Biology and ecology of earthworms*. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- 21) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Allalaaditav aadressil <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- 23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- 24) 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.
- 25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.
- 26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897–1905.
- 27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501–1514.
- 28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼ **M4**

- 29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.
- 30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.
- 31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.
- 32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.
- 33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.
- 34) 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. & Eisen-traeager, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.
- 35) ISO 11268-2 (1998). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- 36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*” is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.
- 37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.
- 38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.
- 39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.
- 40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.
- 41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.
- 42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.
- 43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- 44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.
- 45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.
- 46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼ M4

- 47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log  $K_{ow}$ /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- 48) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 49) Käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse”.
- 50) Käesoleva lisa peatükk C.21 „Mullamikroobid: lämmastiku transformatsiooni katse”.
- 51) OECD (2004a). Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 52) OECD (2004b). Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 53) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287–388.
- 55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.
- 56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.
- 57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- 58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.-Toxicol. Chem.* 10: 1431–1436.
- 59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulations-tests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- 60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- 61) 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. 105–129.
- 62) Romijn CA,FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W, Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107–127.
- 63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efrogmson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110–2120.
- 64) 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. NF* 34: 413–433.
- 65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinaea* 57: 93–100.



▼ **M4**

- 66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- 67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- 68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309–320.
- 69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.
- 70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167–1171.
- 71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- 72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- 73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277–285.
- 74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- 75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023–1033.
- 76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409–417.
- 77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161–165.
- 78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843–1851.
- 79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402–406.

▼ **M4**

## 1. liide

## MÕISTED

**Bioakumulatsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas. Bioakumulatsioon on biokontsentratsiooni ja biomagnifikatsiooni (vt allpool) tulemus.

**Biokontsentratsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil ainult ümbritsevast kasvukeskkonnast kemikaali omastamise teel (näiteks keha pinna ja allaneelatud mulla kaudu), võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas.

**Biomagnifikatsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil peamiselt saastunud toidu või saagi kaudu omastamise teel, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga toidus või saagis. Biomagnifikatsioon võib viia uuritava aine ülekandumise või kogunemiseni toiduvõrgustikes.

Uuritava kemikaali **kõrvaldamine** – kemikaali kadumine katseorganismi kudedest aktiivsete või passiivsete protsesside tõttu, mis tekivad, sõltumata uuritava aine olemasolust või selle puudumisest ümbritsevas kasvukeskkonnas.

**Bioakumulatsioonitegur** (BAF) – uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil ( $C_a$ , g-des ussi kuivmassi kg kohta) kõnealuse bioakumulatsiooni katse omastamisfaasis igal ajamomendil jagatuna kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas ( $C_s$ , g-des mulla kuivmassi kg kohta); bioakumulatsiooniteguri ühikud on mulla kg ussi kg kohta.

**Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur** ( $BAF_{ss}$ ) – bioakumulatsioonitegur statsionaarse oleku puhul, see ei muutu oluliselt pika ajavahemiku jooksul; uuritava kemikaali kontsentratsioon ümbritsevas kasvukeskkonnas ( $C_s$ , g-des mulla kuivmassi kg kohta) jääb selle ajavahemiku vältel püsivaks.

**Bioakumulatsioonitegurid**, mis arvutatakse otse mullast omastamise kiiruskonstandist ja kõrvaldamise kiiruskonstandist ( $k_s$  ja  $k_e$ , vt allpool), on kineetilised bioakumulatsioonitegurid ( $BAF_K$ ).

**Elustiku-mulla akumulatsioonitegur** (BSAF) – lipiidide suhtes normeeritud uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil, jagatuna uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku suhtes normeeritud kontsentratsiooniga mullas statsionaarses olekus.  $C_a$  on sel juhul väljendatud g-des organismi lipiidide kg kohta ja  $C_s$  g-des mulla orgaanilise aine kg kohta; elustiku-mulla akumulatsiooniteguri ühikud on kg orgaanilist süsinikku lipiidi kg kohta.

**Platoo** või **statsionaarne olek** – määratletud kui tasakaaluolek omastamise ja kõrvaldamise protsesside vahel, mis toimuvad kokkupuutefaasis ühel ja samal ajal. Statsionaarne olek saavutatakse bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafikul, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud proovide bioakumulatsiooniteguri kolm järjestikust analüüsi jäävad üksteisest 20 % piiresse ning kolme proovivõtu ajavahemiku vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. Uuritavate kemikaalide puhul, mida omastatakse aeglasemalt, oleksid sobivamad seitsmepäevased ajavahemikud (49).

**Orgaanilise süsiniku-vee jaotuskoeffitsient** ( $K_{oc}$ ) – kemikaali kontsentratsiooni suhe mulla orgaanilise süsiniku fraktsioonis/fraktsioonil ja kemikaali kontsentratsioon vees tasakaaluoleku puhul.

**Oktanooli-vee jaotuskoeffitsient** ( $K_{ow}$ ) – kemikaali lahustuvuse suhe n-oktanoolis ja vees tasakaaluolekus, mida vahel tähistatakse ka  $P_{ow}$ -ga.  $K_{ow}$  logaritmi ( $\log K_{ow}$ ) kasutatakse kui kemikaali võimaliku veeorganismidesse kogunemise (bioakumulatsiooni) üht näitajat.

**▼ M4**

**Omastamis- või kokkupuutefaas** – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava kemikaaliga.

**Mullast omastamise kiiruskonstant** ( $k_s$ ) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis, mille on põhjustanud omastamine mullafaasist;  $k_s$  mõõdetakse mulla g-des usside kg ja päeva kohta.

**Kõrvaldamisfaas** – aeg, mis järgneb katseorganismide ülekandmisele uuritava ainega rikastatud kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda, mille vältel uuritakse kemikaali kõrvaldamist katseorganismidest (või netokadu).

**Kõrvaldamise kiiruskonstant** ( $k_e$ ) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis pärast katseorganismide ülekandmist uuritavat ainet sisaldavast kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda;  $k_e$  ühik on  $d^{-1}$ .

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

## 2. liide

**Omastamise ja kõrvaldamise parameetrite arvutamine**

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsiooniteguri on võimalik mõõtmistulemustest arvutada, kui stacionaarse oleku kontsentratsioon katseorganismis ( $C_a$ ) jagatakse kontsentratsiooniga mullas ( $C_s$ ). Kui omastamisfaasi ajal stacionaarse olekuni ei jõuta, siis arvutatakse kiiruskonstantidest stacionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel kineetiline bioakumulatsioonitegur. Siiski tuleks ära märkida, kas bioakumulatsioonitegur põhineb stacionaarse oleku kontsentratsioonidel või mitte.

Tavapärane meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri ( $BAF_K$ ), mullast omastamise kiiruskonstandi ( $k_s$ ) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi ( $k_e$ ) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid, näiteks väljaandes 68 kirjeldatud mudelite alusel. Järjestikuste kontsentratsiooni ajast sõltuvuse andmete komplekti ja mudeli võrrandite puhul

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 1}]$$

või

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_s t}) \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 2}],$$

kus

$C_a$  = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi  $\text{kg}^{-1}$ )

$k_s$  = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi  $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ )

$C_s$  = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi  $\text{kg}^{-1}$ )

$k_e$  = kõrvaldamise kiiruskonstant ( $\text{d}^{-1}$ )

$t_c$  = aeg omastamisfaasi lõpus,

saab nende arvutiprogrammidega arvutada  $BAF_K$ ,  $k_s$  ja  $k_e$  väärtused.

Kui kontrollkatse (kemikaaliga mitte kokkupuutuvate) usside taustkontsentratsioon, näiteks päeval 0, erineb märkimisväärselt nullist (see võib nii olla näiteks metallide puhul), tuleks kõnealune taustkontsentratsioon ( $C_{a,0}$ ) lisada võrranditesse, muutes neid järgmiselt:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 3}]$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_s t}) \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 4}]$$

Kui täheldatakse uuritava kemikaali kontsentratsiooni märkimisväärselt vähenevust mullas omastamisfaasi vältel, võib kasutada järgmisi mudeleid (67, 79):

$$C_s = C_0(e^{-k} 0^t) \quad [\text{võrrand 5}],$$

▼ M4

kus

$C_s$  = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi  $\text{kg}^{-1}$ )

$k_0$  = lagunemise kiiruskonstant mullas ( $\text{d}^{-1}$ )

$C_0$  = kemikaali esialgne kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi  $\text{kg}^{-1}$ )

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 7}],$$

kus

$C_a$  = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi  $\text{kg}^{-1}$ )

$k_s$  = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi  $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ )

$k_0$  = lagunemise kiiruskonstant mullas ( $\text{d}^{-1}$ )

$k_e$  = kõrvaldamise kiiruskonstant ( $\text{d}^{-1}$ )

$t_c$  = aeg omastamisfaasi lõpus.

Kui statsionaarse olekuni jõutakse omastamisfaasi vältel (s.o  $t = \infty$ ), siis võib võrrandi 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 1}]$$

taandada kujule:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

või

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{võrrand 8}]$$

Sel juhul on  $k_s/k_e \times C_s$  lähenemine uuritava aine kontsentratsioonile ussi kudedes statsionaarses olekus ( $C_{a,ss}$ ).

Elustiku-mulla akumulatsioonitegurit (BSAF) saab arvutada järgmiselt:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{võrrand 9}],$$

kus  $f_{oc}$  on mulla orgaanilise süsiniku fraktsioon ja  $f_{lip}$  on ussi lipiidifraktsioon, mis on mõlemad eelistatavalt määratud katse ajal võetud proovidest ja põhinevad vastavalt kas kuivmassil või märgmassil.

Kõrvaldamise kineetikat on võimalik modelleerida, kasutades kõrvaldamisfaasi andmeid ja kohaldades järgmist mudelvõrrandit ning arvutipõhist mittelineaarset parameetri hindamise meetodit. Kui aja järgi graafikule kantud andmepunktid näitavad pidevat eksponentsiaalset uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist loomades, siis võib ajast sõltuva kõrvaldamise kirjeldamiseks kasutada ühekambri-mudelit (võrrand 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{võrrand 10}]$$

▼ **M4**

Kõrvaldamisprotsessid näivad vahel olevat kahefaasilised, näidates  $C_a$  kiiret vähenemist kõrvaldamisfaasi alguses, mis hiljem muutub uuritava aine aeglasemaks kaoks kõrvaldamise hilisemates järkudes, vt näiteks 27, 68. Kahte faasi on võimalik tõlgendada eeldusega, et organismis on kaks eraldi kambrit, millest uuritav aine kaob erineva kiirusega. Neil juhtudel tuleks vaadata asjakohaseid väljaandeid, näiteks 38, 39, 40, 78.

Eespool esitatud mudelvõrrandite abil võib kineetilised parameetrid ( $k_s$  ja  $k_e$ ) arvutada ka korraga, kohaldades esimese järgu kineetika mudelit korraga kõigile omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi andmetele. Omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arvutamise meetodi kirjeldus on esitatud väljaannetes 40, 72 ja 69.

$$C_a = \left[ \frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[ \frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{võrrand 11}]$$

*Märkus.* Kui omastamise ja kõrvaldamise parameetreid hinnatakse korraga omastamise ja kõrvaldamise ühendatud andmetest, võimaldab võrrandis 11 kasutatud näitaja  $m$  arvutiprogrammil seostada võrrandi alamliikmeid vastava faasi andmekomplektidega ja võrrandit õigesti rakendada ( $m = 1$  omastamisfaasi korral;  $m = 2$  kõrvaldamisfaasi korral).

Sellest hoolimata tuleks mudelvõrrandeid kasutades olla ettevaatlik, eelkõige kui katse ajal võib muutuda uuritava kemikaali biosaadavus või esineb kemikaali (bio)lagunemine (vt näiteks 79).

▼ **M4**

## 3. liide

## MULLA BIOAKUMULATSIOONI KATSETE AJAVAKAVADE NÄITED

## Katse vihmaussidega

- a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
-6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
-4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
-3 kuni -1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumine mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuharustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Õhuharustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuharustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5-6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8-9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11-13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15-16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.
18-20	Sama kui päeval 3.

▼ **M4**

Päev	Tegevus
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollrühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata uuritava kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

## b) Kõrvaldamisfaas

Päev	Tegevus
-6	Mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine; ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
-4	Mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; inkubeerimine katsetingimustes neli päeva.
0 (omastamisfaasi lõpp)	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; söödaratsiooni lisamine; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest puhast mulda sisaldavatesse nõudesse; mulla- ja usside proovide võtmine 4–6 tunni pärast uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8–9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15–16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.



▼ **M4**

Päev	Tegevus
18–20	Sama kui päeval 3.
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollrühmadest.
	Mulla ettevalmistamine enne kõrvaldamisfaasi tuleks teha samal viisil kui enne omastamisfaasi.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

**Katse valgeliimuklastega**

- a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
–6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
–4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
–3 kuni –1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine mulda; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumine mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuvarustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katseüsteemi.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
9	Sama kui päeval 1.
10	Sama kui päeval 3.

▼ **M4**

Päev	Tegevus
11	Sama kui päeval 1.
12–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kemikaaliga kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼ **M4**

## 4. liide

**Tehismuld – soovitused valmistamise ja säilitamise kohta**

Kuna konkreetsest allikast looduslik muld ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ja katset võivad mõjutada seal elavad organismid ning samuti mikroasaasteained, on soovitatav kasutada katses tehiskikku substraati, tehismulda, vastavalt käesoleva lisa peatükile C.8 „Toksilisus vihmaussidele”(48). Selles mullas saavad ellu jääda, kasvada ja paljuneda mitmed katseliigid ning tagatakse katse- ja kultuuritingimuste maksimaalne standardiseeritus ning samuti laborisisene ja laboritevaheline võrreldavus.

Mulla koostisosad

Turvas:	10 %	Turbasammal kooskõlas OECD suunisega 207 (48).
Kvartslüiv:	70 %	Tööstuslik kvartslüiv (õhu käes kuivatatud); tera suurus: rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm, kuid kõik osakesed peaksid olema ≤ 2 mm.
Kaoliinravi:	20 %	Kaoliinisisaldus ≥ 30 %.
Kaltsiumkarbonaat:	≤ 1 %	CaCO <sub>3</sub> , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas.

Soovi korral võib tehismulla orgaanilise süsiniku sisaldust vähendada, vähendades näiteks turbasisaldust 4–5 %-le kuivast mullast ja suurendades vastavalt liivasisaldust. Sellise orgaanilise süsiniku sisalduse vähendamise teel võib uuritava kemikaali mullal adsorbeerumise (orgaaniline süsinik) võimalus väheneda ja uuritava kemikaali saadavus ussidele võib suureneada (74). On tõendatud, et *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* suudavad täita paljunemist käsitleva kehtivuskriteeriumi, kui neid katsetatakse põllumullas, millel on väiksem orgaanilise süsiniku sisaldus, näiteks 2,7 % (33, 61), ja seniste kogemuste põhjal on seda võimalik saavutada 5 % turbasisaldusega tehismullas.

**Valmistamine**

Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (näiteks suuremahulises laborisegistis). Seda tuleks teha enne katse alustamist ligikaudu nädala jooksul. Segatud kuiva mulla koostisosi tuleks niisutada deioniseeritud veega vähemalt 48 tundi enne uuritava aine lisamist, et tasakaalustada/stabiliseerida happesust. pH määramiseks kasutatakse mulla ja 1 M KCl lahust suhtega 1 : 5. Kui pH ei ole nõutud vahemikus (6,0 ± 0,5), lisatakse mullale piisavas koguses CaCO<sub>3</sub> või valmistatakse ette uus mullapartii.

Tehismulla maksimaalne veemahutavus määratakse kooskõlas standardiga ISO 11268-2 (35). Kuiva tehismulda niisutatakse vähemalt kaks päeva enne katse alustamist, lisades piisavalt deioniseeritud või taastatud vett, et saada ligikaudu pool lõplikust veesisaldusest. Lõplik veesisaldus peaks olema 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Katse alguses jagatakse eelnevalt niisutatud muld nii mitmeks partiiks, kui on katse vältel kasutatud katsekontsentratsioone ja kontrollrühmi, ning niiskusesisaldus reguleeritakse 40–60 %-le maksimaalsest veemahutavusest, kasutades uuritava aine lahust ja/või lisades deioniseeritud või taastatud vett. Niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus (105 °C juures). See peaks olema optimaalne liikide vajaduste jaoks (niiskusesisaldust võib samuti kontrollida järgmiselt: kui mulda käes kergelt vajutatakse, siis peaksid sõrmede vahele tekkima väikesed veepiisad).

**▼ M4****Säilitamine**

Tehismulla kuivi koostisosi võib toatemperatuuril säilitada kuni kasutamiseni. Valmistatud eelnevalt niisutatud mulda võib säilitada jahedas kohas kuni kolm päeva enne rikastamist; tuleks olla hoolikas, et vältida vee aurumist. Uuritava ainega rikastatud mulda tuleks kasutada viivitamata, v.a juhul, kui on andmeid selle kohta, et konkreetset mulda saab säilitada ilma uuritava aine mürgisust ja biosaadavust mõjutamata. Rikastatud mulla proove võidakse seejärel säilitada kuni analüüsini konkreetse uuritava aine jaoks soovitatavates tingimustes.

▼ **M4**

## 5. liide

**Mulla väheharjasusside liigid, keda soovitatakse kasutada mullast toimuva bioakumulatsiooni katsete tegemiseks****Vihmaussid**

Soovitatav katseliik on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), kes kuulub *Lumbricidae* sugukonda. Alates 1972. aastast on see jaotatud kahte alamliiki (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10)). Jaenike (36) kohaselt on need täiesti eraldi liigid. *Eisenia fetida* on kergesti äratuntav oma heledate segmentidevaheliste kollaste triipude poolest, aga *Eisenia andrei* värvus on ühtlaselt tumepunane. Need liigid on tõenäoliselt pärit Musta mere piirkonnast ja neid esineb praegu kõikjal maailmas eelkõige inimeste tekitatud elupaikades, nagu kompostihunnikud. Mõlemat liiki saab kasutada ökotoksikoloogilisteks ja bioakumulatsiooni katseteks.

*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* on kaubanduslikult saadaval näiteks kalasöödana. Võrreldes muude *Lumbricidae* sugukonda kuuluvate vihmaussidega on neil lühike elutsükkel ja nad saavad (toatemperatuuril) täiskasvanuks ligikaudu kahe kuni kolme kuu vanusena. Nende optimaalne temperatuur on ligikaudu 20–24 °C. Nad eelistavad suhteliselt niiskeid substraate, mille pH on peaaegu neutraalne ja orgaanilise materjali sisaldus on suur. Kuna neid liike on standarditud ökotoksikoloogilistes katsetes ligikaudu 25 aasta vältel laialdaselt kasutatud, on nende kultuuris kasvatamine hästi dokumenteeritud (48, 77).

Mõlemat liiki saab kasvatada mitmesugustes loomsetes jäätmetes. ISO (35) alusel soovitatud kasvatamise keskkond on hobuse- või veisesõnniku ja turba segu 50 : 50. Kasvukeskkonna pH peaks olema ligikaudu 6–7 (reguleeritakse kaltsiumkarbonaadiga), kasvukeskkonnal peaks olema vähene ioonjuhtivus (vähem kui 6 mS/cm või vähem kui 0,5 % soola kontsentratsioon) ja see ei tohiks olla ammoniaagi või loomauriiniga liigselt saastunud. Samuti võib kasutada müügil olevat aiambulda, mis ei sisalda lisandeid, või tehismulda OECD (48) kohaselt või nende mõlema segu 50 : 50. Substraat peaks olema niiske, kuid mitte liiga märg. Sobivad on 10- kuni 50-liitrised kasvatuskastid.

Standardse vanuse ja massiga usside saamiseks on parim alustada kultuuri kookonitega. Seepärast lisatakse värsket substraati sisaldavasse kasvatuskasti täiskasvanud ussid kookonite saamiseks. Praktilised kogemused on näidanud, et populatsiooni tihedus ligikaudu 100 täiskasvanud ussi substraadi (märgmassi) kg kohta annab head paljunemismäärad. Pärast 28 päeva möödumist täiskasvanud ussid eemaldatakse. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse katsetamiseks vähemalt 2 kuu ja mitte kauem kui 12 kuu möödumisel täiskasvanuks saamisest.

Eespool kirjeldatud liiki usse saab pidada terveks, kui nad liiguvad kogu substraadis, ei proovi substraadist lahkuda ja paljunevad pidevalt. Väga aeglane liikumine või kollane tagaosa (*Eisenia fetida* puhul) viitab substraadi kurnatusele. Sel juhul soovitatakse kasutada värsket substraati ja/või väiksemat arvu loomi kasti kohta.

**Täiendavad valitud viited**

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtschaft. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼ **M4**

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

**Valgeliimuklased**

Soovitav katseliik on *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (valgeliimukas). *Enchytraeus albidus* on üks suurimaid (kuni 15 mm) rõngusside hõimkonna väheharjasusside klassi *Enchytraeidae* sugukonna liike ja seda leidub kogu maailmas, vt näiteks 8. *Enchytraeus albidus*'t leidub merelistes, siseveekogude ja mullastiku elupaikades peamiselt lagunevas orgaanilises aines (vetikad, kompost) ja harvadel juhtudel niitudel (42). Kõnealune lai ökoloogiline taluvus ja mõni morfoloogiline erinevus näitab, et kõnealusel liigil võib olla erinevaid liigiseseid rühmi.

*Enchytraeus albidus* on kaubanduslikult saadaval, seda müüakse kalasöödana. Tuleks kontrollida, kas kultuur on saastunud muude, enamasti väiksemate liikidega (60). Kui saastumine on toimunud, siis tuleks kõiki usse pesta veega Petri tassis. Seejärel valitakse (stereomikroskoobi abil) uue kultuuri alustamiseks *Enchytraeus albiduse* suured isendid. Kõik muud ussid visatakse ära. Liigi elutsükkel on lühike ja täiskasvanuks saadakse 33 päevaga (18 °C juures) kuni 74 päevaga (12 °C juures). Katses tuleks kasutada ainult kultuure, mida on ilma probleemideta laboris hoitud vähemalt viis nädalat (üks põlvkond).

Muud *Enchytraeus*'e perekonna liigid on samuti sobivad, eelkõige *Enchytraeus luxuriosus*. See liik elab tegelikult mullas ja seda on hiljuti kirjeldatud väljaandes (65). Kui kasutatakse muud *Enchytraeus*'e perekonna liiki, tuleks see selgelt tuvastada ja liigi valimist tuleks põhjendada.

*Enchytraeus crypticus* (Westheide ja Graefe 1992) on liik, mis kuulub samasse rühma kui *Enchytraeus luxuriosus*. Selle leidumist looduses ei ole veel kindlalt tuvastatud, seda on ainult kirjeldatud vihmausside kultuurides ja kompostihunnikutes (Römbke 2003). Selle algsed ökoloogilised nõuded ei ole seega teada. Hiljutised laboriuuringud erinevate alade muldadega on kinnitanud, et sellel liigil on laialdane taluvus mulla omaduste (nagu pH ja tekstuur) suhtes (Jänsch *et al.* 2005). Viimastel aastatel on seda liiki sageli kasutatud ökotoksikoloogilistes uuringutes, kuna seda on lihtne kasvatada ja katsetada, näiteks Kuperman *et al.* 2003. Isendid on siiski väikesed (3–12 mm; keskmiselt 7 mm) (Westheide & Müller 1996), mis muudab käsitlemise *Enchytraeus albidus*'ega võrreldes keerukamaks. Selle liigi kasutamisel *Enchytraeus albidus*'e asemel võib katsenõu olla väiksem, aga ei pruugi seda olla. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta, et see liik paljuneb väga kiiresti. Selle põlvkond saab 20 ± 2 °C juures küpseks vähem kui 20 päevaga (Achazi *et al.* 1999) ja kõrgemal temperatuuril isegi kiiremini.

*Enchytraeidae* sugukonda kuuluvad *Enchytraeus albidus*'e liigi isendeid (ning samuti muude *Enchytraeus*'e perekonna liikide isendeid) on võimalik kasvatada suurtes plastkastides (näiteks 30 × 60 × 10 cm või 20 × 12 × 8 cm, mis on sobivad väikeste usside kasvukultuuri jaoks), mis on täidetud tehismulla ja müügil oleva ilma lisanditeta saastumata aiamalla seguga. Kompostmaterjali tuleks vältida, kuna see võib sisaldada mürgiseid kemikaale, nagu raskmetalle. Fauna tuleks kasvumullast enne kasutamist kolmekordse sügavkülmutamise teel eemaldada. Võib kasutada ka puhast tehismulda, aga paljunemiskiirus selles võib segatud substraatidega võrreldes olla väiksem. Substraadi pH peaks olema 6,0 ± 0,5. Kultuuri hoitakse ilma valguseta inkubaatoris temperatuuril 15 ± 2 °C. Igal juhul tuleks vältida kõrgema temperatuuri kui 23 °C kasutamist. Tehismuld / looduslik muld peaks olema niiske, aga mitte märg. Kui mulda käega õrnalt vajutatakse, peaksid ilmuma ainult väikesed veepiisad. Igal juhul tuleks vältida hapnikuvaegust (näiteks kaane kasutamisel peaks kaane aukude arv olema piisavalt suur, et tagada piisav õhuvahetus). Kasvumulda tuleks kord nädalas hoolika segamisega aereerida.

▼ **M4**

Usse tuleks vähemalt korra nädalas valitud ajal sööta valtsitud kaeraga, mis asetatakse mulda tehtud auku ja kaetakse mullaga. Kui mahutisse jääb eelmisest söötmise kuupäevast sööta, tuleks antava sööda kogust sellele vastavalt kohandada. Kui allesolevale söödale kasvavad seened, tuleks see asendada valtsitud kaera uue kogusega. Paljunemise stimuleerimiseks võib valtsitud kaera täiendada iga kahe nädala tagant müügil oleva vitamiinidega täiendatud valgupulbriga. Kolme kuu möödumisel kantakse loomad üle värskest valmistatud kultuuri või kasvusubstraati. Valtsitud kaer, mida tuleb säilitada suletud nõudes, tuleks enne kasutamist aidalestade (näiteks *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) või röövlestadega (näiteks *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) saastumise vältimiseks autoklaavida või läbi kuumutada. Pärast desinfitseerimist jahvatatakse sööt nii, et seda oleks lihtne mulla pinnale puistata. Muud võimalikud söödaallikad on pagaripärm või kalasööt TetraMin®.

Üldjoontes on kasvukultuuri tingimused piisavalt head, kui ussid ei proovi substraadist lahkuda, liiguvad mullas kiiresti, nende välispind on läikiv ilma selle külge jäänud mullaosakesteta, ussid on üldjoontes valkja värvusega ja kui näha on erinevas vanuses usse. Tegelikult saab usse pidada terveks, kui nad pidevalt paljunevad.

**Täiendavad valitud viited**

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼ **M6****C.31. KATSE MAISMAATAIMEDEGA: TÄRKAMINE JA SEEMIKU KASV****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 208 (2006). Katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut ja kaaluda nende kasutatavust regulatiivsete vajaduste rahuldamiseks. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi abil hinnatakse kemikaalide võimalikku mõju seemikute tärkamisele ja kasvule. Meetod ei hõlma kroonilist mõju ega mõju paljunemisvõimele (st seemnete valmimisele, õitsemisele, viljade küpsemisele). Et tagada sobiva katsemeetodi kasutamine, tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali omadusi ja kokkupuutetingimusi (näiteks tuleks metallide/metalliühendite puhul arvesse võtta nendega seotud vastasioonide ja pH mõju) (1). Käesolev katsemeetod ei hõlma taimede kokkupuudet kemikaaliaurudega. Meetod on kasutatav üldotstarbeliste kemikaalide, biotsiidide ja taimekaitsevahendite (pestitsiidide) mõju hindamiseks. See on välja töötatud olemasolevate meetodite põhjal (2, 3, 4, 5, 6, 7). Samuti võeti arvesse taimedega tehtavaid katseid käsitlevaid muid allikaid (8, 9, 10). Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

**KATSE PÕHIMÕTE**

2. Katsega hinnatakse kõrgemate taimede seemikute tärkamisele ja varajasele kasvule avalduvat mõju kokkupuutel mullas (või muus sobiva koostisega pinnases) esineva uuritava kemikaaliga. Seemned viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga töödeldud pinnasega ja neile avalduvat mõju hinnatakse tavaliselt 14–21 päeva jooksul pärast 50 % seemikute tärkamist kontrollrühmas. Katses mõõdetavad näitajad on silmaga hinnatav tärkamine, võrsete kuivmass (või märgmass) ja teatud juhtudel võrsete kõrgus, samuti silmaga hinnatav kahjulik mõju taime eri osadele. Neid mõõtmistulemusi ja vaatlusi võrreldakse kemikaaliga mitte kokku puutunud kontrolltaimede vastavate näitajatega.
3. Olenevalt eeldatavast kokkupuuteviisist viiakse uuritav kemikaal mulda (või kunstlikku pinnasesse) või töödeldakse sellega mullapinda, vastavalt sellele, kumb kemikaaliga kokkupuutumise viis peegeldab võimalikku tegelikku olukorda. Mulda viimise korral töödeldakse kogu mulda korraga. Pärast töötlemist jaotatakse muld pottidesse ja seejärel pannakse asjaomase taimeleegi seemned mulda. Kui kemikaaliga töödeldakse mullapinda, tehakse seda pottides oleva mullaga pärast seemnete muldapanekut. Seejärel tagatakse katseüksustele (kontrollid ja töödeldud muld koos seemnetega) sobivad tingimused seemnete idanemise ja taimede kasvu võimaldamiseks.
4. Katse eesmärgist sõltuvalt võib selle läbi viia koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera saamiseks või piirsalduskatsena, milles kasutatakse ühte kindlat kontsentratsiooni või koguselist määra. Kui ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse tulemustest nähtub, et mürgisus ületab teatud taseme (nt täheldatakse suuremat mõju kui x %), tehakse mürgisuse ülem- ja alampiiri määramiseks kogusevahemiku leidmise katse ja seejärel mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera koostamiseks. Sobiva statistilise analüüsimetodiga leitakse kõige tundlikuma(te) vaadeldava(te) näitaja(te) alusel efektiivne kontsentratsioon  $EC_x$  või efektiivne kogus  $ER_x$  (nt  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ). Kõnealuse katsega saab kindlaks teha ka täheldatavat toimet mitteavaldatava kontsentratsiooni (NOEC) ja vähima täheldatavat toimet avaldatava kontsentratsiooni (LOEC).

**TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

5. Kemikaaliga kokkupuutumise eeldatava viisi kindlakstegemisel ja katseplaani koostamisel on kasu järgmisest teabest: struktuurivalem, puhtus, lahustuvus



**▼M6**

vees, lahustuvus orgaanilistes lahustites, jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktaanool/vesi, aaurõhk, sorbeeruvus pinnases, keemiline püsivus vees ja valguse käes ning biolagunduvus.

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

6. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:
- seemikute tärkamine on vähemalt 70 %;
  - seemikutel ei täheldata nähtavaid fütotoksilisuse ilminguid (nt kloroos, nekroos, närbumine, varre või lehtede moonumine) ning varieeruvus taimede kasvus ja morfoloogias jääb konkreetsele liigile iseloomulikku vahemikku;
  - tärgranud seemikute keskmine ellujäämise määr katse vältel on kontrollrühmas vähemalt 90 %;
  - keskkonnatingimused on konkreetse liigi puhul ühesugused ning kasvu-keskkond sisaldab ühesuguses koguses ja samast allikast pärit mulda, kasvu toetavaid koostisosi või substraati.

**VÕRDLUSKEMIKAAL**

7. Võrdluskemikaali abil võib korrapäraselt kontrollida, kas katsetulemused, konkreetsete katsetaimede reaktsioon ja katsetingimused on aja jooksul üldjoontes samaks jäänud. Teise võimalusena võib kasutada varasemaid kontrolltaimede biomassi- või kasvuandmeid, mis võimaldavad teha laboritevahelist kvaliteedikontrolli ja hinnata katseüsteemi usaldusväärsust konkreetsetes laboris.

**MEETODI KIRJELDUS****Looduslik muld ja kunstlik substraat**

8. Taimi võib kasvatada pottides, kasutades liivsavimulda või kerget või keskmist saviliivmulda, mis sisaldab kuni 1,5 % orgaanilist süsinikku (umbes 3 % orgaanilist ainet). Võib kasutada ka müügilolevat potimulda või sünteetilist mullasegu, mis sisaldab kuni 1,5 % orgaanilist süsinikku. Savimuldade ei tohiks kasutada, kui on teada, et uuritava kemikaali afiinsus savi suhtes on suur. Põllumuld tuleks homogeensuse tagamiseks ja suurte osakeste kõrvaldamiseks sellisel läbi sõeluda, et osakeste suurus ei oleks üle 2 mm. Tuleks esitada kasutusvalmis mulla tüüp ja lõimis, orgaanilise süsiniku protsentuaalne sisaldus, pH ja soolasisaldust kajastav elektrijuhtivus. Muld tuleks klassifitseerida vastavalt standardsele klassifitseerimissüsteemile (11). Mulla patogeeni mõju vähendamiseks võib mulla pastöriseerida või seda kuumtöödelda.
9. Loodusliku mulla puhul võib selle füüsikalise-keemiliste omaduste ja mikroobipopulatsioonide varieeruvuse tõttu olla tulemuste varieeruvus suurem ja nende tõlgendamine raskem. Need muutujad mõjutavad omakorda mulla niiskussuhtavust, kemikaalide sidumise võimet, aereeritust ning toitainete ja mikroelementide sisaldust. Lisaks nimetatud füüsikalistele teguritele varieeruvad ka mulla keemilised omadused, näiteks pH ja redokspotentsiaal, mis võivad mõjutada uuritava kemikaali biokättesaadavust (12, 13, 14).
10. Taimekaitsevahendite mõju hindamisel ei kasutata tavaliselt kunstlikke substraate, kuid neist võib olla kasu üldotstarbeliste kemikaalide mõju hindamisel või juhul, kui soovetakse minimeerida loodusliku mulla varieeruvust ja parandada katsetulemuste võrreldavust. Kasutatavad substraadid peaksid koosnema inertsest materjalist, mille puhul vastasmõju uuritava kemikaali, kasutatava lahusti või mõlemaga on minimaalne. On leitud, et sobivad inertsed materjalid, mis absorbeerivad uuritavat kemikaali minimaalselt ja

**▼ M6**

mille puhul on tagatud kemikaali maksimaalne kättesaadavus seemikule juurte kaudu, on happega pestud kvartslüüv, mineraalvill ja klaashelmed (nt läbimõõduga 0,35–0,85 mm). Sobimatud substraadid on näiteks vermikuliit, perliit ja muud tugevalt absorbeerivad materjalid. Tuleks tagada taimekasvu soodustavate toitainete olemasolu, et taimedel ei tekiks toitainevaegusest tingitud stressi, ning võimaluse korral tuleks selle hindamiseks teha kontroll-taimedele keemiline analüüs või neid visuaalselt hinnata.

**Katseliigi valimise kriteeriumid**

11. Valitavad liigid peaksid esindama piisavalt laia spektrit, näiteks lähtuvalt nende taksonoomilisest kuuluvusest taimeriigis, nende levikust, arvukusest, elutsükliga seotud liigispetsiifilistest omadustest ja looduslikust levialast, et oleks võimalik vaadelda rida eri reaktsiooni uuritavale kemikaalile (8, 10, 16, 17, 18, 19, 20). Võimaliku katseliigi valimisel tuleks arvesse võtta järgmisi kriteeriume:

- asjaomase liigi seemned on ühetaolised ja usaldusväärsest standardsest seemnepangast hõlpsalt kättesaadavad ning nende puhul on tagatud järjepidev, kindel ja ühtlane seemnete idanemine ja seemikute ühetaoline kasv;
- asjaomased taimed sobivad laborikatsetes kasutamiseks ning nendega saadavad tulemused on usaldusväärsed ja nii ühes uurimislaboris kui ka eri laborites reprodutseeritavad;
- katseliigi tundlikkus peaks vastama keskkonnas kemikaaliga kokku puutuvate taimede puhul täheldatavale tundlikkusele;
- asjaomaseid taimi on teataval määral kasutatud varasemates mürgisuse hindamise katsetes ja nende kasutamisel näiteks herbitsiididega tehtavates biokatsetes, raskmetallide mõju või soolusest või mineraalainetest tingitud stressi hindamise katsetes või allelopaatiauuringutes on täheldatud tundlikkust paljude stressiallikate suhtes;
- käesoleva katsemeetodi puhul kasutatavad kasvutingimused on asjaomastele taimedele sobivad;
- asjaomased taimed vastavad katse nõuetekohasuse kriteeriumidele.

Mõned varem kõige sagedamini kasutatud katseliigid on loetletud 2. liites ja võimalikud põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluvad liigid 3. liites.

12. Katses kasutatavate liikide arv sõltub asjakohastest õiguslikest nõuetest ja seepärast seda käesolevas katsemeetodis ei määratleta.

**Uuritava kemikaaliga töötlemine**

13. Kemikaaliga töötlemiseks tuleks kasutada sobivat kandeainet (nt vesi, atsetoon, etanool, polüetüleenglükool, kummiaraabik, liiv). Katses võib kasutada ka segusid (kindlaksmääratud koostisega tooted või valmistised), mis sisaldavad toimeaineid ja eri abiaineid.

*Kemikaali viimine mulda või kunstlikku substraati*

14. Vees lahustuvad või vees suspensiooni moodustavad kemikaalid võib lisada veele ja seejärel segada saadud lahuse sobiva segamisseadme abil mullaga. Sellist tüüpi katse võib olla sobiv juhul, kui kokkupuude kemikaaliga toimub mulla või mullapoorides oleva vee kaudu ja soovitakse hinnata kemikaali omastamist juurte kaudu. Uuritava kemikaali lisamisel ei tohiks vedeliku kogus ületada mulla veemahutavust. Lisatav veekogus peaks olema iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul sama ning piiratud, et hoida ära mullaosakeste kokkukleepumist.

▼ **M6**

15. Veēs raskesti lahustuivad kemikaalid tuleks lahustada sobivas lenduvas lahustis (nt atsetoon või etanool) ja segada liivaga. Seejärel saab lahusti liivast õhujoa abil kõrvaldada, segades liiva samal ajal pidevalt. Töödeldud liiv segatakse katses kasutatava mullaga. Täiendava kontrollina kasutatakse mulda, millele lisatakse üksnes lahustiga töödeldud liiva. Täiendava kontrolli ja iga kasutatava kontsentratsiooni puhul lisatakse ühesugune kogus liiva, mis on lahustiga segatud ja millest lahusti on kõrvaldatud. Kui uuritav tahke kemikaal on lahustumatu, segatakse see sobiva segamisseadme abil kuiva mullaga. Seejärel viiakse muld pottidesse ja sellesse külvatakse viivitamata seemned.
16. Kui mulla asemel kasutatakse kunstlikku substraati, võib veēs lahustuva kemikaali lahustada vahetult enne katse algust toitainelahuses. Kui kemikaal on veēs lahustumatu, kuid seda on võimalik lahusti abil veēs suspendeerida, tuleks see lisada toitainelahusesse koos lahustiga. Veēs lahustumatu kemikaal, mille jaoks ei ole mittemürgist veēs lahustuvat lahustit, tuleks lahustada sobivas lenduvas lahustis. Lahus segatakse liiva või klaashelmeestega, segu pannakse vaakumpöördaurustisse, lahustil lastakse aurustuda ning selle tulemusena saadakse ühtlaselt kemikaaliga kaetud liiv või helmed. Enne pottide täitmist tuleks kemikaal teatava koguse kaalutud helmeste pinnalt sama orgaanilise lahustiga ekstraheerida ja seda analüüsida.

*Mullapinna töötlemine*

17. Taimekaitsevahendite puhul kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks sageli katselahuse pihustamist mullapinnale. Kõnealuste katsete tegemiseks kasutatavad seadmed, sealhulgas uuritava kemikaali lahuse valmistamiseks ja mullapinnale kandmiseks kasutatavad seadmed, peaksid olema sellise ehituse ja töökindlusega, et nende abil saaks teha täpseid katseid, mille puhul oleks tagatud katvuse reprodutseeritavus. Katvus peaks olema kõikjal mullapinnal ühtlane. Tuleks hoolikalt jälgida, et kemikaal ei adsorbeeruks seadmetele (nt plasttorud, lipofiilsed kemikaalid või terasosad ja -detailid) ega reageeriks nendega. Uuritavat kemikaali pihustatakse mullapinnale viisil, millega jäljendatakse tüüpilist töötlemist pihustusseadme abil. Üldjuhul peaks pihustatavad kogused jääma põllumajanduses tavapäraselt kasutatavasse vahemikku ning asjaomased kogused (vee hulk jne) tuleks märkida katseprotokolli. Tuleks valida sellist tüüpi otsik, mille puhul mullapind saaks ühtlaselt kaetud. Lahusti või kandevaine kasutamise korral tuleks moodustada täiendav rühm kontrolltaimi, mille puhul lisatakse üksnes lahustit/kandevainet. Kindlaksmääratud koostisega taimekaitsevahendite puhul ei ole see vajalik.

*Uuritava kemikaali sisalduse või koguselise määra kontrollimine*

18. Kasutatavaid kontsentratsioone või koguselisi määru tuleb asjakohase analüüsi teel kontrollida. Lahustuva kemikaali puhul võib kõikide katses kasutatavate kontsentratsioonide või koguseliste määrade kontrollimiseks analüüsida suurima kontsentratsiooniga katselahust ja dokumenteerida järgnevad lahjendused ning kasutada kemikaaliga töötlemiseks kalibreeritud seadmeid (nt klaasist kalibreeritud analüüsinõud, kalibreeritud pihustusseadmed). Lahustumatu kemikaali puhul tuleb selle sisalduse tõendamiseks registreerida mullale lisatavad uuritava kemikaali kaalutud kogused. Kui on vaja tõendada homogeensust, võib olla vaja mulda analüüsida.

**KATSE KÄIK****Katseplaan**

19. Sama taimeliigi seemned külvatakse pottidesse. Seemnete arv poti kohta sõltub liigist, poti suurusel ja katse kestusel. Taimede arv potis peaks olema selline, et katse vältel oleksid tagatud sobivad kasvutingimused ja taimi ei oleks liiga palju. Maksimaalne tihedus peaks olenevalt seemnete

▼ **M6**

suurusest olema 3–10 seemet 100 cm<sup>2</sup> kohta. Näiteks on taimede soovitatav tihedus 15-sentimeetrise läbimõõduga potis maisi, soja, tomati, kurgi ja suhkrupeedi puhul 1–2 taime, rapsi ja herne puhul 3 taime ning sibula, nisu ja muude väikese seemnega taimede puhul 5–10 taime. Seemnete ja paralleelpottide arv (paralleelüksusena käsitatakse potti, seepärast ei ole samas potis kasvavad taimed vaadeldavad paralleelidena) peaks olema optimaalse statistilise analüüsi jaoks piisav (21). Tuleks tähele panna, et katseliikidel, mille puhul kasutatakse väiksemat arvu suuri seemneid poti (paralleelüksuse) kohta, on varieeruvus suurem kui katseliikidel, mille puhul on võimalik kasutada suuremat arvu väikseid seemneid poti kohta. Sellist varieeruvust saab minimeerida igasse potti võrdse arvu seemnete külvamisega.

20. Et veenduda, et täheldatav mõju tuleneb üksnes kokkupuutest uuritava kemikaaliga või on üksnes sellega seotud, kasutatakse kontrollrühmi. Sobiv kontrollrühm peaks olema katserühmaga identne kõiges muus peale uuritava kemikaaliga kokkupuute. Kõik samas katses kasutatavad katsetaimed, sealhulgas kontrolltaimed, peaksid pärinema samast allikast. Ebavõrdse jaotuse ärahoidmiseks tuleb katse- ja kontrollpotid määrata juhuslikult.
21. Tuleks hoiduda insektitsiidi või fungitsiidiga kaetud seemnete (st puhitud seemnete) kasutamisest. Mõni reguleeriv asutus lubab siiski kasutada teatud mitesüsteemseid kontaktfungitsiide (nt kaptaan, tiraam) (22). Kui muret teevad seemnetega levivad patogeenid, võib seemneid hoida lühikest aega lahjas, viieprotsendilises hüpokloriti lahuses ning seejärel neid voolava veega korralikult loputada ja need kuivatada. Töötlemine mõne muu taimekaitsevahendiga ei ole lubatud.

*Katsetingimused*

22. Katsetingimused peaksid üldjoontes vastama tingimustele, mis on vajalikud katses kasutatavatesse liikidesse ja sortidesse kuuluvate taimede tavapäraseks kasvuks (katsetingimuste näited on esitatud 4. liites). Tärkavaid taimi tuleks kasvatada kontrollitava keskkonnaga kambris, fütotronis või kasvuhooones kooskõlas hea aiandustavaga. Taimekasvatuseks ette nähtud ruumi kasutamisel hõlmab see tava harilikult temperatuuri, õhuniiskuse, süsihappegaasi sisalduse, valguse (valgustustiheduse, lainepikkuse, fotosünteesiks sobiva kiirguse), valgustusperioodi, kastmisviisi jmt reguleerimist ja piisavalt sagedast (nt igapäevast) registreerimist, et tagada hea taimekasv, mida hinnatakse asjaomase liigi kontrolltaimede kasvu alusel. Kasvuhooones tuleks temperatuuri reguleerida ventilatsiooni-, kütte- ja/või jahutussüsteemi abil. Kasvuhooones tehtava katse puhul soovatakse üldjuhul kasutada järgmisi tingimusi:

— temperatuur: 22 ± 10 °C;

— õhuniiskus: 70 ± 25 %;

— valgustusperiood: vähemalt 16 tundi;

— valgustustihedus: 350 ± 50 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Kui valgustustihedus lainepikkuste vahemikus 400–700 nm langeb alla 200 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, võib olla vaja kasutada lisavalgustust, välja arvatud teatud liikide puhul, mille valgusevajadus on väiksem.

Keskkonningimusi tuleks katse vältel jälgida ja need registreerida. Taimi tuleks kasvatada mittepoorsetes plast- või glasuuritud pottides, mille alla on paigutatud kandik või alustass. Potte võib korrapäraselt ümber paigutada, et

▼ **M6**

minimeerida kasvukeskkonna tingimuste erinevustest tulenevat varieeruvust taimede kasvus. Potid peavad olema tavapärase kasvu võimaldamiseks piisava suurusega.

23. Taimede elujõulisuse tagamiseks võib mullale lisada toitaineid. Lisatoitainetega varustamise vajaduse ja sageduse üle saab otsustada kontrolltaimede vaatlemise põhjal. Soovitatakse kasutada katsenõude altkastmist (nt klaaskiudnõõri abil). Alguses võib siiski kasutada ülaltkastmist, et aidata kaasa seemnete idanemisele ja hõlbustada mullapinna töötlemise puhul kemikaali kandumist mulda.
24. Konkreetsete kasvutingimused peaksid olema katses kasutatava liigi ja uuritava kemikaali jaoks sobivad. Kontrolltaimi ja kemikaaliga kokku puutuvaid taimi tuleks kasvatada samades keskkonnatingimustes, kuid tuleks võtta asjakohased meetmed, et takistada uuritava kemikaali (nt lenduva kemikaali) ülekandumist ühest katserühmast teise ja katserühmast kontrollrühma.

*Ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse*

25. Ühel kemikaali kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse (piirsalduskatse) jaoks sobiva kontsentratsiooni või koguselise määra kindlaksmääramisel tuleb arvesse võtta mitut tegurit. Üldotstarbeliste kemikaalide puhul hõlmab see kemikaali füüsikalise-keemilise omadusi. Taimekaitsevahendite puhul tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalise-keemilise omadusi ja kasutusrežiimi, selle maksimaalset kontsentratsiooni või töötlemisel kasutatavat kogust, töötlemiskordade arvu hooaja kohta ja/või kemikaali püsivust. Et teha kindlaks, kas üldotstarbeline kemikaal on fütotoksiin, võib olla asjakohane teha katse maksimaalsel sisaldusel 1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta.

*Kogusevahemiku leidmise katse*

26. Vajaduse korral võib teha kogusevahemiku leidmise katse, et leida lõplikus koguse ja mõju vahelise sõltuvuse uuringus kasutamiseks sobivad kontsentratsioonid või koguselised määrad. Kogusevahemiku leidmise katses kasutatavad kontsentratsioonid või koguselised määrad tuleks valida suure intervalliga (nt 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta). Taimekaitsevahendite puhul võib kontsentratsioonide või koguseliste määrade valimisel lähtuda soovitatavast või maksimaalsest kontsentratsioonist või töötlemisel kasutatavast kogusest ning kasutada sellest näiteks 1/100, 1/10 ja 1/1.

*Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse*

27. Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhineva katse eesmärk on teha kindlaks koguse ja mõju vaheline sõltuvus ja määrata vastavalt reguleerivate asutuste nõuetele  $EC_x$  või  $ER_x$  väärtus taimede tärkamise, biomassi ja/või visuaalselt hinnatava mõju puhul, kasutades võrdlusalusena kemikaaliga mitte kokku puutuvaid kontrolltaimi.
28. Kontsentratsioonide või koguste arv ja intervall peaks olema piisav, et võimaldada usaldusväärselt hinnata koguse ja mõju vahelist sõltuvust, koostada regressioonivõrrand ja arvutada hinnanguline  $EC_x$  või  $ER_x$  väärtus. Valitud kontsentratsioonid või koguselised määrad peaksid hõlmama määratavaid  $EC_x$  või  $ER_x$  väärtusi. Kui on näiteks vaja leida  $EC_{50}$  väärtus, on soovitatav kasutada katses koguseid, mille puhul mõju ulatus on 20–80 %. Selle saavutamiseks soovitatakse kasutada lisaks kemikaaliga töötlemata

▼ **M6**

kontrollile vähemalt viit kontsentratsiooni või koguselist määra geomeetriselises jadas, mille tegur ei ole suurem kui kolm. Paralleelpottide arv igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt neli ja seemnete üldarv vähemalt 20. Teatud taimede puhul, mille seemnete idanevuse määr on väike või mille kasv tavapärast varieerub, võib olla vaja kasutada katse statistilise usaldusväärsuse tõstmiseks suuremat arvu paralleelpotte. Kui katses kasutatakse suuremat arvu kontsentratsioone või koguselisi määru, võib paralleelpottide arvu vähendada. Kui soovitakse leida täheldatavat toimet mitteavaldatav kontsentratsiooni, võib olla vaja kasutada vajaliku statistilise usaldusväärsuse saavutamiseks suuremat arvu paralleelpotte (23).

*Vaatlused*

29. Vaatlusperioodi vältel, st 14–21 päeva jooksul pärast 50 % kontrolltaimede (vajaduse korral ka lahustiga kokku puutuvate kontrolltaimede) tärkamist vaadeldakse taimi sageli (vähemalt kord nädalas ja võimaluse korral iga päev) ning jälgitakse tärkamist, visuaalselt hinnatavaid fütotoksilisuse ilminguid ja sümptomeid. Katse lõpus tuleks registreerida tärganud taimede protsentuaalne osakaal ja ellujäänud taimede biomass, samuti silmaga nähtav kahjulik mõju taimede eri osadele. See kahjulik mõju hõlmab tärganud seemikute ebanormaalsel välimusel, kasvu kängumist, kloroosi, värvusemuutusi, suremist ja mõju taimede arengule. Lõpliku biomassi mõõtmiseks võib kasutada ellujäänud taimede võrse lõpliku keskmist kuivmassi; selleks lõigatakse võrse mullapinna tasandilt ära ja kuivatatakse seda 60 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Teise võimalusena võib lõpliku biomassi määramiseks kasutada võrse märgmassi. Kui reguleerivad asutused seda nõuavad, võib mõõdetav näitaja olla ka võrse kõrgus. Vaadeldava toksilise mõju määramiseks tuleks kasutada ühtset silmaga nähtavate kahjustuste hindamise süsteemi. Näited kvalitatiivse ja kvantitatiivse visuaalse hindamise kohta on esitatud allikates 23 ja 24.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Statistiline analüüs***Ühel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse*

30. Iga taimeliigi kohta saadud andmete analüüsimiseks tuleks kasutada sobivat statistilist meetodit (21). Tuleks esitada katses kasutatud kontsentratsiooni või koguselise määra puhul täheldatava toime määr või teave selle kohta, et toime jääb allapoole teatavat määra (nt kontsentratsiooni või koguselise määra  $y$  puhul täheldatav mõju on  $< x$  %).

*Mitmel kontsentratsioonil või koguselisel määral põhinev katse*

31. Koostatakse koguse ja mõju vahelist sõltuvust väljendav regressioonivõrrand. Võib kasutada eri mudeleid: näiteks võib binaarse muutujana käsitleva tärkamise puhul sobida  $EC_x$  või  $ER_x$  (nt  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ) väärtuse ja asjaomaste usalduspiiride leidmiseks logit-, probit-, Weibulli, Spearmani-Kärberi või kohandatud Spearmani-Kärberi meetod. Seemikute kasvu (kaalu ja kõrguse) kui lõppnäitajana hinnatava pideva muutuja puhul võib  $EC_x$  või  $ER_x$  väärtuse ja vastavate usalduspiiride määramiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (nt Bruce'i-Versteegi mittelineaarset regressiooni (25)). Võimaluse korral peaks  $R^2$  olema kõige tundlikuma liigi puhul alati 0,7 või suurem ja mõju ulatus katses kasutatavate kontsentratsioonide või koguseliste määrade juures hõlmama vahemikku 20–80 %. Kui soovitakse määrata täheldatavat toimet mitteavaldatav kontsentratsioon, tuleks eelistada suure usaldusväärsusega statistilisi mudeleid, mille valimisel tuleks lähtuda andmete jaotusest (21, 26).

**Katseprotokoll**

32. Katseprotokollis tuleks esitada katsetulemused koos katsetingimuste üksikasjaliku kirjelduse, tulemusi käsitleva põhjaliku arutelu, andmeanalüüsi tulemuste ja nende põhjal tehtud järeldustega. Tuleks esitada tulemusi käsitlev kokkuvõtlik tabel ja lühikokkuvõte. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

**▼ M6***Uuritav kemikaal:*

- uuritava kemikaali identifitseerimisandmed ja asjakohased omadused (nt  $\log P_{ow}$ , lahustuvus vees, aururõhk ning võimaluse korral säilivus ja käitumine keskkonnas);
- üksikasjad katselahuse valmistamise ja punkti 18 kohase kasutatavate kontsentratsioonide kontrollimise kohta.

*Katseliik:*

- üksikasjalikud andmed katseorganismi kohta: liik/sort, sugukond, teaduslik nimetus ja tavanimetus, võimalikult üksikasjalik teave seemnete päritolu kohta (st tarnija nimi, idanemise protsentuaalne määr, seemnete suurusklass, partii number, seemnete kogumise aasta või kasvuperiood, idanemise hindamise kuupäev), elujõulisus jne;
- katses kasutatud ühe- ja kaheiduleheliste liikide arv;
- liikide valimise põhjendus;
- seemnete hoiustamise, töötlemise ja säilitamise kirjeldus.

*Katsetingimused:*

- katseruum (nt kasvukamber, fütotron või kasvuhoone);
- katsesüsteemi kirjeldus (nt poti mõõtmed, poti materjal ja mulla kogus);
- mulla omadused (mulla lõimis või tüüp: mullaosakeste jaotus ja liigitus, füüsikalised ja keemilised omadused, sealhulgas orgaanilise aine protsentuaalne sisaldus, orgaanilise süsiniku protsentuaalne sisaldus ja pH);
- mulla/substraadi (nt muld, kunstlik pinnas, liiv jm) ettevalmistamine enne katset;
- toitainete lisamise korral nende kirjeldus;
- uuritava kemikaaliga töötlemine: töötlemismeetodi kirjeldus, seadmete, kokkupuutemäärade ja asjaomaste koguste, sealhulgas kemikaalisisalduse kontrollimise kirjeldus, kaliibrimismeetodi kirjeldus ja töötlemise ajal valitsenud keskkonnatingimuste kirjeldus;
- kasvutingimused: valgustustihedus (nt fotosünteesiks sobiva kiirguse puhul), valgustusperiood, maksimaalne ja minimaalne temperatuur, kastmisrežiim ja -meetod, väetamine;
- seemnete arv poti kohta, taimede arv kemikaali iga koguse puhul, paralleelpottide arv iga kokkupuutemäära puhul;
- kontrollide tüüp ja arv (negatiivsed ja/või positiivsed kontrollid, vajaduse korral lahustiga kontrollid);
- katse kestus.

*Tulemused:*

- tabel, mis sisaldab kõiki lõppnäitajaid iga paralleelpoti, kasutatud kontsentratsiooni või koguselise määra ja liigi kohta;
- tärganud taimede arv ja protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;
- taimede mõõdetud biomassi (võrsete kuivmass või märgmass) protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;

▼ **M6**

- kui mõõdeti võrsete kõrgust, siis selle protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühma näitajaga;
  - uuritava kemikaali põhjustatud visuaalselt hinnatavate kahjustuste protsentuaalne määr võrreldes kontrollrühmaga ning selliste kahjustuste kvalitatiivne ja kvantitatiivne kirjeldus (kloroos, nekroos, närbumine, varre või lehtede moonumine, samuti sellise mõju puudumine);
  - kui visuaalselt hinnatavate kahjustuste puhul kasutatakse hindamisskaalat, siis sellise skaala kirjeldus;
  - ühel kogusel põhineva katse puhul tuleks märkida kahjustuste protsentuaalne määr;
  - $EC_x$  või  $ER_x$  (nt  $EC_{50}$ ,  $ER_{50}$ ,  $EC_{25}$ ,  $ER_{25}$ ) väärtus ja asjaomased usalduspiirid. Regressioonanalüüsi tegemise korral esitatakse regressioonivõrrandiga seotud standardviga ja konkreetsete parameetrite (nt tõus, algordinaat) hinnangulise väärtuse standardviga;
  - täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (ja vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon), kui see on teada;
  - kasutatud statistiliste meetodite ja eelduste kirjeldus;
  - graafik eespool kirjeldatud andmete ning koguse ja mõju vahelise sõltuvuse kohta katses kasutatud liigi puhul.
- Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatavad ebatavalised ilmingud.

## KIRJANDUS

- (1) Schrader, G., Metge, K., ja Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Appl. Soil Ecol.* 7: 189–193.
- (2) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (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) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (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) USA Materjalide Katsetamise Ühing (ASTM) (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) USA Keskkonnakaitseamet (1982). FIFRA, 40CFR, osa 158.540. Alajaotis J, osad 122-1 ja 123-1.
- (6) USA Keskkonnakaitseamet (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., ja 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 (peakorter), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.



▼ **M6**

- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., ja 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.* 48.
- (10) Hale, B., Hall, J. C., Solomon, K., ja Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario, Kanada.
- (11) Mulla lõimise klassifitseerimine (USA põllumajandusministeeriumi ja ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni süsteemid): *Weed Sci.* 33, Suppl. 1 (1985) ja *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 26: 305 (1962).
- (12) Audus, L. J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. Väljaandes: Audus, L. J. (toim.), *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*. London, New York, Academic Press, NY, 5. peatükk, lk 163–206.
- (13) Beall, M. L., Jr., ja 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., ja Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties. *J. Agro.* 61: 247–250.
- (15) USA Toidu- ja Ravimiamet (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 lk, USA Toidu- ja Ravimiamet, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R. A., Wright, J. P., Honegger, J. L., ja Warren, L. W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. *Pest Manag. Sci.* 58: 1161–1174.
- (17) Boutin, C., Elmegaard, N., ja Kjær, 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.
- (18) Boutin, C., ja Rogers, C. A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. *Ecotoxicology* 9: 255–271.
- (19) Boutin, C., ja 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., ja Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2532–2541.
- (21) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (22) Hatzios, K. K., ja 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., ja Friesen, G. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Sci.* 25: 386–389.
- (24) Frans, R. E., ja Talbert, R. E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. Väljaandes: Truelove, B. (toim.), *Research Methods in Weed Science*, 2. väljaanne. Southern Weed Science Society, Auburn, lk 15–23.
- (25) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485–1492.
- (26) Käesoleva lisa peatükk C.33 „Vihmausside (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*) sigivuse katse”.

▼ **M6***1. liide***Mõisted**

**Toimeaine** – aine, millel on ettenähtud spetsiifiline bioloogiline mõju (nt putukatõrje, taimehaiguste tõrje või umbrohutõrje töödeldaval alal); tuntud ka kui tehnilise puhtusastmega toimeaine.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Taimekaitsevahend** või **pestitsiid** – spetsiifilise bioloogilise mõjuga materjal, mida kasutatakse eesmärgiga kaitsta taimi kahjurite (nt seenhaigused, putukad ja konkureerivad taimed) eest.

**EC<sub>x</sub>** või **ER<sub>x</sub>** (vastavalt **kontsentratsioon** või **kogus, mille puhul mõju ulatus on x %**) – kontsentratsioon või kogus, mille juures katse lõppnäitajale avalduva ebasoodsa mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest (nt EC<sub>25</sub>/ER<sub>25</sub> ja EC<sub>50</sub>/ER<sub>50</sub> tähistavad kontsentratsiooni või koguselist määra, mille puhul seemikute tärkamise määr, võrsete kaal või ellujäänud taimede lõpparv väheneb või visuaalselt hinnatavate kahjustuste määr suureneb vastavalt 25 % ja 50 % võrra).

**Tärgamine** – koleoptiili või idulehe ilmumine mullapinnale.

**Valmistis** – asjaomast toimeainet sisaldav kaubanduslik valmistoode, tuntud ka kui lõppvalmistis<sup>(1)</sup> ja tüüpiline lõpptoode.

**Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)** – uuritava kemikaali väiksem kontsentratsioon, mille juures täheldatakse teatavat mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul täheldatakse sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju ning selline kontsentratsioon on suurem kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon.

**Muud kui sihttaimed** – taimed, mis paiknevad väljaspool sihttaimede ala. Taimekaitsevahendite puhul tähistatakse selle mõistega tavaliselt taimi, mis paiknevad väljaspool kemikaaliga töötlemise ala.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC)** – uuritava kemikaali suurim kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju.

**Fütotoksilisus** – asjaomase kemikaali toimel ilmnevad kahjulikud kõrvalekalded taimede tavapärasest välimusest ja kasvust, mida mõõdetakse ja hinnatakse visuaalselt.

**Paralleelüksus** – kontrollrühma ja/või katserühma esindav katseüksus. Käesoleva katsemeetodi puhul on paralleelüksusena määratletud pott.

**Visuaalne hindamine** – silmaga nähtavate kahjustuste hindamine taimede väliskuju, elujõulisuse, väärarengute, kloroosi, nekroosi ja üldise välimuse põhjal võrdluses kontrolltaimedega.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

<sup>(1)</sup> Lõppvalmistis – asjaomast toimeainet sisaldav turustatav valmistoode.

▼ **M6**

## 2. liide

**Taimetatsetes varem kasutatud liikide loetelu**

Sugukond	Liik	Tavanimetus
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Porgand
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Päevalill
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Aedsalat
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Valge sinep
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Hiina kapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Peakapsas
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Naeris
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Salatkress
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Redis
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Suhkrupeet
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Kurk
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max (G. soja)</i>	Sojauba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Munguba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Põõsasuba, lattuba, harilik aeduba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Hernes
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Põld-lambalääts
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Harilik nõiahammas
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Aasristik
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Vikk
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Lina
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Harilik tatar
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tomat

▼ **M6**

Sugukond	Liik	Tavanimetus
<i>MONOCOTYLEDONAE</i>		
Liliaceae (Amarylladaceae)	<i>Allium cepa</i>	Harilik sibul
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Harilik kaer
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Harilik oder
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Karjamaa-raihein
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Harilik riis
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Harilik rukis
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Terasorgo, sudaani sorgo
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Harilik nisu
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Harilik mais

## Põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluvate võimalike liikide loetelu

## Võimalike fütotoksilisuse hindamiseks sobivate liikide OECD loetelu

Märkus: allpool esitatud tabel sisaldab teavet 52 põllumajanduskultuuride hulka mittekuuluva liigi kohta (allikaviited on märgitud iga kande puhul sulgudes). Seemikute tärkamise määrad on esitatud avaldatud kirjanduse põhjal ja üksnes üldise ettekujutuse loomiseks. Konkreetset katsetulemused võivad sõltuvalt seemnete päritolust ja muudest teguritest varieeruda.

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisstü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<b>APIACEAE</b> <i>Torilis japonica</i> (jaapani harjasputk)	Ü, K; häiritud kooslusega alad, hekid, karjamaad (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	Külmöötlus (7, 14, 18, 19); küpsemine võib olla vajalik (19); pimedus pärsib idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)		
<b>ASTERACEAE</b> <i>Bellis perennis</i> (harilik kirikakar)	M; rohumaad, haritavad põllud, rohukamar (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	V = P (14)	0 (4)	3 (50 %) (19); 11 (100 %) (18)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); eritöötluseta (4, 14)	PÄRAST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (rukkilill)	Ü; põllud, teeperved, lagealad (16)	4,1–4,9 (4, 14)	V = P (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	Eritöötluseta (2, 4)	PÄRAST (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (must jumikas)	M; põllud, teeperved, lagealad (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (50 %) (19); 4 (97 %) (18)	Küpsemine võib olla vajalik (18, 19); pimedus pärsib idanemist (19); eritöötluseta (5, 14, 26)	PÄRAST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (aedvaak)	M; häiritud kooslusega niisked alad (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		Eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	A, F	

▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<i>Leontodon hispidus</i> (kare seanupp)	M; põllud, teeperved, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	4 (50 %) (19); 7 (80 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (17, 18, 19); eritöötluseta (5, 23)	PÄRAST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (karvane päevakübar)	K, M; häiritud kooslusega alad (16)	0,3 (4, 14)	V = P (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	Eritöötluseta (4, 14, 33)	PÄRAST (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (kanada kuldvits)	M; karjamaad, lagen-dikud (16)	0,06–0,08 (4, 14)	V = P (11)	0 (4)	14–21 (11)	Segatakse võrdse koguse liivaga ja hoitakse 24 tundi giberelliinhappe lahuses kontsentratsiooniga 500 ppm (11); eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (pensilvaania väärtakjas)	Ü; põllud, lagealad (16)	25–61 (14, 29)		0 (1); 5 (29)		Pimedus võib idanemist pärsida (1); hoitakse 12 tundi soojas vees (29)	ENNE ja PÄRAST (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (astel-väärtakjas)	Ü; lagealad (16)	200 (14)	V = P (14); V > P (6)	10 (6)		Skarifitseerimine (14); eritöötluseta (6)	ENNE ja PÄRAST (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (kallas-väärtakjas)	Ü; põllud, lagealad (16)	67,4 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		Eritöötluseta (6, 14, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 21, 28, 31)	A	
<b>BRASSICACEAE</b> <i>Cardamine pratensis</i> (aas-jürilill)	M; põllud, teeperved, rohukamar (16, 19)	0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19); 15 (98 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); eritöötluseta (5, 14, 22)	PÄRAST (5, 22)	F	

## ▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<b>CARYOPHYLLACEAE</b> <i>Lychnis flos-cuculi</i> (harilik käokann)	M (16)	0,21 (14)	V = P (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	Küpsemine võib olla vajalik (18); eritöötluseta (5, 14, 15, 22–26)	PÄRAST (5, 15, 22–26)	F	
<b>CHENOPODIACEAE</b> <i>Chenopodium album</i> (valge hanemalts)	Ü; põlluservad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	V = P (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	Töötlemisviis sõltub seemnete värvusest (19); puhkeperiood kuivladustamisel (19); pimedus pärsib idanemist (1, 18, 19); külmöötlus (18); eritöötluseta (14, 34)	ENNE ja PÄRAST (28, 31, 34)	A	32
<b>CLUSIACEAE</b> <i>Hypericum perforatum</i> (liht-naistepuna)	M; põllud, haritavad maad, lagealad (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	3 (19); 11 (90 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (1, 18, 19); eritöötluseta (5, 14, 15, 25, 27)	PÄRAST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
<b>CONVOLVULACEAE</b> <i>Ipomoea hederacea</i> (luuderohi-lehtertapp)	Ü; teeperved, lagealad, viljapõllud (16)	28,2 (14)	V > P (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (6, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 12, 21, 28)	A	
<b>CYPERACEAE</b> <i>Cyperus rotundus</i> (visa lõikhein)	M; haritavad maad, karjamaad, teeperved (16, 30)	0,2 (14)	V = P (14)	0 (1); 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	Pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (6, 10, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 28, 31)	B	7
<b>FABACEAE</b> <i>Lotus corniculatus</i> (harilik nõiahammas)	M; rohualad, teeperved, lagealad (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 19); kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); eritöötluseta (23, 25)	PÄRAST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

## ▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvaks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamissügavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<i>Senna obtusifolia</i> (tõmbilehine kassia)	Ü; niisked metsad (16)	23–28 (9)	V = P (14); V > P (9)	10–20 (6,9)		Seemneid hoitakse 24 tundi vees (9); skarifitseerimine (14); seemnete elujõulisus on sõltuvalt värvusest erinev (1); eritöötluseta (6)	PÄRAST (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (koloraado sesbaania)	Ü; lammimullad (16)	11–13 (9, 14)	V > P (9)	10–20 (9, 21)		Seemneid hoitakse 24 tundi vees (9); kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (21)	ENNE ja PÄRAST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (aasristik)	M; põllud, teeperved, haritavad maad (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 18); küpsemine võib olla vajalik (19); kiirgus ei mõjuta idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)	A, E, F	
<b>LAMIACEAE</b> <i>Leonurus cardiaca</i> (lääne-südamerohi)	M; legendikud (16)	0,75–1,0 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		Eritöötluseta (4, 14)	PÄRAST (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (rohemünt)	M; niisked alad (16)	2,21 (4)		0 (4)		Eritöötluseta (4)	PÄRAST (4)	F	
<i>Nepeta cataria</i> (harilik naistenõges)	M; häiritud kooslusega alad (16)	0,54 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		Eritöötluseta (2, 4, 14)	PÄRAST (2,4)	F	



## ▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<i>Prunella vulgaris</i> (harilik käbihein)	M; haritavad põllud, rohualad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19); 7 (91 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); suuremate seemnete idanevuse määr on suurem (1); eritöötluseta (4, 14, 22)	PÄRAST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (harilik tõnnike)	M; rohumaad, põlluservad (19)	14–18 (14, 19)	V = P (14)		7 (50 %) (19)	Eritöötluseta (5, 14, 22)	PÄRAST (5, 22)	F	
<b>MALVACEAE</b> <i>Abutilon theophrasti</i> (pärn-abuutilon)	Ü; põllud, lagealad (16)	8,8 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	Skarifitseerimine (14); eritöötluseta (5, 10, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (torkav siida)	Ü; põllud, teeperved (16)	3,8 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		Skarifitseerimine (14); kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (6, 21)	ENNE ja PÄRAST (6, 21, 28, 31)	A, F	
<b>PAPAVERACEAE</b> <i>Papaver rhoeas</i> (kukemagun)	Ü; põllud, haritavad maad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	V = P (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	Külmöötlus ja skarifitseerimine (1, 19, 32); eritöötluseta (4, 14, 29)	PÄRAST (4)	A, D, E, F, G	
<b>POACEAE</b> <i>Agrostis tenuis</i> (harilik kastehein)	Muru, karjamaad (16)	0,07 (14)	V > P (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	Pimedus pärsib idanemist (1, 17–19); eritöötluseta (10)	PÄRAST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (põld-rebasesaba)	Ü; põllud, lagealad (16)	0,9–1,6 (29, 34)	V = P (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	Skarifitseerimine (14); töötlus KNO <sub>3</sub> lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); stratifitseerimine soojas (1); pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (34)	ENNE ja PÄRAST (28, 34)	A	32

## ▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga (1) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood (2)	Külvamisü-gavus (mm) (3)	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) (4)	Eritöötlus (5)	Mürgisuse hindamise katse (6)	Seemnete tarnijad (7)	Muud allikaviited (8)
<i>Avena fatua</i> (tuulekaer)	Ü; haritavad alad, lagealad (16)	7–37,5 (14, 30)	V = P (14); V > P (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	Skarifitseerimine (7, 32); pimedus pärsib idanemist (1); külmtöötlus (1, 18); eritöötluseta (6, 10, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (müürluste)	Ü; põllud, teeperved, haritavad maad (16)	0,45–2,28 (14, 29)	V = P (14)	3 (29)		Küpsemisperiood (1, 7, 32); valgus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (14)	ENNE ja PÄRAST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (harilik sugapea)	M; põllud, teeperved, lagealad (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	V = P (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (19); eritöötluseta (14, 29)	PÄRAST (5)	A	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (verev paelhirss)	Ü; põllud, rohukamar, lagealad (16)	0,52–0,6 (14, 30)	V = P (14)	10–20 (21)	7 (75 %), 14 (94 %) (7)	Skarifitseerimine, külmtöötlus ja küpsemine (1, 7, 14, 32); töötus KNO <sub>3</sub> lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (21)	ENNE ja PÄRAST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crus-galli</i> (tähk-kukehirss)	Ü (16)	1,5 (14)	V = P (14); V > P (3)	10–20 (7, 21)		Skarifitseerimine (7, 32); kiirgus ei mõjuta idanemist (1); eritöötluseta (3, 14, 21)	ENNE ja PÄRAST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (kanada orashein)	M; häiritud kooslusega jõeäärsed alad (16)	4–5 (14, 30)	V = P (11)	1 (11)	14–28 (11)	Eritöötluseta (2, 11)	PÄRAST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (harilik aruhein)	M; põllud, niisked alad (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	V = P (14); V > P (10)	20 (10)	9 (74 %) (10); 2 (50 %) (19)	Eritöötluseta (10, 19)	PÄRAST (10)	A	7

## ▼M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga (1) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood (2)	Külvamisü-gavus (mm) (3)	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) (4)	Eritöötlus (5)	Mürgisuse hindamise katse (6)	Seemnete tarnijad (7)	Muud allikaviited (8)
<i>Hordeum pusillum</i> (väike oder)	Ü; karjamaad, teeperved, lagealad (16)	3,28 (14)				Stratifitseerimine soojas (1); kiirgus ei mõjuta idanemist (1)	ENNE (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (põldtimut)	M; karjamaad, haritavad põllud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,45 (14, 19)	V > P (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10); 8 (50 %) (19)	Pimedus pärsib idanemist (19); kiirgus ei mõjuta idanemist (17); eritöötluseta (10, 14, 17, 19)	PÄRAST (10)	A, E	
<b>POLYGONACEAE</b> <i>Polygonum convolvulus</i> (põld-konnatatar)	Ü; lagealad, teeperved (16)	5–8 (4, 14, 29)	V = P (20)	0–2 (4, 29)		Külm töötlus 4–8 nädala vältel (1, 2, 4, 20, 29); kiirgus ei mõjuta idanemist (1)	ENNE ja PÄRAST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (kahar kirburohi)	Ü; niisked mullad (16)	1,8–2,5 (14)	V > P (6)		5 (94 %) (18)	Kiirgus ei mõjuta idanemist (1); pimedus pärsib idanemist (18); külm töötlus (1); eritöötluseta (5)	ENNE ja PÄRAST (6)	A, E	
<i>Polygonum pensylvanicum</i> (pensilvaania kirburohi)	Ü; põllud, lagealad (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		Külm töötlus 0–5 °C juures 4 nädala vältel (1, 29); pimedus pärsib idanemist (1)	ENNE (31)	A, E	
<i>Polygonum persicaria</i> (harilik kirburohi)	Ü; häiritud kooslusega alad, haritavad maad (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	V > P (13)	0 (19)	< 14 (13); 2 (50 %) (19)	Skarifitseerimine, külm töötlus, töötlus giberelliinhappega (14); külm töötlus, küpsemine (17–19); pimedus pärsib idane- mist (19); eritöötluseta (13)	PÄRAST (13)	A	32

## ▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<i>Rumex crispus</i> (kärnobliskas)	M; haritavad põllud, teeperved, lagendikud (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	V = P (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19); 6 (100 %) (33)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); küpsemine võib olla vajalik (18); eritöötluseta (4, 14, 33)	PÄRAST (4, 33)	A, E	32
<b>PRIMULACEAE</b> <i>Anagallis arvensis</i> (põld-varsapõlv)	Ü; haritavad põllud, lagendikud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Külm töötlus, töötlus giberelliin-happega (1,14, 18, 19, 32); idanemine nõuab valgust (1); eritöötluseta (2, 4)	PÄRAST (2, 4)	A, F	
<b>RANUNCULACEAE</b> <i>Ranunculus acris</i> (kibe tulikas)	M; haritavad põllud, teeperved, lagendikud (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	V = P (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	Eritöötluseta (5, 14, 22, 24–26)	PÄRAST (5, 22, 24–26)		32
<b>ROSACEAE</b> <i>Geum urbanum</i> (maamõõl)	M; hekid, niisked alad (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19); 16 (79 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19) stratifitseerimine soojas (1); eritöötluseta (5, 14, 22, 25, 26)	PÄRAST (5, 22, 25, 26)	A	
<b>RUBIACEAE</b> <i>Galium aparine</i> (roomav madar)	Ü; haritavad põllud, niisked alad, häiritud kooslusega alad (16, 19)	7–9 (14, 19)	V = P (14)		5 (50 %) (19); 6 (100 %) (18)	Külm töötlus (1, 18, 19); kiirgus ei mõjuta idanemist (18, 19); valgus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (6, 14)	ENNE ja PÄRAST (6, 28)	A	32

▼ M6

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga <sup>(1)</sup> ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood <sup>(2)</sup>	Külvamisü-gavus (mm) <sup>(3)</sup>	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) <sup>(4)</sup>	Eritöötlus <sup>(5)</sup>	Mürgisuse hindamise katse <sup>(6)</sup>	Seemnete tarnijad <sup>(7)</sup>	Muud allikaviited <sup>(8)</sup>
<i>Galium mollugo</i> (pehme madar)	M; hekvallid, lagen-dikud (8)	7 (29)	V = P (14)	2 (29)		Eritöötluseta (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PÄRAST (5, 22, 24, 26)	A	
<b>SCROPHULARIACEAE</b> <i>Digitalis purpurea</i> (verev sõrmkübar)	K, M; hekid, lagen-dikud (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19); 8 (99 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (1, 17–19); eritöötluseta (4, 22–26)	PÄRAST (4, 22–26)	D, G, F	
<i>Veronica persica</i> (pärsia mailane)	Ü; haritavad põllud, lagendikud, häiritud kooslusega alad (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (19); 5 (96 %) (18)	Pimedus pärsib idanemist (18, 19); külmtöötlus (18); eritöötluseta (14)	ENNE ja PÄRAST (28)	A	32

<sup>(1)</sup> Ü = üheaastased taimed; K = kaheaastased taimed; M = mitmeaastased taimed.

<sup>(2)</sup> Allikates 11,14 ja 33 osutatakse seemnete idandamiseks vajalikule valguse (V) ja pimeduse (P) suhtele. Allikates 3, 6, 9, 10, 13 ja 20 osutatakse kasvutingimustele kasvuhoones.

<sup>(3)</sup> 0 mm puhul külvatakse seemned mullapinnale või need vajavad idanemiseks valgust.

<sup>(4)</sup> Esitatud arv tähistab päevade arvu, mille jooksul idanes viidatud allika kohaselt teatav protsent seemnetest – nt 3 päeva (idanevuse määr 50 %) (allikas 19).

<sup>(5)</sup> Küpsemise ja/või stratifitseerimise kestus ei ole alati märgitud. Temperatuuritingimusi ei ole täpsustatud, välja arvatud külmtöötluse puhul, sest kasvuhoones tehtavas katses on temperatuuri reguleerimise võimalused piiratud. Kasvuhoones esinevate tavapäraste temperatuurikõikumiste juures idaneb enamik seemneid.

<sup>(6)</sup> On märgitud, kas taimeliigiga tehtud fütotoksilisuse katses vaadeldi herbitsiidi mõju ENNE või PÄRAST tärkamist.

<sup>(7)</sup> On esitatud näited seemnete kommertstarnijate kohta.

<sup>(8)</sup> On esitatud viited kahe muu kasutatud allika kohta.

▼ **M6****Osutatud seemnetarnijad**

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

## OSUTATUD KIRJANDUS

- (1) Baskin, C. C., ja Baskin, J. M. (1998). Seeds. Academic Press, Toronto.
- (2) Blackburn, L. G., ja 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., ja Maguire, R. J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2532–2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., ja 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., ja Butler, R. (1992). Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Ann. Appl. Biol.* 121: 669–677.
- (6) Brown, R. A., ja Farmer, D. (1991). Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. Väljaandes: Plants for toxicity assessment, 2. köide. ASTM STP 1115, Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Wang, W., ja Lewis, M. A. (toim.), USA Materjalide Katsetamise Ühing, Philadelphia, lk 197–208.

▼ **M6**

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

**▼ M6**

- (26) Marrs, R. H., ja Frost, A. J. (1997). A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *J. Environ. Manage.* 50: 369–388.
- (27) Marshall, E. J. P., ja Bernie, J. E. (1985). Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds, lk 1021–1028.
- (28) McKelvey, R. A., Wright, J. P., ja Honegger, J. L. (2002). A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Manag. Sci.* 58: 1161–1174.
- (29) Morton, S. (Herbiseed) (2004). Isiklik suhtlus. (<http://www.herbiseed.com>)
- (30) USA põllumajandusministeeriumi loodusvarade kaitse amet (NRCS) (2004). The Plants Database, versioon 3.5 (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490, USA.
- (31) USA Keskkonnakaitseamet (1999). One-Liner Database (USA Keskkonnakaitseamet, pestitsiidiprogrammide büroo, keskkonnas säilivuse ja keskkonnamõju talitus, keskkonnaepidemioloogia üksus).
- (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., ja Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada) (2004). Isiklik suhtlus.
- (34) Zwerger, P., ja Pestemer, W. (2000). Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. Pflanzenk. Pflanzen, Sonderh.*, 17: 711–718.



**▼M6**

## 4. liide

**Näited teatavate põllumajanduskultuuride jaoks sobivate kasvutingimuste kohta**

Allpool esitatud tingimused on leitud olevat sobivad 10 põllumajanduskultuuri jaoks ning neid võib kasutada orientiirina ka kasvukambris teatavate muude liikidega tehtavate katsete puhul.

Süsihappegaasi sisaldus:  $350 \pm 50$  ppm.

Suhteline õhuniiskus: valgel ajal  $70 \pm 5$  % ja pimedal ajal  $90 \pm 5$  %.

Temperatuur: päeval  $25 \pm 3$  °C ja öösel  $20 \pm 3$  °C.

Valgustusperiood: 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust, kui keskmine lainepikkus on vahemikus 400–700 nm.

Valgustustihedus:  $350 \pm 50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mõõdetuna lehestiku ülapinna tasandil.

Asjaomased põllumajanduskultuurid on järgmised:

- tomat (*Solanum lycopersicon*);
- kurk (*Cucumis sativus*);
- aedsalat (*Lactuca sativa*);
- sojauba (*Glycine max*);
- peakapsas (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
- porgand (*Daucus carota*);
- harilik kaer (*Avena sativa*);
- karjamaa-raihein (*Lolium perenne*);
- harilik mais (*Zea mays*);
- harilik sibul (*Allium cepa*).

▼ M6

C.32. VALGELIIMUKLASTE SIGIVUSE KATSE

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

▼ **M6**

C.33. **VIHMAUSSIDE (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) SIGIVUSE  
KATSE**

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

▼ **M6****C.34. ANAEROOBSETE BAKTERITE ELUTEGEVUSE PÄRSSUMISE MÄÄRAMINE – (REOVEE)SETTE KÄÄRIMISEGA KAASNEVA GAASIERITUSE VÄHENEMINE****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 224 (2007). Veekeskonda sattunud kemikaalid läbivad nii aeroobse kui ka anaeroobse tsooni, kus need võidakse lagundada ja/või kus need võivad pärssida bakterite elutegevust; mõnel juhul võivad kemikaalid püsida anaeroobses tsoonis puutumata aastakümneid või kauem. Reovee puhastamise esimeses ehk eelsetitusetapis on aeroobne tsoon vedelas supernatandis ja anaeroobne tsoon vedelikukihi all olevas settes. Sellele järgnevas teises etapis on aeroobne tsoon aereerimisbasseini aktiivmudas ja anaeroobne tsoon settebasseinis vedelikukihi all olevas settes. Kummastki etapist pärit muda töödeldakse tavaliselt anaeroobselt; saadakse metaani ja süsihappegaasi, mida üldjuhul kasutatakse elektri tootmiseks. Looduskeskkonnas püsivad lahtedes, jõesuudmetes ja meres olevasse settesse jõudnud kemikaalid, mis ei ole biolagundatavad, selles anaeroobses tsoonis tõenäoliselt määramata aja. Mõne kemikaali puhul jõuab suurem osa sellest kõnealusesse tsooni tulenevalt kemikaali füüsikalistest omadustest – näiteks vähesest vees lahustuvusest või suurest hõljuvainele adsorbeerumise määra – või asjaolust, et kemikaal ei ole aeroobselt biolagundatav.
2. Keskkonda sattuv kemikaal peaks soovitatavalt olema küll biolagundatav nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes, ent samal ajal on väga oluline, et selline kemikaal ei pärsiks mikroorganismide elutegevust kummaski tsoonis. Ühendkuningriigis on paaril juhul esinenud metaanitootmise täielikku pärssumist tööstuslikus reovees näiteks pentaklorofenooli toimel, mistõttu tuli teha väga suuri kulutusi, et pärssunud muda kääritusmahutitest ohutusse kohta transportida ja naaberkäitistest heas seisukorras kääritusmuda asemele tuua. On esinenud ka palju juhtumeid, kus kääritusprotsessi on väiksemal määral häirinud muud kemikaalid, sealhulgas alifaatsed halogeenitud süsivesinikud (kasutatakse keemilises puhastuses) ja detergendid, mis on põhjustanud kääritusmahutite tõhususe olulist vähenemist.
3. Bakterite elutegevuse pärssimisega on seotud vaid üks katsemeetod – aktiivmuda mikroorganismide hingamist käsitlev meetod C.11 (1), millega hinnatakse uuritava kemikaali mõju hapnikusidumise kiirusele substraadi juuresolekul. Seda meetodit on laialdaselt kasutatud selleks, et teha varakult kindlaks uuritava kemikaali võimalik kahjulik mõju reovee aeroobsele töötlemisele ja määrata kontsentratsioon, mille juures pärssumist ei toimu ja mida saab kasutada mitmes eri biolagunduvuse katses. Katsemeetod C.43 (2) loob piiratud võimaluse teha kindlaks uuritava kemikaali pärssiv mõju gaasitootmisele anaeroobses mudas, mida on tavapärasel kontsentratsioonil tahkeid osakesi sisaldava mudaga võrreldes lahjendatud kümme korda, et võimaldada nõutavat täpsust biolagunemise protsentuaalse määra hindamisel. Kuna lahjendatud muda võib olla pärssivate kemikaalide suhtes tundlikum, otsustas Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni töörühm töötada välja meetodi, mille puhul kasutatakse lahjendamata muda. Tutvuti vähemalt kolme tekstiga (Taanist, Saksamaalt ja Ühendkuningriigist) ja lõpuks koostati kaks ISO standardit – ISO 13641-1 (3) ja ISO 13641-2 (4); neist esimese puhul kasutatakse lahjendamata muda ja teise puhul sajakordselt lahjendatud muda, mis vastab väikese bakterite populatsiooniga mudale ja settele. Kummagi meetodi valideerimiseks tehti võrdlusuuring (5); uuringu 1. osas kinnitati esimese standardi vastuvõetavust, kuid 2. osa suhtes tekkisid lahkavused. Ühendkuningriik leidis, et kuna märkimisväärse osa uuringu osalejate andmeid toodeti gaasi väga vähe või üldse mitte – osaliselt seepärast, et vabaruumi protsentuaalne maht oli optimaalse tundlikuse saavutamiseks liiga suur (75 %) –, on vaja seda meetodit täiendavalt uurida.
4. Ühendkuningriigis tehtud varasemates uuringutes (6, 7) kirjeldatakse manomeetrilist meetodit, mille puhul on substraadina kasutatud lahjendamata kääritavat muda ja lisaks töötlemata reoveeset kolbides mahuga 500 ml; asjaomased seadmed olid kohmakad ja töötlemata reovee hais oli ülitugev. Hiljem leidsid rakendust Sheltoni ja Tiedje (8) kompaksemad ja mugavamad seadmed, mida kasutasid Battersby ja Wilsoni (9) välja töötatud

▼ **M6**

kujul edukalt Wilson *et al.* (10). Kawahara *et al.* (11) valmistasid laboris edukalt veel standardmuda proove mitme kemikaali anaeroobse biolagunduvuse ja pärssiva mõju hindamise katsetes kasutamiseks. Samuti tehti katse, milles kasutati töötlemata muda asemel substraadina kas sada korda lahjendatud anaeroobset muda või sellist muda, setet vmt, milles ei täheldatud bakterite aktiivset elutegevust.

- Selle meetodi abil võib saada kasulikku teavet, mis võimaldab ennustada uuritava kemikaali tõenäolist mõju gaasitootmisele anaeroobsetes kääritusmahutites. Et hinnata, kas mikroorganismid on võimelised uuritava kemikaaliga kohanema või kas kemikaalid, mis tõenäoliselt mudas absorbeeruvad või mudaosakeste pinnale adsorbeeruvad, võivad käesolevas katses ette nähtust pikema perioodi vältel akumulieruda kontsentratsioonis, mille puhul avaldub mürgine mõju, tuleks siiski teha pikemaajalisi katseid, milles jäljendatakse kääritusmahutite tööd täpsemalt.

**KATSE PÕHIMÕTE**

- Käärivast mudast (tahkete osakeste üldsisaldus 20–40 g/l) ja lagundatava substraadi lahusest koosneva segu alikvoote inkubeeritakse suletud nõudes ilma kemikaalita või eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaaliga kuni 3 ööpäeva. Toodetud gaasi (metaani ja süsihappegaasi) koguse määramiseks mõõdetakse rõhu (Pa) suurenemist pudelites. Asjaomastes katse- ja kontrollpudelites toodetud gaasikoguste alusel arvutatakse uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidel ilmneva gaasitootmise pärssumise protsentuaalne määr. EC<sub>50</sub> ja muud mõju iseloomustamiseks määratavad kontsentratsioonid arvutatakse graafiku põhjal, mis väljendab pärssumise protsentuaalset määra sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsioonist või sagedamini selle logaritmist.

**TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

- Üldjuhul tuleks uuritavat kemikaali kasutada puhtaimal kättesaadaval kujul, kuna mõne kemikaali, näiteks klorofenoolide puhul võivad lisandid olla palju mürgisemad kui uuritav kemikaal ise. Tuleks siiski kaaluda kemikaali kasutamist katses sellisel kujul, nagu seda toodetakse/müüakse. Valmistoodete kasutamist üldjuhul ei soovitata, kuid raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul võib valmistoodete kasutamine olla asjakohane. Uuritava kemikaali kohta kättesaadav teave peaks hõlmama muu hulgas selliseid näitajaid nagu lahustuvus vees ja mõnes orgaanilises lahustis, aururõhk, adsorptsioonitegur, hüdroliüüsi kiirus ja biolagunduvus anaeroobsetes tingimustes.

**MEETODI KASUTATAVUS**

- Käesolev katsemeetod on kasutatav nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute, sealhulgas lenduvate kemikaalide puhul. Vees raskesti lahustuvate (vt allikas 12) ja suure lenduvusega kemikaalide puhul on siiski vaja olla eriti hoolikas. Võib kasutada ka muust anaeroobset allikast, näiteks mudast, küllastunud mullast või tsettist pärit inokulumi. Mürgise kemikaaliga varem kokku puutunud anaeroobsete bakterite süsteemid võivad olla kohanenud nii, et bakterite elutegevus säilib ksenobiootilise kemikaali juuresolekul. Kohanenud bakterisüsteemist pärit inokulumi puhul võib taluvus uuritava kemikaali suhtes olla suurem kui kohanemata süsteemist pärit inokulumi puhul.

**VÕRDLUSKEMIKAALID**

- Katsemeetodi kontrollimiseks hinnatakse tavapärase katse raames ka sobivatesse katsenõudesse lisatavat võrdluskemikaali; on leitud, et 3,5-diklorofenool pärssib järjepidevalt nii anaeroobset gaasitootmist kui ka hapnikutarbimist aktiivmudas ja muid biokeemilisi reaktsioone. Samuti on leitud, et kaks muud kemikaali – metüleenbis(tiotsüanaat) ja pentaklorofenool – pärssivad metaanitootmist rohkem kui 3,5-diklorofenool, kuid nende kemikaalidega saadud tulemused on valideerimata. Pentaklorofenooli ei soovitata kasutada, kuna see ei ole puhtal kujul hõlpsalt kättesaadav.

▼ **M6****TULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS**

10. Rahvusvahelises võrdlusuuringus (5) täheldati, et 3,5-diklorofenooli ja 2-bromoetaansulfoonhappe puhul ei ole EC<sub>50</sub> reprodutseeritavus uuringus osalenud 10 laboris kuigi hea. (Esimese kemikaali puhul oli kõnealune väärtuste vahemik 32–502 mg/l ja teise puhul 220–2 190 mg/l.)

Laborite arv	Milligrammides liitri kohta			Milligrammides muda grammi kohta		
	Keskmine	Standardhälve	Variatsioonikordaja (%)	Keskmine	Standardhälve	Variatsioonikordaja (%)
	3,5-diklorofenool					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetaansulfoonhape					
10	1 058	896	85	34	26	76

**EC<sub>50</sub> andmed võrdlusuuringust – lahjendamata muda**

11. Eri laborites saadud tulemuste suur variatsioonikordaja kajastab suurel määral muda mikroorganismide erinevat tundlikkust, olenevalt varasemast kokkupuutest uuritava kemikaali või sellele keemiliselt sarnase kemikaaliga või sellise kokkupuute puudumisest. Muda kogusel põhineva EC<sub>50</sub> väärtuse määramise täpsus ei olnud oluliselt suurem kui ruumalal põhineva väärtuse (mg/l) määramise täpsus. Kolmes laboris, kus esitati andmed 3,5-diklorofenooli EC<sub>50</sub> väärtuse määramise täpsuse kohta, oli variatsioonikordaja palju väiksem (vastavalt 22, 9 ja 18 %) kui kõigi kümne labori tulemuste keskvaartuse puhul. Kõnealuses kolmes laboris saadud keskmine väärtus oli vastavalt 3,1, 3,2 ja 2,8 mg/g. Asjaolu, et ühes laboris saadud variatsioonikordaja väärtus on vastuvõetav ja palju väiksem kui eri laborites saadud tulemuste variatsioonikordaja ehk 92 % asemel 9–22 %, viitab sellele, et eri mudapartidel on märkimisväärselt erinevad omadused.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

12. Lisaks tavapärastele laboriseadmetele on vaja järgmist:

- a) inkubaator – sädemekindel ja väärtusele  $35 \pm 2$  °C reguleeritava temperatuuriga;
- b) sobiva nimimahuga <sup>(1)</sup> survekindlad klaasist katsenõud, millel on gaasikindel pinnakattega tihendkork ja mis kannatavad rõhku umbes 2 baari ehk  $2 \times 10^5$  Pa (pinnakattena võib kasutada näiteks polütetrafluoroetüleen). Soovitatakse kasutada klaasist seerumipudeleid, mille nimimaht on 125 ml ja tegelik maht umbes 160 ml ning millel on seerumi jaoks ette nähtud tihendkork <sup>(2)</sup> ja alumiiniumist pressrõngas, kuid hästi sobivad ka muud pudelid üldmahuga 0,1–1 liitrit;

<sup>(1)</sup> Soovitav maht on 0,1–1 liitrit.

<sup>(2)</sup> Soovitatakse kasutada gaasikindlat silikoonkorki. Peale selle on soovitatav kontrollida korki, eriti butüülkummist korki gaasikindlust, sest müügilolevad korgid ei ole mitmel juhul metaani suhtes piisavalt gaasikindlad ja mõni kork ei ole pärast sellest nõela läbitorkamist katsetingimustes enam gaasikindel.

— On soovitatav ja lenduvate kemikaalide puhul kohustuslik kasutada gaasikindlaid pinnakattega korke (mõni müügilolev kork on suhteliselt õhuke – paksusega alla 0,5 cm – ega säilita pärast sellest süstlanõela läbitorkamist gaasitihedust).

— Kui uuritav kemikaal ei ole lenduv, soovitatakse kasutada butüülkummist korki paksusega umbes 1 cm (see säilitab pärast nõela läbitorkamist tavaliselt gaasikindluse).

— Enne katset soovitatakse korki tähepanelikult uurida, et veenduda, et see jääb pärast nõela läbitorkamist gaasikindlaks.

▼ **M6**

- c) täppisrõhumõõtur <sup>(1)</sup> koos nõelakinnitusega – toodetud gaasi (metaani ja süsihappegaasi) üldkoguse mõõtmiseks ja gaasi väljalaskmiseks kohandatud rõhumõõtur. Selleks sobiv seade on näiteks süstlanõelaga ühendatud käeshoitav täppisrõhumõõtur; gaasikindel kolmikventiil hõlbustab ülerõhust vabanemist (1. liide). Rõhuanduri toru ja ventiili siseruumala peab olema võimalikult väike, et seadme siseruumala arvestamata jätmisest tulenev viga oleks tühine;
- d) soojustisolatsiooniga konteinerid kääriava muda transportimiseks;
- e) kolmesuunalised rõhuventiilid;
- f) sõel ava suurusega 1 mm<sup>2</sup>;
- g) nõu kääriava muda jaoks – umbes 5-liitrise mahuga klaasist või kõrgtihedast polüetüleenist pudel, mis on varustatud segistiga ja seadmetega gaasilise lämmastiku (vt punkt 13) juhtimiseks läbi vabaruumi;
- h) membraanfiltrid (0,2 µm) substraadi steriliseerimiseks;
- i) mikrosüstlad rõhuanduri (vt punkti 12 alapunkt c) gaasikindlaks ühendamiseks pudelis (vt punkti 12 alapunkt b) oleva vabaruumiga ja lahustumatu vedela uuritava kemikaali lisamiseks pudelisse;
- j) kindakamber, mis töötab väikesel lämmastiku ülerõhul – soovitatav, kuid mitte kohustuslik.

**Reaktiivid**

13. Kogu katse vältel kasutatakse analüütilise puhtusastmega reaktiive. Kogu katse vältel tuleks kasutada kõrge puhtusastmega gaasilist lämmastikku, mille hapnikusisaldus on väiksem kui 5 µl/l.

**Vesi**

14. Lahjenduse tegemiseks mis tahes etapis kasutatakse eelnevalt desaereeritud deioniseeritud vett. Sellist vett ei ole vaja analüütiliselt kontrollida, kuid tuleb tagada, et deioniseerimiseseadet hooldatakse korrapäraselt. Põhilahuste valmistamiseks kasutatakse samuti deioniseeritud vett. Enne anaeroobse inokulumi lisamist uuritava kemikaali mis tahes lahusele veendutakse, et lahus ei sisalda hapnikku. Selleks juhitakse 1 tunni vältel enne inokulumi lisamist läbi lahjendusvee (või lahjendatud lahuse) gaasilist lämmastikku või kuumutatakse lahjendusvett keemistemperatuurini ja jahutatakse hapnikuvabas keskkonnas toatemperatuurini.

**Kääriv muda**

15. Aktiivselt kääriv muda kogutakse reoveepuhasti kääritusmahutist või labori kääritusmahutist, kus töödeldakse peamiselt olmereoveest pärit muda. Praktiline teave labori kääritusmahutist pärit muda kohta on esitatud mujal (11). Kui kavatsetakse kasutada kohandatud inokulumi, võib kaaluda tööstuslikust reoveepuhastist pärit kääriava muda kasutamist. Muda kogumiseks kasutatakse kõrgtihedast polüetüleenist või sarnasest materjalist laia kaelaga pudeleid, mis on võimelised paisuma. Proovivõtupudelid täidetakse mudaga nii,

<sup>(1)</sup> Mõõturit tuleks kasutada ja korrapäraselt kalibreerida vastavalt tootja juhistele. Kui kasutatakse ettenähtud kvaliteediga rõhumõõturit, näiteks teraskesta suletud mõõturit, ei ole laboris kalibreerimine vajalik. Sellist mõõturit tuleks soovitatava intervalliga kalibreerida vastava loa saanud instituudis. Kalibreerimistäpsust saab laboris kontrollida ühe mõõtmisega rõhul  $1 \times 10^5$  Pa, võrreldes saadud tulemust mehaanilise näidikuga rõhumõõturi näiduga. Kui kõnealune mõõtmine tehakse õigesti, ei muutu ka mõõtetulemuste lineaarsus. Kui kasutatakse muud mõõteseadet, millel puudub tootja kalibreerimissertifikaat, soovatakse koostada korrapäraselt kogu mõõtepiirkonda hõlmav teisendusgraafik (2. liide).

**▼ M6**

et mudapind jääb pudelisuust umbes 1 cm võrra allapoole, pudelid suletakse tihedalt, kasutades soovitatavalt kaitseventiili (punkti 12 alapunkt e), ning paigutatakse soojusisolatsiooniga konteineritesse (punkti 12 alapunkt d), et minimeerida temperatuurišokki transportimisel temperatuuril  $35 \pm 2$  °C hoitavasse inkubaatorisse. Pudelite avamisel tuleb ülerõhku tekitava gaasi väljalaskmiseks kork ettevaatlikult lahti teha või kasutada kolmesuunalist rõhuventiili (punkti 12 alapunkt e). Soovitatav on kasutada muda mõne tunni jooksul pärast kogumist; vastasel juhul säilitatakse muda temperatuuril  $35 \pm 2$  °C kuni 3 ööpäeva gaasilise lämmastiku all, kus muda aktiivsus tavaliselt oluliselt ei vähene.

Hoiatus – käärivas mudas tekivad tule- ja plahvatusohtlikud gaasid ning samuti võib see sisaldada patogeenseid organisme, mistõttu tuleb muda käsitlemisel võtta asjakohased ettevaatusabinõud. Ohutuse huvides ei kasutata muda kogumiseks klaasnõusid.

**Inokulum**

16. Vahetult enne kasutamist segatakse muda ettevaatlikult ning lastakse läbi  $1 \text{ mm}^2$  suuruste avadega sõela (punkti 12 alapunkt f) sobivasse pudelisse (punkti 12 alapunkt g), mille vabaruumist juhatakse läbi lämmastikujuga. Võetakse proov tahke kuivaine üldsisalduse määramiseks (vt nt ISO 11923 (13) või samaväärne ELi standard). Muda kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Tahke aine sisaldus on tavaliselt 2–4 % (massiühikutes mahuühiku kohta). Kontrollitakse muda pH-d ja reguleeritakse see vajaduse korral tasemele  $7 \pm 0,5$  ühikut.

**Katsesubstraat**

17. 10 g toitepuljongit (nt Oxoid), 10 g pärmiekstrakti ja 10 g D-glükoosi lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse 100 milliliitri. Lahus steriliseeritakse filtrimisega läbi  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  suuruste pooridega membraanfiltrit (punkti 12 alapunkt h) ja seda kasutatakse kohe või säilitatakse 4 °C juures kuni 1 ööpäev.

**Uuritav kemikaal**

18. Valmistatakse eraldi iga vees lahustuva uuritava kemikaali põhilahus, mille kemikaalisisaldus hapnikuvabas lahjendusvees (punkt 14) on näiteks 10 g/l. Eri kontsentratsiooniga reaktsioonisegude valmistamiseks kasutatakse sobivas koguses sellist põhilahust. Teise võimalusena valmistatakse igast põhilahusest lahjenduste seeria, nii et katsepudelis lisatav kogus on iga soovitud lõppkontsentratsiooni puhul sama. Põhilahuse pH tuleks vajaduse korral reguleerida tasemele  $7 \pm 0,2$  ühikut.
19. Kui uuritav kemikaal ei ole piisaval määral vees lahustuv, juhendatakse standardist ISO 10634 (12) või samaväärsest ELi standardist. Kui on vaja kasutada orgaanilist lahustit, hoidutakse kasutamast näiteks kloroformi ja süsiniktetrakloriidi, mis teadaolevalt pärsivad tugevalt metaanitootmist. Valmistatakse vees lahustumatu kemikaali vajaliku kontsentratsiooniga lahus sobivas lenduvas lahustis, näiteks atsetoonis või dietüületris. Nõutav kogus lahustipõhist lahust lisatakse tühja katsepudelis (punkti 12 alapunkt b) ja lahustil lastakse enne muda lisamist aurustuda. Muul viisil töötlemise puhul kasutatakse standardit ISO 10634 (12) või samaväärset ELi standardit, ent tuleb meeles pidada, et emulgeerimiseks kasutatav pindaktiivne aine võib pärssida anaeroobset gaasitootmist. Kui on alust arvata, et orgaanilise lahusti või emulgeeriva aine juuresolek põhjustab katsevigu, võib uuritava kemikaali lisada pulbri või vedeliku kujul otse katsesegusse. Lenduvad kemikaalid ja vees lahustumatud vedelad uuritavad kemikaalid võib süstida inokulumi sisaldavasse seerumipudelis mikro süstla abil (punkti 12 alapunkt i).



**▼ M6**

20. Uuritav kemikaal lisatakse pudelitesse nii, et moodustuks kontsentratsioonide geomeetiline jada – näiteks 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l ja 15,6 mg/l. Kui vahemik, milles mürgisus avaldub, ei ole sarnaste kemikaalide andmetest teada, tehakse sobiva vahemiku kindlakstegemiseks esmalt kontsentratsioonivahemiku leidmise eelkatse kontsentratsioonidel 1 000 mg/l, 100 mg/l ja 10 mg/l.

**Võrdluskemikaal**

21. Valmistatakse 3,5-diklorofenooli vesilahus (10 g/l), lisades tahkele ainele loksutades vähehaaval minimaalse koguse naatriumhüdroksiidi lahust kontsentratsiooniga 5 mol/l, kuni aine on lahustunud. Seejärel lisatakse vajaliku ruumala saavutamiseks hapnikuvaba lahjendusvett (punkt 14); lahustumist võib hõlbustada ultraheliga töötlemine. Võib kasutada ka muud võrdluskemikaali, kui vähemalt kolme katse põhjal, mis on tehtud eri allikatest pärit või eri aegadel kogutud inokulumidega, on leitud selle kemikaali EC<sub>50</sub> väärtuste keskmine vahemik.

**SEGAVID ASJAOLUD / VEAD**

22. Mõni muda koostisosa võib eeldatavalt reageerida võimaliku pärssiva kemikaaliga, muutes selle mikroorganismidele kättesaamatuks ja tuues seeläbi kaasa pärssiva mõju vähenemise või puudumise. Samuti võidakse saada valed tulemused, kui muda juba sisaldab sama pärssivat kemikaali, mida katses uuritakse. Peale nimetatud võimaluste on teada veel mitu tegurit, millest tulenevalt võidakse saada valed tulemused. Need tegurid ja neist tingitud vigade ärahoidmise või vähendamise meetodid on loetletud 3. liites.

**KATSE KÄIK**

23. Vajalike paralleelproovide arv sõltub nõutavast täpsusastmest pärssiva mõju määramisel. Kui pudelikork on kogu katse vältel piisavalt gaasikindel, kasutatakse iga vajaliku kontsentratsiooni puhul ainult ühte katsepudelite partiid (vähemalt kolm pudelit). Samuti kasutatakse ühte partiid võrdluskemikaaliga pudelid ja ühte kontrollpartiit. Kui aga pudelikork on gaasikindel vaid ühe või paari läbitorkamise puhul, kasutatakse uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil ühte partiid (nt kolm pudelit) iga ajavahemiku (t) jaoks, mille kohta soovitakse andmeid saada. Samamoodi kasutatakse t väärtuste arvule vastaval arvul pudelipartiisid võrdluskemikaaliga rühmas ja kontrollrühmas.
24. On soovitatav kasutada kindakambrit (punkti 12 alapunkt j). Vähemalt 30 minutit enne katse algust alustatakse gaasilise lämmastiku juhtimist läbi kõiki vajalikke seadmeid sisaldava kindakambri. Tagatakse, et muda temperatuur jääb pudelite käsitsemise ja sulgemise ajal vahemikku  $35 \pm 2$  °C.

**Eelkatse**

25. Kui muda aktiivsus ei ole teada, soovitatakse teha eelkatse. Selleks kasutatakse kontrollseguisid, kus tahke aine sisaldus on näiteks 10 g/l, 20 g/l ja 40 g/l ning mis sisaldavad substraati, kuid mitte uuritavat kemikaali. Samuti kasutatakse reaktsioonisegu eri kogustes, et võrrelda tulemusi vabaruumi mahu ja vedeliku mahu suhtarvu kolmel või neljal eri väärtusel. Eri ajavahemike vältel toodetud gaasikoguste põhjal valitakse välja sobivaimad tingimused, mis võimaldavad toota märkimisväärse koguses gaasi ja teha kaks mõõtmist päevas optimaalse tundlikkusega <sup>(1)</sup> ning alandada igapäevaselt rõhku plahvatusohtu tekitamata.

**Uuritava kemikaali lisamine**

26. Vees lahustuv kemikaal lisatakse tühja katsepudelisse (punkti 12 alapunkt b) vesilahusena (punkt 18). Iga kontsentratsiooni puhul (punkt 20) kasutatakse vähemalt kolmest pudelist koosnevat partiit. Lahustumatu või raskesti lahustuva kemikaali puhul süstitakse see mikrosüstlaga orgaanilises lahustis

<sup>(1)</sup> See kehtib katsesüsteemis ja katsetingimustes, mille puhul gaasikoguseid, mida toodetakse kemikaalita kontrollnõudes ja nõudes, kus pärssumise määr on 70–80 %, on võimalik hinnata vastuvõetava veamääraga.

▼ **M6**

lahustatud kujul tühjadesse pudelitesse, et saada uuritava kemikaali kõigil viiel kontsentratsioonil partii paralleelpudeleid. Lahusti aurustatakse, juhtides gaasilise lämmastiku joa üle katsepudelisse oleva lahuse pinna. Teise võimalusena lisatakse kaalutud kogus tahket kemikaali otse katsepudelisse.

27. Kui lahustumatu või raskesti lahustuva vedela uuritava kemikaali lisamiseks ei kasutata lahustit, lisatakse see mikrosüstla abil otse katsepudelisse pärast inokulumi ja katse-substraadi lisamist (vt punkt 30). Lenduva uuritava kemikaali võib lisada samal viisil.

**Inokulumi ja substraadi lisamine**

28. Vajalik kogus sõelutud käärivat muda (vt punkt 16) segatakse 5-liitrisel pudelil (punkti 12 alapunkt g), juhtides samal ajal gaasilist lämmastikku joana läbi pudeli vabaruumi. Uuritava kemikaali vesilahust või aurustatud lahustiga saadud lahust sisaldavatesse katsepudelitesse suunatakse õhu eemaldamiseks umbes kaheks minutiks gaasilise lämmastiku juga. Hästi segatud muda alikvoot, nt 100 ml, viiakse laiaotsalise pipeti või mõõtesilindri abil katsepudelisse. On oluline täita pipett ühekorraga täpselt vajaliku koguse mudaga, sest muda tahked osakesed settivad kergesti. Kui pipetti võetakse vajalikust suurem kogus, tühjendatakse pipett ja alustatakse uuesti.
29. Seejärel lisatakse piisavas koguses substraadi lahust (punkt 17), et toitepulgongi, pärmiekstrakti ja D-glükoosi sisaldus saadavas segus oleks iga nimetatud koostisosa puhul 2 g/l; samal ajal jätkatakse lämmastiku juhtimist läbi pudeli. Allpool on esitatud näited katse-segu koostise kohta.

Uuritava kemikaali lõplik massikontsentratsioon katsepudelil (mg/l)	Uuritava kemikaali kogus (ml)		Reaktiivid ja segu koostisosad (ml)		
	Põhilahus a: 10 g/l (punkt 18)	Põhilahus b: 1 g/l (punkt 18)	Lahendusvesi (punkt 14)	Inokulum (punkt 16)	Substraat (punkt 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

Pudeli üldmaht – 160 ml. Vedeliku ruumala – 103 ml.

Gaasi ruumala – 57 ml ehk 35,6 % üldmahust.

30. Lenduva või lahustumatu vedela uuritava kemikaali (vt punkt 27) jaoks ette nähtud piisavast arvust tühjadest pudelitest eemaldatakse õhk samal viisil gaasilise lämmastikuga.

▼ **M6****Kontrollproovid ja võrdluskemikaal**

31. Kontrollrühm moodustatakse vähemalt kolmest pudelist, mis sisaldavad üksnes muda ja substraati. Peale selle kasutatakse katses paralleelpudeleid, mis sisaldavad lisaks mudale ja substraadile piisavas koguses võrdluskemikaali 3,5-diklorofenooli põhilahust (punkt 21), et saavutada lõppkontsentratsioon 150 mg/l. Sellel kontsentratsioonil peaks gaasitootmise pärssumise määr olema umbes 50 %. Teise võimalusena kasutatakse võrdluskemikaali mitmes eri kontsentratsioonis. Lisaks kasutatakse katses pH määramiseks veel nelja pudelit, mis sisaldavad muda, hapnikuvaba vett ja substraati. Kahte pudelisse lisatakse uuritavat kemikaali katses kasutatavas suurimas kontsentratsioonis ja ülejäänud kahte pudelisse lisatakse hapnikuvaba vett.
32. Veendutakse, et kõik uuritava kemikaaliga, võrdluskemikaaliga või kontrollseguga pudelid sisaldavad samas koguses ( $V_R$ ) vedelikku; vajaduse korral lisatakse vedelikumahu suurendamiseks hapnikuvaba deioniseeritud vett (punkt 14). Vabaruum peaks moodustama 10–40 % pudeli üldmahust; selle täpne väärtus valitakse eelkatsest saadud andmete põhjal. Pärast kõikide koostisosade lisamist pudelisse eemaldatakse gaasi juhtimiseks kasutatud nõel ja kõik pudelid suletakse kummikorgi ja alumiiniumist pressrõngaga (punkti 12 alapunkt b), niisutades korki paigaldamise hõlbustamiseks tilga deioniseeritud veega. Iga pudeli sisu segatakse loksutamise teel.

**Pudelite inkubeerimine**

33. Pudelid paigutatakse reguleeritava temperatuuriga inkubaatorisse, mis on soovitatavalt varustatud loksutamisseadmega, ja neid hoitakse temperatuuril  $35 \pm 2$  °C. Pudeleid inkubeeritakse pimedas. Umbes 1 tunni pärast võrdsustatakse rõhk pudelites atmosfäärirõhuga, torgates rõhumõõturiga (punkti 12 alapunkt c) ühendatud süstlanõela ükskaaval läbi iga pudeli korgi, avades ventiili ja sulgedes selle taas pärast rõhumõõturi näidu langemist nulli. Nõel tuleks gaasi lekkimise ärahoidmiseks sisestada pudelisse umbes 45-kraadise nurga all. Kui pudelite inkubeerimisel ei kasutata loksutamisseadet, loksutatakse pudeleid süsteemi tasakaalustamiseks käsitsi kaks korda päevas kogu inkubeerimisperioodi vältel. Pudelite inkubeerimisel pööratakse need tagurpidi, et hoida ära gaasi lekkimist läbi korgi. Tagurpidi pööramine ei ole siiski sobiv juhtudel, kus lahustumatu kemikaal võib pudeli põhja külge kinni jääda.

**Rõhu mõõtmine**

34. Kui temperatuur pudelites on saavutanud väärtuse  $35 \pm 2$  °C, mõõdetakse ja registreeritakse pH kahes neljast selleks ette nähtud pudelist ning nende pudelite sisu kõrvaldatakse; ülejäänud pudeleid inkubeeritakse pimedas edasi. Rõhku pudelites mõõdetakse ja registreeritakse järgneva 48–72 tunni jooksul kaks korda päevas, torgates rõhumõõturi nõela ükskaaval läbi iga pudeli korgi ja kuivatades nõela pärast iga mõõtmist. Pudeli kõiki osi hoitakse mõõtmise ajal inkubeerimistemperatuuril ja mõõtmine tuleks lõpule viia võimalikult kiiresti. Rõhunäidul lastakse stabiliseeruda ja see registreeritakse. Seejärel avatakse ventiil gaasi väljalaskmiseks ja suletakse see pärast rõhunäidu langemist nulli. Katse tavapärane kestus on 48 tundi alates rõhu esmakordse võrdsustamise hetkest ehk aja nullpunktist. Lenduva kemikaali puhul tuleks kemikaali kao minimeerimiseks piirduda rõhu mõõtmise ja võrdsustamisega ühel korral (inkubeerimise lõppedes) või kahel korral (10).
35. Kui rõhunäit on negatiivne, siis ventiili ei avata. Mõnikord koguneb süstlanõela ja voolikusse niiskust, millest annab märku väike negatiivne rõhunäit. Sellisel juhul eemaldatakse nõel, raputatakse voolikut, kuivatatakse see pehmepaberiga ja paigaldatakse uus nõel.

**pH mõõtmine**

36. Pärast viimast rõhu mõõtmist mõõdetakse ja registreeritakse iga pudeli sisu pH.

**▼M6****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste esitamine**

37. Iga paralleelpudelite partii puhul arvutatakse igal mõõtmiskorral registreeritud rõhu keskvärtus ja summaarne rõhk ning gaasi keskmine kumulatiivne kogurõhk. Koostatakse keskmise kumulatiivse gaasitoodangu ( $P_a$ ) ajast sõltuvuse kõverad kontrollproovide, uuritava kemikaaliga proovide ja võrdluskemikaaliga proovide kohta. Kõvera lineaarses osas valitakse üks ajapunkt – tavaliselt 48 tundi – ja arvutatakse pärssumise protsentuaalne määr ( $I$ ) igal kontsentratsioonil vastavalt järgmisele võrrandile:

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

kus

$I$  on pärssumise protsentuaalne määr,

$P_t$  on valitud ajahetkeks uuritava kemikaali juuresolekul toodetud gaasi rõhk paskalites ( $Pa$ ) ja

$P_c$  on samaks ajahetkeks kontrollrühmas toodetud gaasi rõhk paskalites ( $Pa$ ).

On soovitatav koostada kaks kõverat, millest üks väljendab  $I$  sõltuvust kontsentratsioonist ja teine  $I$  sõltuvust kontsentratsiooni logaritmist, ning valida neist lineaarsele sõltuvusele lähedasem kõver. Valitud kõvera põhjal määratakse visuaalselt või regressioonanalüüsi teel  $EC_{50}$  hinnanguline väärtus ( $mg/l$ ). Võrdlemise hõlbustamiseks võib olla otstarbekam väljendada kemikaali kontsentratsiooni milligrammides kuivaine üldmassi grammi kohta. Sellise kontsentratsiooni saamiseks jagatakse kemikaali massikontsentratsioon ( $mg/l$ ) muda kuivaine massikontsentratsiooniga ( $g/l$ ) (punkt 16).

38. Arvutatakse kas pärssumise protsentuaalne määr võrdluskemikaali ainsal kasutatud kontsentratsioonil või piisava arvu kontsentratsioonide kasutamise korral  $EC_{50}$ .
39. Kontrollrühmas toodetud gaasi keskmine rõhk  $P_c$  ( $Pa$ ) teisendatakse rõhümõõturi kalibrihmiskõvera alusel (2. liide) ruumalaks ja selle põhjal arvutatakse gaasisaagis, mida väljendatakse gaasi mahuna, mis on toodetud 48 tunni jooksul 100 ml lahjendamata mudast, mille tahke aine sisaldus on 2–4 % (20–40  $g/l$ ).

**Nõuetekohasuse kriteeriumid**

40. Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni laboritevahelise uuringu (5) tulemustest nähtub, et võrdluskemikaal (3,5-diklorofenool) pärsib gaasitootmist 50 % võrra kontsentratsioonivahemikus 32–510  $mg/l$  keskvärtusega 153  $mg/l$  (punkt 10). See vahemik on nii lai, et nõuetekohasuse kriteeriumidena ei ole võimalik kehtestada pärssiva mõju usaldusväärseid piirmäärasid; see peaks saama võimalikuks, kui leitakse viis, kuidas muuta inokulumid ühetaolisemaks. Kontrollpudelites 48 tunni jooksul toodetud gaasi kogus jäi vahemikku 21–149 ml muda kuivaine grammi kohta (keskmine: 72  $ml/g$ ). Ei täheldatud selget seost toodetud gaasikoguse ja asjaomase  $EC_{50}$  väärtuse vahel. Katse lõpus mõõdetud pH jäi vahemikku 6,1–7,5.
41. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui võrdluskemikaaliga rühmas, kus 3,5-diklorofenooli kontsentratsioon on 150  $mg/l$ , on pärssumise määr üle 20 %, kemikaalita kontrollrühmas toodetakse üle 50 ml gaasi kuivaine grammi kohta ning pH väärtus jääb katse lõpus vahemikku 6,2–7,5.

**Katseprotokoll**

42. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;

**▼ M6**

— uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

*Katsetingimused:*

- katsenõudes oleva vedeliku ja vabaruumi maht;
- katsenõude ja gaasimõõteseadme kirjeldus (nt rõhumõõduri tüüp);
- teave uuritava kemikaali ja võrdluskemikaali lisamise kohta katsesüsteemi, katses kasutatud kontsentratsioonide kohta ja lahustite kasutamise kohta;
- kasutatud inokulumi üksikasjalikud andmed: reoveepuhasti nimi, töödeldava reovee päritolu kirjeldus (nt töötemperatuur, muda retentsiooniaeg, kas tegemist on peamiselt olmereovee või tööstusliku reoveega jne), tahke aine sisaldus, gaasitootmise intensiivsus anaeroobses kääritusmahutis, varasem kokkupuude või võimalik eelnev kohanemine mürgiste kemikaalidega, muda või sette võtmise koht jne;
- inkubeerimise temperatuur ja kestus;
- paralleelproovide arv.

*Tulemused:*

- pH väärtus katse lõpus;
- kõik asjakohased katsenõudest, kemikaalita kontrollnõudest ja võrdluskemikaaliga nõudest saadud mõõteandmed (nt rõhk paskalites või millibaarides) tabeli kujul;
- pärssumise protsentuaalne määr katsepudelites ja võrdluskemikaaliga pudelites ning pärssumise määra ja kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse kõverad;
- arvutatud EC<sub>50</sub> väärtused, väljendatuna kujul mg/l ja mg/g;
- gaasitoodang muda grammi kohta 48 tunni jooksul;
- iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;
- tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse kõiki kõrvalekaldeid käesolevast katsemeetodist ning kõiki segavatest asjaoludest ja vigadest tulenevaid kõrvalekaldeid eeldatavatest katsetulemustest;
- teave selle kohta, kas katse eesmärk oli mõõta mürgisust kemikaaliga varem kokku puutunud mikroorganismidele või sellega varem mitte kokku puutunud mikroorganismidele.

**KIRJANDUS**

- (1) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Aktiivmuda mikroorganismide hingamise (süsiniku ja ammooniumi oksüdeerimise) pärssimise katse”.
- (2) Käesoleva lisa peatükk C.43 „Orgaaniliste ainete anaeroobne biolagunevus läbikäärinud mudas: mõõtmise gaasi eraldumise järgi”.
- (3) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2003). ISO 13641-1: Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.
- (4) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2003). ISO 13641-2: Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (2000). Ring test of ISO 13641-1 and ISO 13641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans, M. R., ja Painter, H. A. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham TQ5 8BA, Ühendkuningriik.

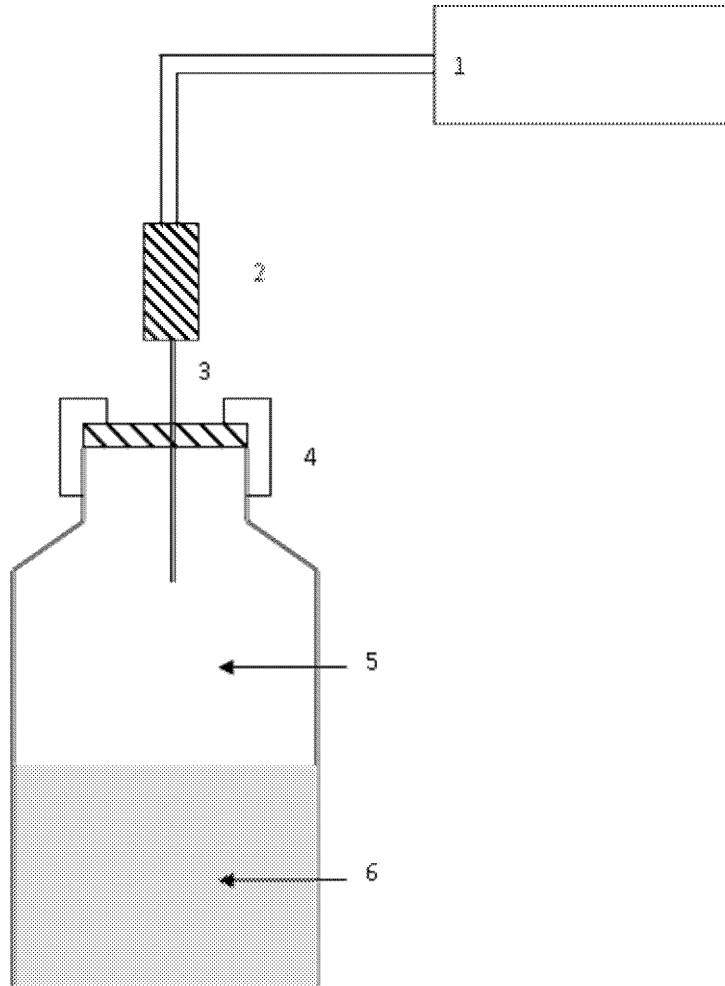
**▼ M6**

- (6) Swanwick, J. D., ja Foulkes, M. (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Water 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. Väljaandes: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. Ühendkuningriik.
- (8) Shelton, D. R., ja Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microb.* 47: 850–857.
- (9) Battersby, N. S., ja 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, H. A., ja Battersby, N. S. (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. International Symposium on Ecotoxicology. Proceedings: Ecotoxicological Relevance of Test Methods; November 19-20, 1990, GSF-Forschungszentrum Neuherberg. Saksamaa. Toim. Steinberg, C., ja Kettrup, A. Lk 117–132 (1992).
- (11) Kawahara, K., Yakabe, Y., Chida, T., ja Kida, K. (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere* 39: 2007–2018.
- (12) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (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 an aqueous medium.
- (13) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1997). ISO 11923: Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6**

## 1. liide

Näide seadme kohta, millega mõõdetakse gaasirõhku toodetava biogaasi koguse määramiseks



*Selgitus:*

- 1 – rõhumõõtur
- 2 – gaasikindel kolmikventiil
- 3 – süstlanõel
- 4 – gaasikindel kork (pressrõngas ja tihendkork)
- 5 – vabaruum
- 6 – kääriva muda inokulum

Katsenõusid hoitakse temperatuuril  $35 \pm 2$  °C.

▼ **M6**

## 2. liide

**Rõhumõõtu näidu teisendamine**

Rõhumõõtu näidu põhjal gaasikoguse arvutamiseks võib kasutada standardkõverat, mille alusel leitakse muda kuivaine grammi kohta 48 tunni jooksul toodetud gaasi kogus. Seda muda aktiivsuse näitajat kasutatakse ühe kriteeriumina katsetulemuste nõuetekohasuse hindamisel. Kaliibrimiskõvera koostamiseks süstitakse teadaolev kogus gaasi temperatuuril  $35 \pm 2$  °C seerumipudelis, mis sisaldab reaktsioonisegu ruumalale ( $V_R$ ) vastavas koguses vett.

- Viide seerumipudelis viiakse temperatuuril  $35 \pm 2$  °C hoitava vee alikvoot ruumalaga  $V_R$  (ml). Pudelid suletakse ja paigutatakse tasakaalustamiseks 1 tunniks veevanni, mille temperatuur on  $35 \pm 2$  °C.
- Rõhumõõtur pannakse tööle, näidul lastakse stabiliseeruda ja see reguleeritakse nulli.
- Süstlanõel torgatakse läbi ühe pudeli korgi, avatakse ventiil ja suletakse see pärast rõhumõõtu näidu langemist nulli.
- Seda toimingut korratakse ülejäänud pudelitega.
- Igasse pudelis süstitakse 1 ml õhku temperatuuriga  $35 \pm 2$  °C. Mõõturiga ühendatud nõel torgatakse läbi ühe pudeli korgi ja rõhunäidul lastakse stabiliseeruda. Registreeritakse rõhu väärtus, avatakse ventiil ja suletakse see pärast rõhunäidu langemist nulli.
- Seda toimingut korratakse ülejäänud pudelitega.
- Kõiki kirjeldatud toiminguid korratakse, kasutades 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml õhku.
- Koostatakse rõhu (Pa) ja lisatud gaasikoguse (ml) vahelist sõltuvust väljendav teisendusgraafik. Seadme näidu sõltuvus gaasikogusest on lineaarne vahemikus 0–70 000 Pa ja toodetud gaasikoguste vahemikus 0–50 ml.



▼ **M6**

## 3. liide

**Valesid tulemusi põhjustada võivad teadaolevad tegurid**a) *Pudelikorkide kvaliteet*

Seerumipudelite jaoks on müügil eri tüüpi tihendkorke; paljud neist – sealhulgas butüülkummist korgid – kaotavad käesoleva katsemeetodi kohastes tingimustes pärast nõelaga läbitorkamist oma gaasikindluse. Mõnikord langeb rõhk pärast süstlanõela korgist läbi torkamist väga aeglaselt. Lekete ärahoidmiseks soovitatakse kasutada gaasikindlaid tihendkorke (punkti 12 alapunkt b).

b) *Niiskus süstlanõelas*

Mõnikord koguneb süstlanõela ja voolikusse niiskust, millest annab märku väike negatiivne rõhunäit. Olukorra parandamiseks eemaldatakse nõel, raputatakse voolikut, kuivatatakse see pehmepaberiga ja paigaldatakse uus nõel (punkti 12 alapunkt c ja punkt 35).

c) *Hapnikuga saastumine*

Anaeroobseid protsesse käsitlevate meetoditega võidakse saada valed tulemused hapnikuga saastumise tõttu, mille tagajärjel võib gaasitootmine väheneda. Käesoleva katsemeetodi puhul peaks see võimalus olema väga väike, kuna kasutatakse üksnes anaeroobsete protsesside jaoks ette nähtud metoodikat, sealhulgas kindakambrit.

d) *Mudas sisalduvad suuremõtmelised substraadid*

Anaeroobset gaasitootmist ja muda tundlikkust mõjutavad koos inokulumiga katsepudelis viidavad substraadid. Olmereoovee kääritusmahutitest pärit kääriv muda sisaldab sageli veel äratuntavaid koostisosi, näiteks juukseid ja tselluloosist koosnevaid taimejääke, mis võivad muuta representatiivse proovi võtmise raskeks. Mudas leiduvad suured lahustumatud koostisosad saab kõrvaldada sõelumise teel, mis suurendab representatiivsete proovide saamise tõenäosust (punkt 16).

e) *Lenduv uuritav kemikaal*

Lenduv uuritav kemikaal koguneb katsepudeli vabaruumi. See võib kaasa tuua uuritava kemikaali osalise kao süsteemist rõhu mõõtmisele järgneva gaasi väljalaskmise ajal ning sellest tuleneva EC<sub>50</sub> väärtuse ülehindamise. Kõnealust viga on võimalik vähendada, kui valitakse sobiv vabaruumi mahu ja vedelikumahu suhe ega lasta pärast rõhu mõõtmist gaasi välja (10).

f) *Toodetava gaasikoguse mittelineaarne suurenemine*

Kui kõver, mis väljendab keskmise kumulatiivse toodetud gaasikoguse sõltuvust inkubeerimisajast, ei ole 48 tunni pikkuse perioodi lõikes üldjoontes lineaarne, võib katsetulemuste täpsus väheneda. Selle ärahoidmiseks võib abi olla erinevast allikast pärit kääriiva muda kasutamisest ja/või toitepuljongit, pärmiekstrakti ja glükoosi sisaldava katsesubstraadi (punkt 29) sisalduse suurendamisest.

▼ **M6**

## 4. liide

**Mõju hindamine väikese biomassisaldusega keskkonnaproovide – anaeroobse muda, sette jmt – puhul**

## SISSEJUHATUS

- A.1. Üldjuhul on mikroobide eriaktiivsus (tahke aine kuivmassi grammi kohta toodetava gaasi kogus) loodusliku anaeroobse muda, sette, mulla jmt puhul palju väiksem kui reoveest pärit anaeroobse muda puhul. Sellest tulenevalt on vaja sellistele väiksema aktiivsusega proovidele avalduva kemikaalide pärssiva mõju hindamiseks teatavaid katsetingimusi muuta. Kõnealuste väiksema aktiivsusega proovide puhul on võimalik kasutada ühte kahest üldisest lähenemisviisist:
- a) teha muudetud kujul eelkatse (punkt 25) lahjendamata mudaproovi, mullaproovi vmt-ga temperatuuril  $35 \pm 2$  °C või keskkonningimuste täpsemaks jäljendamiseks proovi kogumiskohas valitseval temperatuuril (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13641 1. osas);
  - b) teha katse kääritusmahutist pärit sajakordselt lahjendatud reoveemudaga, et jäljendada keskkonnaproovi eeldatavalt väikest aktiivsust, ent hoida temperatuuri väärtusel  $35 \pm 2$  °C (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13641 2. osas).
- A.2. Valiku a puhul võib järgida siin kirjeldatud meetodit (mis on samaväärne standardi ISO 13641 1. osaga), kuid on oluline teha eelkatse (punkt 25) optimaalsete tingimuste kindlakstegemiseks, kui need ei ole varasematest katsetest juba teada. Muda- või setteproov tuleks näiteks segisti abil põhjalikult läbi segada ning lahjendada seda vajaduse korral väikese koguse desaereeritud lahjendusveega (punkt 14), et muuta see laiaotsalise pipeti või mõõtesilindriga ülekandmiseks piisavalt vedelaks. Kui leitakse, et toitaineid on liiga vähe, võib mudaproovi tsentrifuugida (anaeroobsetes tingimustes) ja suspendeerida selle uuesti pärmiekstrakti sisaldavas mineraalses toitelahuses (A.11).
- A.3. Valik b. Selle valiku puhul jäljendatakse piisavalt hästi keskkonnaproovide väikest aktiivsust, saavutamata samal ajal sellistele proovidele omast suurt hõljuvaine sisaldust. Kõnealuse hõljuvaine roll pärssiva mõju avaldumisel ei ole teada, kuid on võimalik, et uuritava kemikaali reageerimine muda koostisosadega ja adsorbeerumine tahketele osakestele vähendab uuritava kemikaali mürgisust.
- A.4. Üks oluline tegur on ka temperatuur: tingimuste range jäljendamise huvides tuleks katse teha proovivõtukohta temperatuuril, kuna on teada, et eri rühmadesse kuuluvad metaani tootvad bakterid eelistavad eri temperatuurivahemikke – termofiilid temperatuuri umbes 30–35 °C, mesofiilid temperatuuri 20–25 °C ja psührofiilid temperatuuri alla 20 °C – ning neile avalduv pärssiv mõju võib olla erinev.
- A.5. Kestus. Võrdlusuuringus täheldati, et 1. osa kohases üldkatses lahjendamata reoveemudaga toodetakse 2–4 ööpäeva jooksul alati piisavas koguses gaasi, kuid 2. osa kohases katses sajakordselt lahjendatud reoveemudaga toodetakse sama perioodi jooksul liiga vähe gaasi või ei toodeta seda üldse. Madsen *et al.* (1996) on viimati nimetatud katset kirjeldades seisukohal, et katse kestus peaks olema vähemalt 7 ööpäeva.

**Katse väikesel biomassi kontsentratsioonil (valik b)**

Põhitektis tuleks teha järgmised muudatused ja parandused, millega täiendatakse mõnda olemasolevat punkti või alapunkti või asendatakse need.

▼ **M6**

A.6. Punkti 6 „Katse põhimõte” täiendatakse järgmiselt:

„Seda meetodit võib kasutada sajakordselt lahjendatud anaeroobse reoveemuda puhul, millega osaliselt jäljendatakse loodusliku muda ja sette väikest aktiivsust. Inkubeerimistemperatuur võib olla kas 35 °C või proovi kogumiskohas valitsev temperatuur. Kuna bakterite aktiivsus sellises proovis on oluliselt väiksem kui lahjendamata reoveemudas, tuleks inkubeerimisperioodi pikendada vähemalt 7 ööpäevani.”

A.7. Punkti 12 alapunkti a täiendatakse järgmiselt:

„inkubaator peaks olema võimeline hoidma ka madalamat, 15 °C-ni ulatuvat temperatuuri;”

A.8. Punkti 13 lõppu lisatakse järgmine reaktiiv:

„Fosforhape (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – 85 massiprotsendiline vesilahus.”

A.9. Punkti 16 lõppu lisatakse järgmine lause:

„Katses kasutava tahke kuivaine lõplik üldsisaldus on 0,20 ± 0,05 g/l.”

A.10. Punkt 17: katsesubstraat.

Seda substraati ei kasutata, vaid see asendatakse pärmiekstraktiga (vt punktid 17, A.11, A.12 ja A.13).

A.11. Anaeroobse reoveemuda lahjendamiseks on vaja mikroelemente sisaldavat mineraalset toitelahust, millele mugavuse huvides lisatakse orgaanilise substraadina pärmiekstrakt.

Punkti 17 lõppu lisatakse järgmine tekst:

„a) Katses kasutatav mineraalne toitelahus pärmiekstraktiga.

See toitelahus valmistatakse 10 korda kontsenteeritumast toitelahusest (punkti 17 alapunkt b ja punkt A.12) ja mikroelementide lahusest (punkti 17 alapunkt c ja punkt A.13). Kasutatakse äsja tarnitud naatriumsulfiidnonahüdraati (punkti 17 alapunkt b ja punkt A.12) või pestakse ja kuivatatakse see enne kasutamist, et tagada selle piisav redutseerimisvõime. Kui katse tegemisel ei kasutata kindakambrit (punkti 12 alapunkt j), tuleks suurendada naatriumsulfiidi sisaldust põhilahuses nii, et see oleks 1 g/l asemel 2 g/l. Naatriumsulfiidi võib oksüdeerumisohtu vähendamiseks lisada sobiva põhilahuse kujul ka suletud katsepudeli korgi kaudu, et saavutada lõppsisaldus 0,2 g/l. Teise võimalusena võib kasutada titaan(III)tsitraati (punkti 17 alapunkt b). See lisatakse suletud katsepudeli korgi kaudu, et saavutada kontsentratsioon 0,8–1,0 mmol/l. Titaan(III)tsitraat on vähemürge ja väga tõhus redutseeriv aine, mis valmistatakse järgmiselt: 2,94 g trinaatriumtsitraatdihüdraati lahustatakse 50 ml hapnikuvabas lahjendusvees (punkt 14), et saada lahus kontsentratsiooniga 200 mmol/l, ning lisatakse 5 ml titaan(III)kloriidi lahust (15 g ainet 100 ml lahjendusvee kohta). Lahuse pH reguleeritakse naatriumkarbonaadiga tasemele 7 ± 0,5 ühikut ja see viiakse gaasilise lämmastiku joa all sobivasse seerumpudelisse. Titaan(III)tsitraadi kontsentratsioon selles põhilahuses on 164 mmol/l. Toitelahust kasutatakse kohe või säilitatakse 4 °C juures kuni 1 ööpäev.

A.12. b) Kümme korda kontsenteeritum toitelahus – valmistatakse järgmistest koostisainetest:

veevaba kaaliumdivesinikfosfaat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,7 g;
dinaatriumvesinikfosfaat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4,4 g
(või 11,2 g dodekahüdraati);	5,3 g;
ammooniumkloriid (NH <sub>4</sub> Cl)	

▼ **M6**

kaltsiumkloriidihüdraat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,75 g;
magneesiumkloriidheksahüdraat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	1,0 g;
raud(II)kloriidtetrahüdraat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0,2 g;
resasuriin (redoksindikaator)	0,01 g;
naatriumsulfiidnonahüdraat ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	1,0 g
või titaan(III)tsitraat lõppkontsentratsiooniga	0,8–1,0 mmol/l;
mikroelementide lahus (vt punkti 17 alapunkt c ja punkt A.13)	10,0 ml;
pärmiekstrakt	100 g.
Ained lahustatakse lahjendusvees (punkt 14) ja lahuse ruumala viiakse	1 000 milliliitri.

A.13. c) Mikroelementide lahus – valmistatakse järgmistest koostisainetest:

mangaan(II)kloriidtetrahüdraat ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0,5 g;
ortoboorhape ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0,05 g;
tsinkkloriid ( $\text{ZnCl}_2$ )	0,05 g;
vask(II)kloriid ( $\text{CuCl}_2$ )	0,03 g;
naatriummolibdaatdihüdraat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,01 g;
koobalt(II)kloriidheksahüdraat ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	1,0 g;
nikkel(II)kloriidheksahüdraat ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,1 g;
dinaatriumselenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )	0,05 g.
Ained lahustatakse lahjendusvees (punkt 14) ja lahuse ruumala viiakse	1 000 milliliitri.”

A.14. Punkt 25: eelkatse.

On oluline teha eelkatse punktis 24 kirjeldatud viisil; ainsa erinevusena peaks muda tahke aine sisaldus olema kirjeldatust sada korda väiksem ehk 0,1 g/l, 0,2 g/l ja 0,4 g/l. Inkubeerimise kestus peaks olema vähemalt 7 ööpäeva.

*Märkus:* võrdlusuuringus (5) oli vabaruumi maht liiga suur – 75 % üldruumalast; see peaks jääma soovitatavasse vahemikku 10–40 %. Siin tuleks asjakohase kriteeriumina tagada, et umbes 80-protsendilise pärssumise puhul toodetav gaasikogus oleks mõõdetav vastuvõetava täpsusega (nt  $\pm 5\%$  kuni  $\pm 10\%$ ).

A.15. Punktid 26–30: uuritava kemikaali, inokulumi ja substraadi lisamine.

Kõnealused koostisosad lisatakse nimetatud punktides kirjeldatud viisil, kuid substraadilahus (punkt 17) asendatakse toitelahusega, mis sisaldab substraadina pärmiekstrakti (A.11).

Samuti vähendatakse muda kuivaine lõppsisaldust nii, et see on 2–4 g/l asemel  $0,2 \pm 0,05$  g/l (A.9). Koostisosade lisamise kohta on esitatud kaks näidet tabelis A.1, millega asendatakse tabel punktis 29.

A.16. Punkt 33: pudelite inkubeerimine.

Kuna gaasitootmise kiirus on eeldatavalt väiksem, kestab inkubeerimine vähemalt 7 ööpäeva.

▼ **M6**

## A.17. Punkt 34: rõhu mõõtmine.

Kui on vaja registreerida gaasikogus gaasifaasis, kasutatakse pudelite vaba-ruumis rõhu mõõtmiseks punktis 34 kirjeldatud meetodit. Kui soovitakse mõõta CO<sub>2</sub> ja CH<sub>4</sub> summaarset üldkogust, vähendatakse vedela faasi pH väärtust tasemeni 2 ühikut, süstides igasse asjaomasesse pudelisse H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ja mõõdetakse rõhku pärast 30 minuti pikkust loksutamist katsetemperatuuril. Inokulumi kvaliteedi kohta täpsema teabe saamiseks tuleks mõõta rõhku igas pudelis siiski nii enne kui ka pärast hapestamist. Näiteks kui CO<sub>2</sub> tootmise kiirus on metaanitootmise kiirusest palju suurem, võib kääritavate bakterite tundlikkus muutuda ja/või uuritava kemikaali mõju metaani tootvatele bakteritele on suurem.

## A.18. Punkt 36: pH mõõtmine.

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> kasutamise korral tuleb kasutada eelkõige pH mõõtmiseks täiendavalt paari lisapudelit, kuhu ei lisata H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

*VIIDE:*

Madsen, T., Rasmussen, H. B., ja Nilsson, L. (1996). Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No. 336. Veekvaliteedi Instituut, Taani Keskkonnakaitseamet, Kopenhaagen.

*Tabel A.1.***Katsepartiide valmistamise näited.**

Reaktsioonisegu koostisosad	Näide 1	Näide 2	Tavapärane lisamise järjekord
Valmistatud inokulumi kontsentratsioon (g/l)	0,42	2,1	—
Lisatav inokulumi kogus (ml)	45	9	4
Inokulumi sisaldus katsepudelis (g/l)	0,20	0,20	—
Lisatav toitelahuse kogus (ml)	9	9	2
Lisatav lahjendusvee kogus (ml)	36	72	3
Pärmiekstrakti sisaldus katsepudelis (g/l)	9,7	9,7	—
Uuritava kemikaali põhilahuse kogus (ml)	3	3	1
Vedeliku üldmaht (ml)	93	93	—

▼ **M6**

*5. liide*

**Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M6C.35. *LUMBRICULUS*'ELE AVALDUVA MÜRGISUSE HINDAMISE  
KATSE RIKASTATUD SETTEGA SÜSTEEMIS SETE/VESI

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 225 (2007). Põhjasettes elavate setet neelavate loomade kokkupuude settes leiduvate kemikaalidega võib olla ulatuslik ja seepärast tuleks neile erilist tähelepanu pöörata (nt allikad 1, 2, 3). Selliste setet neelavate loomade hulka kuuluvad veekeskonna väheharjasussid, kes täidavad olulist rolli veeökosüsteemides esinevas settes. Need loomad võivad sette bioturbatsiooni kaudu ja saakloomaks olles mõjutada olulisel määral asjaomaste kemikaalide biosaadavust muudele organismidele, näiteks põhjatoidulistele kaladele. Erinevalt põhjasette pinnal elavatest organismidest kaevuvad põhjasettes elavad veekeskonna väheharjasussid (nt *Lumbriculus variegatus*) sette sisse ja neelavad sette pinnast sügavamal paiknevaid setteosakesi. Sellest tulenevalt puutuvad kõnealused katseorganismid uuritava kemikaaliga kokku igal võimalikul viisil (nt nahakaudsel kontaktil ja saastunud setteosakeste allaneelamisel, kuid samuti poorides oleva vee ja sette kohal oleva vee kaudu).
2. Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et hinnata põhjasettes elavale väheharjasussile *Lumbriculus variegatus* (Müller) avalduvat mõju pikaajalisel kokkupuutel settes esinevate kemikaalidega. Meetod põhineb olemasolevatel sette mürgisuse ja bioakumuleerumise hindamise meetoditel (nt allikad 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Selles käsitletakse staatilisi katsetingimusi. Käesolevas katsemeetodis kasutatakse kokkupuute saavutamiseks sette rikastamist uuritava kemikaaliga. Rikastatud sette kasutamisega jälgendatakse sette saastumist uuritava kemikaaliga.
3. Kemikaalid, mille mõju settes elavatele organismidele on vaja hinnata, säilivad selles keskkonnas tavaliselt pikka aega. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga kokku puutuda mitmel viisil. Iga kokkupuuteviisi suhteline tähtsus ja üldisse mürgisesse mõjusse panuse andmiseks kuluv aeg sõltub asjaomase kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest ja säilivusest looma organismis. Tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide (näiteks kemikaalid, mille  $\log K_{ow} > 5$ ) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate kemikaalide puhul võib üks oluline kokkupuuteviis olla saastunud toidu allaneelamine. Et selliste kemikaalide mürgisust mitte alahinnata, lisatakse katseorganismide paljunemiseks ja kasvamiseks vajalik sööt settele enne uuritava kemikaaliga töötlemist (11). Kirjeldatav katsemeetod on katse tegemiseks piisavalt üksikasjalik, kuid võimaldab samal ajal kohandada katseplaani vastavalt tingimustele igas konkreetses laboris ja lähtuvalt uuritavate kemikaalide omadustest.
4. Katsemeetodiga hinnatakse uuritava kemikaali mõju katseorganismide paljunemisele ja biomassile. Katses mõõdetavad bioloogilised näitajad on ellujäänud usside üldarv ja biomass (kuivmass) kokkupuuteperioodi lõpus. Nende andmete analüüsimiseks kasutatakse kas regressioonimudelit, et leida hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on  $x\%$  (nt  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  või  $EC_{10}$ ), või statistilise hüpoteesi kontrollimist, et määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon.
5. Paljud olulised ja kasulikud üksikasjad sette mürgisuse hindamist käsitleva käesoleva katsemeetodi väljatöötamiseks pärinevad käesoleva lisa peatükist C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega” (6). See peatükk võeti seega aluseks ning seda muudeti vajalikul viisil, et kohandada seda sette mürgisuse hindamise katsete tegemiseks *Lumbriculus variegatus*'ega. Peale selle osutatakse muudele dokumentidele, mille hulgas on näiteks USA Materjalide Katsetamise Ühingu dokument „Standard guide

▼ **M6**

for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates” (3), USA Keskkonnakaitseameti dokument „Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates” (7) ja USA Materjalide Katsetamise Ühingu dokument „Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates” (12). Lisaks on käesoleva meetodi väljatöötamisel kasutatud olulise teabeallikana katsemeetodi valideerimiseks tehtud võrdlusuuringust (allikas 13: võrdlusuuringu aruanne) saadud praktilisi kogemusi ja kirjanduse andmeid.

## NÕUTAV TEAVE JA ABITEAVE

6. Enne katse alustamist peaksid uuritava kemikaali kohta olema teada näiteks asjakohased ohutusabinõud, sobivad säilitustingimused ja analüüsimeetodid. Juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused muudavad katse tegemise raskeks, on esitatud allikas 14.
7. Enne katse alustamist peaksid uuritava kemikaali kohta olema teada järgmised andmed:
  - tavanimetus, keemiline nimetus (soovitavalt IUPACi nimetus), struktuurivalem, CASi registrinumber, puhtus;
  - aururõhk;
  - lahustuvus vees.
8. Lisaks on enne katse alustamist kasulik teada järgmisi andmeid:
  - jaotuskoefitsient süsteemis oktaanool/vesi ( $K_{ow}$ );
  - jaotuskoefitsient süsteemis orgaaniline süsinik/vesi ( $K_{oc}$ );
  - hüdrofüüsi andmed;
  - andmed fotokeemilise muundumise kohta vees;
  - biolagunduvuse andmed;
  - pindpinevus.
9. Enne katse alustamist peaksid olema teada ka kasutatava sette teatavad omadused (7). Üksikasjad on esitatud punktides 22–25.

## KATSE PÕHIMÕTE

10. Sarnases füsioloogilises seisundis ussid (sünkroonitud vastavalt 5. liites kirjeldatule) viiakse kokkupuutesse mürgise kemikaaliga, millega on eri kontsentratsioonides töödeldud setefaasi süsteemis sete/vesi. Katsekeskkonnana tuleks kasutada kunstlikku setet ja taastatud vett. Kontrollina kasutatakse katsenõusid, millesse ei lisata uuritavat kemikaali. Uuritav kemikaal lisatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse enne sette nõudesse jaotamist, et varieeruvus igale kontsentratsioonile vastavate paralleelnõude vahel oleks minimaalne, ning seejärel lisatakse katseorganismid katsenõudesse, milles kemikaal on saavutanud settes ja vees tasakaalukontsentratsiooni (vt punkt 29). Katseloomadel lastakse süsteemiga sete/vesi kokku puutuda 28 päeva vältel. Tulenevalt kunstliku sette väikesest toitainesisaldusest tuleks settele lisada sööta (vt punktid 22–23 ja 4. liide), et tagada usside kasvamine ja paljunemine kontrolltingimustes. Sel viisil tagatakse, et katseloomad puutuvad kemikaaliga kokku nii vee ja sette kui ka toidu kaudu.
11. Seda tüüpi katse puhul on soovitatav lõppnäitaja nii sigivuse kui ka biomassi puhul  $EC_x$  (nt  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  või  $EC_{10}$ ; kontsentratsioon, mille puhul mõju avaldub x protsendile organismidest), mis leitakse võrdluses kontrollrühma andmetega. Tuleks siiski märkida, et arvestades väiksemat



▼ **M6**

mõju väljendava  $EC_x$  (nt  $EC_{10}$ ,  $EC_{25}$ ) väikest täpsusastet, mille puhul usaldusvahemik usaldusnivool 95 % on äärmiselt lai (nt allikas 15) ja hüpoteesi kontrollimise käigus arvatud statistiline võimsus on väike, loetakse kõige usaldusväärsemaks lõppnäitajaks  $EC_{50}$ . Peale selle võib juhusl, kui katseplaani ja andmed seda võimaldavad, nii sigivuse kui ka biomassi puhul arvutada tähtsamat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni ja vähima tähtsamat toimet avaldava kontsentratsiooni (vt punktid 34–38). Katseplaani koostamisel lähtutakse katse eesmärgist: kas soovitakse määrata  $EC_x$  või tähtsamat toimet mitteavaldav kontsentratsioon.

**VÖRDLUSKATSED**

12. Kontrollrühma organismidega saadud tulemused on eeldatavalt piisav tõendus labori võimekusest kõnealust katset läbi viia ja varasemate andmete olemasolu korral ka tõendus katse korratavuse kohta. Peale selle võib teha korrapäraselt mürgisuse võrdluskatseid, kasutades katseorganismide tundlikkuse hindamiseks mürgist võrdluskemikaali. Katseloomade tundlikkuse ja seisundi rahuldavaks hindamiseks sobib 96 h pikkune mürgisuse võrdluskatse, mis tehakse üksnes vees (4, 7). Teave pentaklorofenooli mürgisuse kohta täismahus katses (28 päeva pikkune kokkupuude rikastatud settega) on esitatud 6. liites ja käesolevat katsemeetodit käsitleva võrdlusuuringu aruandes (13). Pentaklorofenooli ägedat mürgisust üksnes vees kirjeldatakse näiteks allikas 16. Seda teavet saab kasutada katseorganismide tundlikkuse võrdlemiseks võrdluskatsetes, kus mürgise võrdluskemikaalina kasutatakse pentaklorofenooli. *L. variegatus*'e puhul on soovitatud kasutada mürgise võrdluskemikaalina kaaliumkloriidi (KCl) või vasksulfaati ( $CuSO_4$ ) (4, 7). KCl mürgisust käsitlevate andmete põhjal kvaliteedikriteeriumide kehtestamine on raske, kuna praegu puuduvad kirjanduse andmed *L. variegatus*'e kohta. Teave vase mürgisuse kohta *L. variegatus*'ele on esitatud allikates 17–21.

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

13. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised kriteeriumid.
  - Võrdlusuuringust (13) nähtub, et *Lumbriculus variegatus*'e puhul peaks elus usside keskmine arv kontrollrühma paralleelnõu kohta suurenema kokkupuuteperioodi algusega võrreldes kokkupuuteperioodi lõpuks vähemalt 1,8 korda.
  - Sette kohal oleva vee pH jääb kogu katse vältel vahemikku 6–9.
  - Hapnikusisaldus sette kohal olevas vees ei tohiks katse vältel olla väiksem kui 30 % õhu küllastuskontsentratsioonist katsetemperatuuril.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Katsesüsteem**

14. Soovitatakse kasutada staatilist süsteemi, mille puhul sette kohal olevat vett ei uuendata. Sette ja vee sobiva vahekorra puhul (vt punkt 15) piisab tavaliselt kergest aereerimisest, et säilitada katseorganismidele vastuvõetav vee kvaliteet (nt tagada võimalikult suur lahustunud hapniku sisaldus ja võimalikult vähene väljahoidete kuhjumine). Poolstaatilist või läbivooluga süsteemi, mille puhul sette kohal olevat vett perioodiliselt või pidevalt uuendatakse, tuleks kasutada üksnes erandjuhul, kuna vee korrapärane uuendamine mõjutab eeldatavalt kemikaali tasakaalukontsentratsiooni (nt põhjustab kemikaali kadu katsesüsteemist).

**Katsenõud ja seadmed**

15. Katse läbiviimiseks tuleks kasutada keeduklaase, näiteks mahuga 250 ml ja diameetriga 6 cm. Võib kasutada muid sobivaid klaasnõusid, kui nende puhul tagatakse sette ja selle kohal oleva vee piisav sügavus. Igasse nõusse

**▼ M6**

tuleks kanda umbes 1,5–3 cm paksune kiht valmistatud setet. Settekihi paksuse ja selle kohal oleva veekihi paksuse suhe peaks olema 1:4. Nõude maht peaks vastama asustamistihedusele, st sette massiühiku kohta lisatavale katseusside arvule (vt ka punkt 39).

16. Katsenõud ja muud seadmed, mis puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaksid olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Tuleks hoolikalt jälgida, et seadmete üheski osas ei kasutataks materjale, mis võivad lahustuda, uuritavat kemikaali absorbeerida või muid kemikaale eraldada ning katseloomadele kahjulikku mõju avaldada. Katse kasvukeskkonnaga kokku puutuvates seadmetes tuleks kasutada polütetrafluoroetüleen, roostevaba terast ja/või klaasi. Orgaaniliste kemikaalide puhul, mis teadaolevalt adsorbeeruvad klaasile, võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellisel juhul tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata.

**Katseliik**

17. Siin kirjeldatud tüüpi katses kasutatav katseliik on magevee väheharjasuss *Lumbriculus variegatus* (Müller). See liik on tolerantne paljude eri tüüpi setete suhtes ning seda kasutatakse laialdaselt sette mürgisuse ja bioakumuleerumise hindamise katsetes (nt allikad 3, 5, 7, 9, 13, 15, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Tuleks esitada teave katseloomade päritolu, liigi kinnitava määramise (nt allikas 36) ja kultiveerimistingimuste kohta. Liigi määramine iga katse eel ei ole vajalik, kui katseorganismid pärinevad kohapealsest kultuurist.

**Katseorganismide kultiveerimine**

18. Sette mürgisuse hindamise katse jaoks piisava arvu usside saamiseks on kasulik säilitada usse alalises laborikultuuris. *Lumbriculus variegatus*'e laborikultuuris kasvatamise meetodeid käsitlevad juhised ja lähtekultuuride allikad on esitatud 5. liites. Üksikasjalik teave selle liigi kultiveerimise kohta on esitatud allikates 3, 7 ja 27.
19. On tungivalt soovitatav luua ühte liiki sisaldav kultuur, mis võimaldab tagada, et katsed viiakse läbi sama liigi loomadega. Veendutakse, et kultuuris ja eelkõige katsete jaoks kasutatavatel ussidel ei esine nähtavaid haigustunnuseid ega hälbeid.

**Vesi**

20. Katses soovitatakse sette kohal oleva veena kasutada käesoleva lisa peatükis C.1 kirjeldatud taastatud vett; seda võib kasutada ka usside laborikultuuri puhul (selle valmistamist kirjeldatakse 2. liites). Vajaduse korral võib kasutada looduslikku vett. Kasutamiseks valitud vesi peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseloomadel nii kohanemis- kui ka katseperioodi vältel selles kasvada ja paljuneda, ilma et nende välimus või käitumine muutuks ebanormaalseks. On tõendatud, et *Lumbriculus variegatus* suudab kõnealusel taastatud vees elada, kasvada ja paljuneda (30), ning selline vesi võimaldab katse- ja kultiveerimistingimusi maksimaalselt standardiseerida. Taastatud vee kasutamise korral tuleks esitada selle koostis ning enne kasutamist tuleks määrata vähemalt selle pH, hapnikusisaldus ja karedus (väljendatuna CaCO<sub>3</sub> sisaldusena milligrammides liitri kohta). Kasulikku teavet võib anda ka vee kasutuseelne analüüsimine mikrosasteainete suhtes (vt nt 3. liide).
21. Sette kohal oleva vee pH peaks jääma vahemikku 6,0–9,0 (vt punkt 13). Kui võib eeldada, et tekib suurem kogus ammoniaaki, peetakse otstarbekaks hoida pH väärtus vahemikus 6,0–8,0. Kui katses hinnatakse näiteks nõrka orgaanilist hapet, on soovitatav kasutada pH reguleerimiseks katses kasutatava vee puhverdamist, näiteks allikas 16 kirjeldatud viisil. Katses kasutatava vee üldkaredus peaks jääma loodusliku vee puhul vahemikku 90–300 mg CaCO<sub>3</sub> liitri kohta. OECD juhendi nr 210 (38) kohased lahjendusvee vastuvõetavuse lisakriteeriumid on kokkuvõtlikult esitatud 3. liites.

▼ **M6****Sete**

22. Kuna ühest konkreetsest allikast pärit saastumata looduslik sete ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ning selles looduslikult esinevad organismid ja võimalikud mikroaastained võivad mõjutada katsetulemusi, tuleks soovitatavalt kasutada valmistatud setet (tuntud ka kui taastatud, kunstlik või sünteetiline sete). Valmistatud sette kasutamisega minimeeritakse katsetingimuste varieeruvus ja looduslikus settes eluneva fauna esinemise võimalus. Allpool kirjeldatud valmistatud sette puhul on lähtutud allikate 6, 39 ja 40 kohasest kunstlikust settest. Seda soovitatakse kasutada siin kirjeldatud tüüpi katse puhul (6, 10, 30, 41, 42, 43).
- a) 4–5 % (kuivmass) turbasamblaturvast; on oluline kasutada keskmise lagunemistasemega, üksnes õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud pulbrilist turvast osakeste suurusega  $\leq 0,5$  mm.
  - b)  $20 \pm 1$  % (kuivmass) kaoliinsavi (soovitav kaoliniidisisaldus üle 30 %).
  - c) 75–76 % (kuivmass) kvartsiiva (peen liiv tera suurusega  $\leq 2$  mm, kusjuures  $> 50$  % osakestest peaks olema vahemikus 50–200  $\mu\text{m}$ ).
  - d) Sette kuivadele koostisosadele lisatav deioniseeritud vesi, 30–50 % sette kuivmassist.
  - e) Lõpliku settesegu pH reguleerimiseks lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ( $\text{CaCO}_3$ ).
  - f) Lõpliku segu orgaanilise süsiniku üldsisaldus peaks olema  $2 \pm 0,5$  % sette kuivmassist ja selle reguleerimiseks tuleks kasutada sobivas koguses alapunktide a ja c kohast turvast ja liiva.
  - g) Sette kuivadele koostisosadele lisatav sööt, näiteks farmaatsiastandarditele vastavad inimtarbimiseks ette nähtud kõrvenõgese (*Urtica* sp.) pulbristatud lehed või selliste lehtede ja  $\alpha$ -tselluloosi segu (vahekorras 1:1), 0,4–0,5 % sette kuivmassist; üksikasjalik teave on esitatud 4. liites.
23. Turba, kaoliinsavi, söödamaterjali ja liiva päritolu peaks olema teada. Peale alapunktis g nimetatut on käesoleva lisa peatükis C.27 (6) loetletud võimaliku muu kasutatava toiteallikana järgmine taimne materjal: mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) või orase kuivatatud lehed.
24. Valitud sööt tuleks lisada settele enne uuritava kemikaali lisamist või sellega samaaegselt. Valitud sööt peaks tagama vähemalt vastuvõetava sigivuse kontrollrühmas. Kasulikku teavet võib anda kunstliku sette või selle koostisosade analüüsimine mikroaastainete suhtes. Kunstliku sette valmistamise näide on esitatud 4. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast vee lisamist settele ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste kerkimine veepinnale) ja et turvas või sete on ümbritseva keskkonna tingimustes piisavalt tasakaalustunud (vt ka punkt 25 ja 4. liide). Kunstliku sette iseloomustamiseks tuleks esitada vähemalt selle koostisosade päritolu, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsentuaalne sisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus, veesisaldus ja pH. Redokspotentsiaali mõõtmine ei ole kohustuslik.
25. Vajaduse korral, näiteks kui katse spetsiifika seda nõuab, võib katse- ja/või kultiveerimissettena kasutada ka saastevabast allikast pärit looduslikku setet (3). Loodusliku sette kasutamisel tuleks esitada vähemalt selle päritolu (kogumiskoht), poorides oleva vee pH ja ammoniaagisisaldus, orgaanilise

▼ **M6**

süsiniku ja lämmastiku üldsisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsentuaalne sisaldus) ja vee protsentuaalne sisaldus (7) ning selline sete ei tohiks olla saastunud ega sisaldada katseorganismidega konkureerida või neist toituda võivaid muid organisme. Redokspotentsiaali ja katioonivahetusmahtuvuse mõõtmine ei ole kohustuslik. Looduslikul settel on enne sellele kemikaali lisamist soovitatav lasta seitsme päeva vältel tasakaalustuda samades tingimustes, mida kasutatakse järgneva katse ajal. Selle kohandamisperioodi lõpus tuleks sette kohal olev vesi eemaldada ja ära visata.

26. Kasutatav sete peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab kontrollrühma organismidel kokkupuuteperioodi vältel selles ellu jääda ja paljuneda, ilma et nende välimus või käitumine muutuks ebanormaalseks. Kontrollrühma ussid peaksid settesse kaevuma ja seda alla neelama. Paljunemine kontrollrühmas peaks vastama vähemalt punktis 13 kirjeldatud nõuetekohasuse kriteeriumidele. Tuleks registreerida väljaheitegraanulite esinemine või puudumine sette pinnal – see annab märku sellest, kas ussid neelavad setet, ning võib kokkupuuteviisile osutamise kaudu hõlbustada katsetulemuste tõlgendamist. Sette neelamist käsitleva lisateabe saamiseks võib kasutada allikates 24, 25, 44 ja 45 kirjeldatud meetodeid, milles määratletakse täpsemalt katseorganismide puhul täheldatav sette neelamine või osakeste valimine.
27. Meetodeid loodusliku sette käitlemiseks enne selle laboris kasutamist kirjeldatakse allikates 3, 7 ja 12. *Lumbriculus*'ega tehtava katse jaoks soovitatava kunstliku sette valmistamist ja säilitamist kirjeldatakse 4. liites.

#### Uuritava kemikaaliga töötlemine

28. Uuritav kemikaal lisatakse settesse. Kuna enamik uuritavaid kemikaale on eeldatavalt vees raskesti lahustuvad, tuleks need põhilahuse valmistamiseks lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt atsetoon, *n*-heksaan, tsükloheksaan). Katselahuste valmistamiseks tuleks põhilahust lahjendada sama lahustiga. Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada sama kogust asjaomast lahust. Uuritav kemikaal lisatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse enne sette nõudesse jaotamist, et kemikaalisisalduse varieeruvus paralleelnõude vahel oleks minimaalne. Iga katselahus segatakse kvartsliiivaga, nagu on kirjeldatud punktis 22 (nt 10 g kvartsliiiva katsenõu kohta). On leitud, et kvartsliiiva täielikuks küllastamiseks piisab 0,20–0,25 ml lahusest grammi liiva kohta. Seejärel tuleb lahustil lasta aurustuda, kuni liiv on kuiv. Uuritava kemikaali samaaegselt aurustumisest tuleneva (nt kemikaali aururõhust sõltuva) kao minimeerimiseks tuleks kemikaaliga kaetud liiva kasutada vahetult pärast kuivatamist. Iga asjaomase kontsentratsiooni puhul segatakse kuiv liiv sobiva koguse valmistatud settega. Sette valmistamisel tuleks arvesse võtta uuritava aine ja liiva seguna lisatavat liivakogust (st sette valmistamisel kasutatav liivakogus peaks olema selle võrra väiksem). Selle meetodi peamine eelis on see, et settesse ei viida praktiliselt üldse lahustit (7). Teise võimalusena võib näiteks loodusliku sette puhul kasutada uuritava kemikaali lisamiseks eespool kirjeldatud viisil kvartsliiiva asemel teatud osa settest, mis on kuivatatud ja peeneks jahvatatud, või segada uuritava kemikaali märja settega ja lasta kasutatud lahustil seejärel aurustuda. Tuleks jälgida, et settele lisatav uuritav kemikaal seguneks settega põhjalikult ja jaotuks selles ühtlaselt. Vajaduse korral võib kemikaali soovitud sisaldust settes ja selle jaotumise homogeensust kontrollida osaproovide analüüsimise teel. Kemikaali soovitud sisaldust settes võib olla kasulik kontrollida ka katselahuste osaproovide analüüsimise teel. Kuna

▼ **M6**

kvartsiiva katmiseks uuritava kemikaaliga kasutatakse lahustit, tuleks valmistada ka lahustiga kontrollproovid, millesse lisatakse samas koguses lahustit kui uuritava kemikaaliga proovidesse. Katseprotokolli tuleks märkida rikastamiseks kasutatud meetod ja eespool kirjeldatutest erineva muu meetodi kasutamise korral selle valimise põhjendus. Rikastamismeetodit võib kohandada vastavalt uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistele omadustele, näiteks selleks, et hoida ära lendumisest tulenevat kadu kemikaali lisamise või tasakaalustamise ajal. Rikastamismeetodeid käsitlevad lisajuhised on esitatud Environment Canada 1995. aasta dokumendis (46).

29. Pärast rikastatud sette valmistamist, katsenõudesse jaotamist ja katses kasutatava veega katmist on soovitatav lasta uuritaval kemikaalil jaotuda settefaasi ja veefaasi vahel (nt allikad 3, 7, 9). Seda tuleks soovitatavalt teha katsetemperatuuril ja katses kasutatavates aereerimistingimustes. Vajalik tasakaalustamisaeg sõltub settest ja kemikaalist ning võib ulatuda tundidest päevade ja harvadel juhtudel isegi mitme (4–5) nädalani (nt allikad 27, 47). Käesoleva katsemeetodi puhul ei oodata tasakaalu saabumiseni, vaid kasutatakse soovitatavalt tasakaalustusperioodi kestusega 48 tundi kuni 7 ööpäeva. Sellega minimeeritakse uuritava kemikaali lagunemine. Olenevalt katse eesmärgist, näiteks kui soovitakse jäljendada keskkonnatingimusi, võib rikastatud sette tasakaalustus- või vanandamisperiood olla pikem.
30. Tasakaalustusperioodi lõpus tuleks uuritava kemikaali sisalduse analüüsimiseks võtta miinimumnõudena proovid sette koondproovist ja selle kohal olevast veest vähemalt suurimal kasutataval kontsentratsioonil ja ühel väiksemal kontsentratsioonil. Kõnealune uuritava kemikaali analüütiline määramine peaks võimaldama arvutada massibilanssi ja väljendada tulemusi lähtuvalt mõõdetud algkontsentratsioonist. Üldjuhul häirib proovivõtmise süsteemi sete/vesi tasakaalu või hävitab selle. Seepärast ei ole tavaliselt võimalik kasutada sama paralleelproovi nii setteproovi võtmiseks kui ka usside jaoks. Analüüsimiseks tuleb võtta kasutusele sobiva suurusega lisand, mida käideldakse samal viisil ja mis sisaldavad muu hulgas katseorganisme, kuid mida ei kasutata bioloogiliste vaatluste tegemiseks. Selliste nõude suurus valitakse nii, et see võimaldaks võtta asjaomase analüüsimeetodi puhul vajaliku koguse proovi. Proovivõtmist kirjeldatakse üksikasjalikult punktis 53.

**KATSE KÄIK****Eelkatse**

31. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta *Lumbriculus variegatus*'ele puuduvad andmed, võib olla kasulik teha eelkatse, et teha kindlaks lõpliku katse jaoks sobiv kontsentratsioonivahemik ja lõplikus katses kasutatavad optimaalsed tingimused. Selleks kasutatakse uuritava kemikaali laia kontsentratsioonide vahemikku. Ussidel lastakse teatava perioodi vältel (nt 28 päeva jooksul, nagu lõplikus katseski) puutuda kokku uuritava kemikaaliga igal kasutataval kontsentratsioonil, et teha kindlaks lõpliku katse jaoks sobivad kontsentratsioonid; paralleelproove ei ole vaja kasutada. Eelkatse käigus tuleks jälgida usside käitumist ja see registreerida, näiteks kui täheldatakse sette vältimist uuritava kemikaali ja/või sette enda tõttu. Eelkatses ei tohiks kasutada kontsentratsiooni, mis on suurem kui 1 000 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta.

**Lõplik katse**

32. Lõplikus katses tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni, mis on valitud näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmiseks tehtud eelkatse (punkt 31) tulemuste põhjal ja mis vastavad punktides 35, 36, 37 ja 38 kirjeldatule.

▼ **M6**

33. Lisaks uuritava kemikaaliga proovidele kasutatakse katses kontrollproove (nõutav paralleelproovide arv on esitatud punktides 36, 37 ja 38), mis sisaldavad kõiki koostisosi peale uuritava kemikaali. Kui uuritava kemikaaliga töötlemiseks kasutatakse lahustit, ei tohiks see avaldada katseorganismidele märkimisväärset mõju; selle hindamiseks kasutatakse üksnes lahustiga töödeldud täiendavat kontrolli.

**Katseplaan**

34. Katseplaanis nähakse ette katses kasutatavate kontsentratsioonide arv ja intervall, igal kontsentratsioonil kasutatavate nõude arv ning igasse nõusse lisatavate usside arv. Katseplaan EC<sub>x</sub> ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni hinnangulise väärtuse leidmiseks ning piirsalduskatse tegemiseks kirjeldatakse punktides 35, 36, 37 ja 38.
35. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC<sub>x</sub> (nt EC<sub>50</sub>, EC<sub>25</sub>, EC<sub>10</sub>) väärtust ja kontsentratsioonivahemikku, mille puhul uuritav kemikaal avaldab huvipakkuvat mõju. Tuleks hoiduda ekstrapoleerimisest väärtuseni, mis on oluliselt väiksem kui väikseim kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse mõju katseorganismidele, või suurem kui suurim katses kasutatav kontsentratsioon. Kui sellist ekstrapoleerimist erandjuhul siiski kasutatakse, tuleb katseprotokollis esitada selle kohta ammendav selgitus.
36. Kui soovitakse leida EC<sub>x</sub> hinnanguline väärtus, tuleks katses kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja iga kontsentratsiooni kohta vähemalt kolme paralleelproovi; kontrollrühmas esineva varieeruvuse täpsemaks hindamiseks soovitatakse kontrollproovide puhul ja lahusti kasutamise korral ka lahustiga kontrollproovide puhul kasutada kuut paralleeli. Usaldusväärse mudelipõhise hinnangulise väärtuse saamiseks on kõikidel juhtudel soovitatav kasutada piisavat arvu katsekontsentratsioone. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui kaks (erandi võib teha juhul, kui kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera tõus on lauge). Paralleelproovide arvu igal kontsentratsioonil võib vähendada, kui suurendatakse selliste katsekontsentratsioonide arvu, mille puhul mõju ulatus on 5–95 %. Paralleelproovide arvu suurendamise või katsekontsentratsioonide intervalli vähendamise korral muutub usaldusvahemik tavaliselt kitsamaks.
37. Kui soovitakse leida vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon või täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni, tuleks kasutada vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja iga kontsentratsiooni kohta vähemalt nelja paralleelproovi (kontrollrühmas esineva varieeruvuse täpsemaks hindamiseks soovitatakse kontrollproovide puhul ja lahusti kasutamise korral ka lahustiga kontrollproovide puhul kasutada kuut paralleeli) ning kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui kaks. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.
38. Kui võib eeldada (nt kontsentratsioonivahemiku leidmiseks tehtud eelkatse põhjal), et kemikaal ei avalda kuni kontsentratsioonini 1 000 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta mingit mõju, või kui ühest kontsentratsioonist piisab huvipakkuva täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks, võib teha piirsalduskatse, mis hõlmab ühte katsekontsentratsiooni ja kontrollproove. Sellisel juhul tuleks katseprotokollis esitada piirkontsentratsiooni valimise üksikasjalik põhjendus. Piirsalduskatse eesmärk on määrata kontsentratsioon, mis on piisavalt suur, et võimaldada otsustajatel välistada kemikaali võimalik mürgine mõju, ning piirsaldusena sätestatakse kontsentratsioon, mida eeldatavalt üheski olukorras ei saavutata. Soovitatakse kasutada kontsentratsiooni 1 000 mg kuivmassi kilogrammi kohta. Tavaliselt on nii uuritava kemikaaliga rühmas kui ka kontrollrühmas vaja kasutada vähemalt kuut paralleelproovi. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.

**Kokkupuutetingimused***Katseorganismid*

39. Katses kasutatakse iga bioloogiliste näitajate määramiseks kasutatava proovi kohta vähemalt 10 ussi. See vastab umbes 50–100 milligrammile märjale biomassile. Kuivmassi eeldatava 17,1-protsendilise osakaalu puhul (48) vastab see umbes 9–17 milligrammile kuivale biomassile nõu kohta. USA Keskkonnakaitseameti 2000. aasta dokumendis (7) soovitatakse kasutada

▼ **M6**

usside kogust, mille puhul kuiva biomassi ja orgaanilise süsiniku üldsisalduse vahekord ei oleks suurem kui 1:50. Punktis 22 kirjeldatud valmistatud sette puhul vastab see 2,0-protsendilise orgaanilise süsiniku üldsisaldusega sette kuivmassile umbes 43 grammi 10 ussi kohta. Kui kasutatakse rohkem kui 10 ussi nõu kohta, tuleks sette ja selle kohal oleva vee kogust vastavalt suurendada.

40. Kõik samas katses kasutatavad ussid peaksid olema sama päritoluga ja sarnases füsioloogilises seisundis (vt 5. liide). Tuleks valida umbes ühesuurused ussid (vt punkt 39). Enne katse algust soovitatakse võtta kaalumiseks usside partiist või tüvikultuurist osaproov, et hinnata usside keskmist kaalu.
41. Katses kasutatavad ussid eemaldatakse kultuurist (üksikasjalik teave on esitatud 5. liites). Suured (täiskasvanud) loomad, kellel ei täheldata hiljutise fragmenteerumise märke, viiakse puhast vett sisaldavatesse klaasnõudesse (nt Petri tassidesse). Seejärel usside elutegevus sünkronitakse, nagu on kirjeldatud 5. liites. Pärast 10–14 ööpäeva kestvat regenererumist tuleks katse jaoks valida sarnase suurusega terved täispikad ussid, kes reageerivad nõrgale mehaanilisele ärritajale aktiivse ujumise või roomamisega. Kui katsetingimused erinevad kultiveerimistingimustest (nt temperatuuri, valgusrežiimi või sette kohal oleva vee omaduste poolest), peaks usside kohandamiseks katsetingimustega piisama näiteks 24 tunni pikkusest kohanemisperioodist katses kasutataval temperatuuril ja valgusrežiimil ning samas vees, mida kasutatakse katses. Katsetingimustega kohanenud väheharjasussid tuleks juhuslikkuse alusel katsenõudesse jaotada.

*Söötmine*

42. Ussidele ei anta katse käigus lisasööta, kuna sööt lisatakse settele juba enne uuritava kemikaaliga töötlemist või sellega samaaegselt.

*Valgus ja temperatuur*

43. Valgustusperiood on kultuuris ja katse vältel tavaliselt 16 tundi (3, 7). Tuleks kasutada väikest valgustihedust (nt 100–500 luksit), et jälgendada settepinnale iseloomulikke looduslikke tingimusi, ning selle väärtust tuleks kokkupuuteperioodi vältel mõõta vähemalt ühel korral. Temperatuur peaks olema kogu katse vältel  $20 \pm 2$  °C. Samal temperatuuri mõõtmise päeval ei tohiks katsenõude vaheline temperatuurierinevus olla suurem kui  $\pm 1$  °C. Katsenõude paigutus inkubaatoris või katsepinnal peaks olema juhuslik, näiteks selleks, et minimeerida nõude paigutusest tulenevaid erinevusi sigivuse määras.

*Aereerimine*

44. Katsenõudes sette kohal olevat vett tuleks kergelt aereerida (nt 2–4 mulli sekundis), kasutades Pasteuri pipetti, mis jääb settepinnast umbes 2 cm kõrgusele, et setet võimalikult vähe häirida. Tuleks jälgida, et lahustunud hapniku sisaldus ei langeks alla 30 % õhu küllastuskontsentratsioonist. Õhu juurdevoolu tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida tööpäeviti vähemalt kord päevas.

**Veekvaliteedi mõõtmine**

45. Sette kohal asuvas vees tuleks määrata järgmised veekvaliteedi näitajad.

Temperatuur:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta; peale selle võib võimaluse korral mõõta näiteks iga tunni järel ümbritseva keskkonna (õhu või veevanni vee) temperatuuri.
--------------	---

▼ **M6**

Lahustunud hapniku sisaldus:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta; väljendatakse milligrammides liitri kohta ja protsentuaalse osakaaluna õhu küllastuskontsentratsioonist.
Õhu juurdevool:	tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida tööpäeviti vähemalt kord päevas.
pH:	kord nädalas ning kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes katsenõus iga kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta.
Vee üldkaredus:	kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt ühes kontrollrühma paralleelnõus ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus; väljendatakse CaCO <sub>3</sub> sisaldusena milligrammides liitri kohta.
Ammoniaagi üldsisaldus:	kokkupuuteperioodi alguses ja seejärel 3 korda nädalas vähemalt ühes kontrollrühma paralleelnõus ja ühes katsenõus iga kontsentratsiooni kohta; väljendatakse NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> või NH <sub>3</sub> sisaldusena või ammoniaaklämmastiku üldsisaldusena milligrammides liitri kohta.

Kui veekvaliteedi näitajate mõõtmiseks on vaja nõudest eemaldada märkimisväärses koguses vett, võib olla soovitatav kasutada veekvaliteedi mõõtmiseks eraldi nõusid, et vee ja sette ruumalasuhe jääks muutumatuks.

**Bioloogilised vaatlused**

46. Katsenõusid tuleks kokkupuuteperioodi vältel jälgida, et hinnata visuaalselt muutusi usside käitumises, võrrelduna käitumisega kontrollrühmas (nt sette vältimine, nähtavad väljaheitegraanulid settepinnal). Vaatluste tulemused tuleks registreerida.
47. Katse lõpus hinnatakse tulemusi igas paralleelnõus (keemiliseks analüüsiks ette nähtud lisanõud võib vaatluse alt välja jätta). Katsenõust usside eemaldamiseks tuleks kasutada sobivat meetodit. Tuleks jälgida, et ükski uss ei saaks eemaldamise käigus vigastada. Üks võimalik meetod on usside väljasõelumine settest. Selleks võib kasutada sobiva ava suurusega roostevabast terasest sõela. Enamik sette kohal olevast veest kallatakse ettevaatlikult ära ning allesjäänud setet ja vett loksutatakse, et tekiks suspensioon, mille saab läbi sõela lasta. Kui kasutatakse sõela, mille ava suurus on 500 µm, läbib valdav osa setteosakestest sõela väga kiiresti, kuid sõelumine tuleks kiiresti lõpule viia, et hoida ära usside roomamist sõela sisse või läbi selle. Kui kasutatakse sõela, mille ava suurus on 250 µm, ei rooma ussid sõela sisse ega sellest läbi, kuid tuleks jälgida, et sõelale jääks võimalikult vähe setteosakesi. Igast paralleelnõust pärit sõelutud suspensiooni võib veel teist korda läbi sõeluda, et tagada kõikide usside eemaldamine. Teise võimalusena võib kasutada meetodit, mille puhul katsenõud paigutatakse sette soojendamiseks veevanni, mille temperatuur on 50–60 °C; ussid lahkuvad settest ja need saab leegis töödeldud laia suuga pipeti abil settepinnalt kokku koguda. Veel ühe võimaliku meetodina võib tekitada settesuspensiooni ja kallata selle sobiva suurusega madalasse kaussi. Ussid saab madalast suspensioonikihist välja korjata, kasutades terasõela või kellasepapintsette (neid kasutatakse pigem kahvlina kui tangidena, et hoida ära usside vigastamist), ning puhtasse vette paigutada. Pärast usside eraldamist settesuspensioonist loputatakse neid katselahusega ja ussid loendatakse.
48. Tuleks tõendada, et labori töötajad on kasutatavast meetodist olenemata võimelised saama kätte vähemalt 90 % kõigist settes leiduvatest organismidest.



**▼M6**

Näiteks võib kontrollrühmas või katserühmas kasutatavale settele lisada teatud kindla arvu katseorganisme ja määrata 1 tunni pärast kättesaadud usside osakaalu (7).

49. Tuleks määrata ja registreerida elus ja surnud isendite üldarv paralleelnõu kohta. Surnuks loetakse ussid, kes kuuluvad ühte järgmistest rühmadest:

- a) ussid, kes ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale;
- b) ussid, kellel täheldatakse lagunemise tundemärke (koos alapunktis a kirjeldatuga);
- c) puuduvad ussid.

Elus ussid võib jagada järgmisse kolme rühma:

- a) suured (täiskasvanud) terviklikud ussid, kellel puuduvad regenereerunud kehapiirkonnad;
- b) terviklikud ussid, kellel esineb heledamaid regenereerunud kehapiirkondi (st ussid, kellel on uus eesosa, uus tagaosas või nii üks kui ka teine);
- c) ussid, kes ei ole terviklikud (st äsja fragmenteerunud ussid, kellel puuduvad regenereerunud kehapiirkonnad).

Kõnealuste lisatähelepanekute tegemine ei ole kohustuslik, kuid neid saab kasutada bioloogiliste vaatluste täpsemaks tõlgendamiseks (näiteks võib rühma c kuuluvate usside suur arv viidata tavapärasest hilisemale paljunemisele või regenereerumisele asjaomase kemikaaliga nõudes). Peale selle tuleks registreerida kõik kemikaaliga kokku puutuvate usside välimuses täheldatavad erinevused kontrollrühma usside välimusega võrreldes (nt nahakahjustuste või turses kehapiirkondade esinemine).

- 50. Igast paralleelnõust leitud elus ussid asetatakse kohe pärast loendamist/hindamist eelnevalt kaalutud kuivale märgistatud kaalukausile (üks iga paralleelproovi kohta) ning ussid surmatakse ühe tilga etanooliga kaalukausi kohta. Kaalukausid pannakse kuivatuskappi temperatuurile  $100 \pm 5$  °C, ussidel lastakse öö läbi kuivada ning pärast eksikaatoris jahutamist määratakse kaalumise teel usside kuivmass (väljendatuna soovitatavalt grammides täpsusega vähemalt 4 kohta pärast koma).
- 51. Peale üldise kuivmassi võib määrata ka tuhavaba materjali kuivmassi, nagu on kirjeldatud allikas 49, et võtta arvesse usside seedekulgla olevast alla-neelatud settest pärit anorgaanilisi koostisaineid.
- 52. Arvutatav biomass on määratletud kui täiskasvanud ja noori usse hõlmav üldine biomass paralleelproovi kohta. Paralleelproovi biomassi määramisel ei tohiks võtta arvesse surnud usse.

**Uuritava kemikaali sisalduse kontrollimine***Proovide võtmine*

- 53. Proovid uuritava kemikaali keemilise analüüsi tegemiseks tuleks võtta vähemalt suurimal kasutataval kontsentratsioonil ja ühel väiksemal kontsentratsioonil vähemalt tasakaalusetapi lõpus (enne katseorganismide lisamist) ja katse lõpus. Analüüsimiseks tuleks proovid võtta vähemalt sette koondproovist ja selle kohal olevast veest. Igal proovivõtukuupäeval tuleks võtta vähemalt kaks proovi analüüsitava keskkonna ja kontsentratsiooni kohta. Ühte kahest proovist võib säilitada varuproovina (analüüsitakse juhul, kui algse

▼ **M6**

analüüsi tulemused jäävad väljapoole vahemikku  $\pm 20\%$  nominaalsest sisaldusest). Kemikaali eriomadustest lähtuvalt – näiteks kui kemikaali lagunemine on eeldatavalt kiire – võib analüüsiplaani eksperdihinnangu alusel muuta (nt sagedasem proovivõtt, analüüsimine suuremal arvul kontsentratsioonidel). Sel juhul võib võtta proove ka vahepealsetel proovivõtukuupäevadel (nt kokkupuuteperioodi seitsmendal päeval).

54. Sette kohal olevast veest proovi võtmiseks tuleks vesi ettevaatlikult ära kallata või nõust välja juhtida, et setet võimalikult vähe häirida. Proovi maht tuleks registreerida.
55. Pärast sette kohal oleva vee eemaldamist tuleks sete homogeniseerida ja sobivasse nõusse tõsta. Registreeritakse märja sette kaal.
56. Kui on vaja analüüsida uuritava kemikaali sisaldust ka poorides olevas vees, tuleks homogeniseeritud ja kaalutud setteproovi poorivee eraldamiseks tsentrifugida. Näiteks võib 250-milliliitri mahuga tsentrifugitopsid täita umbes 200 ml märja settega. Seejärel tuleks proove poorivee eraldamiseks ilma filtrimata tsentrifugida näiteks 30–60 minutit kiirendusel  $10\,000 \pm 600$  g temperatuuril, mis ei ületa katses kasutatavat temperatuuri. Pärast tsentrifugimist kallatakse supernatant ära või eemaldatakse pipeti abil, jälgides, et sellesse ei satuks setteosakesi, ning registreeritakse selle maht. Registreeritakse allesjäänud sadenenud sette kaal. Et hõlbustada uuritava kemikaali massibilansi või sisalduse hindamist süsteemis sete/vesi, võib määrata sette kuivmassi igal proovivõtukuupäeval. Mõnel juhul ei pruugi kemikaali sisalduse määramine pooriveses proovi liiga väikese mahu tõttu võimalik olla.
57. Kui proove ei ole võimalik analüüsida kohe, tuleks nende säilitamiseks kasutada sobivat meetodit, näiteks soovitatavaid säilitustingimusi, mille puhul asjaomase uuritava kemikaali lagunemine on minimaalne (nt keskkonnaproove säilitatakse tavaliselt – 18 °C juures pimedas). Teave asjaomase uuritava kemikaali õigete säilitustingimuste, näiteks säilitamise kestuse ja temperatuuri, ekstraheerimismeetodite jms kohta tuleb hankida enne katse alustamist.

*Analüüsimeetod*

58. Kuna uuritava kemikaali määramiseks kasutatava analüüsimeetodi usaldusväärsus sõltub peamiselt meetodi mõõtetäpsusest, kordustäpsusest ja tundlikkusest, tuleb katseliselt kontrollida, kas keemilise analüüsi täpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus vee- ja setteproovides on asjaomase meetodi puhul vähemalt suurimal ja väikseimal kasutataval kontsentratsioonil rahuldav. Samuti kontrollitakse, et uuritav kemikaal ei oleks kontrollnõudes tuvastatav määramispiirist suuremas kontsentratsioonis. Vajaduse korral parandatakse nominaalse sisalduse väärtust vastavalt kvaliteedikontrolli eesmärgil proovile lisatud kemikaali mõõdetud sisaldusele (nt kui mõõdetud sisaldus jääb väljapoole vahemikku 80–120 % lisatud kogusest). Kõiki proove tuleks kogu katse vältel käidelda nii, et saastumine ja uuritava kemikaali kadu (näiteks proovivõtuseadmele adsorbeerumise tõttu) oleks minimaalne.
59. Tuleks registreerida ja esitada uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus, määramispiir ning settes ja vees tuvastamise alampiir.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete töötlemine**

60. Katsest saadavad peamised kohustuslikud statistiliselt hinnatavad uuritavad muutujad on biomass ja usside üldarv paralleelproovi kohta. Peale selle võib hinnata ka sigivust (usside arvu suurenemine) ja kasvu (kuiva biomassi suurenemine). Sellisel juhul tuleks teha kindlaks usside hinnanguline kuivmass kokkupuuteperioodi alguses, näiteks nii, et mõõdetakse katses kasutatavate sünkroonitud usside partiist võetud representatiivse osaproovi kuivmass.

▼ **M6**

61. Ehkki suremust ei kasutata käesoleva katsemetodi puhul lõppnäitajana, tuleks võimaluse korral hinnata siiski ka suremust. Suremuse hindamisel tuleks surnuks lugeda ussid, kes ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale või kellel täheldatakse lagunemise tundemärke, samuti puuduvad ussid. Suremus tuleks vähemalt registreerida ja seda katsetulemuste tõlgendamisel arvesse võtta.
62. Kontsentratsiooni, mille puhul mõju avaldub teatud kindlal määral, tuleks väljendada milligrammides sette kuivmassi kilogrammi kohta. Kui uuritava kemikaali mõõdetud sisaldus settes või settes ja selle kohal olevas vees on kokkupuuteperioodi alguses 80–120 % nominaalsest sisaldusest, võib asjaomast kontsentratsiooni ( $EC_x$ , NOEC või LOEC) väljendada lähtuvalt nominaalsest sisaldusest. Kui mõõdetud sisaldus erineb nominaalsest sisaldusest enam kui  $\pm 20\%$  võrra, tuleks eespool nimetatud asjaomase kontsentratsiooni väljendamisel lähtuda kokkupuuteperioodi alguses mõõdetud algsisaldusest, võttes näiteks arvesse uuritava kemikaali massibilansi katseüsteemis (vt punkt 30). Sellisel juhul saab liseteabe hankimiseks analüüsida põhilahust ja/või töötlemiseks kasutatavaid lahuseid, et veenduda, et katses kasutatavad setteproovid on valmistatud õigesti.

 **$EC_x$** 

63. Punktis 60 kirjeldatud näitajaid iseloomustavad  $EC_x$  väärtused arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt probitanalüüs, logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearmani-Kärberi meetod või lihtne interpoleerimine). Statistilise hindamise juhised on esitatud allikates 15 ja 50.  $EC_x$  leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskvaartusest  $x\%$  moodustav väärtus.  $EC_{50}$  või mõne muu  $EC_x$  arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste ( $\bar{X}$ ) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)**

64. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks NOEC või LOEC, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidenäidena). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid. Et hinnata uuritava kemikaali pärssivat mõju kontrollrühmaga võrreldes, kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (vähiksemamahulist) kontrollimist  $p$  väärtusel  $\leq 0,05$ . Sellekohased näited on esitatud järgmistest punktides. Asjakohaste statistiliste meetodite valimise juhised on esitatud allikates 15 ja 50.
65. Andmete normaaljaotust saab kontrollida näiteks andmete mudeliga sobivuse hindamiseks kasutatava Kolmogorovi-Smirnovi testi, variatsiooniulatuse ja standardhälbe suhtel põhineva testi või Shapiro-Wilki testiga (kahepoolne,  $p \leq 0,05$ ). Hajuvuse homogeensuse kontrollimiseks võib kasutada Cochran'i, Levene'i või Bartlett'i testi (kahepoolne,  $p \leq 0,05$ ). Kui parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, hajuvuse homogeensus) on täidetud, võib kasutada ühepoolset dispersioonanalüüsi ja seejärel mitmese võrdluse teste. Et teha kindlaks, kas kontrollrühm ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonidele vastavad katserühmad on üksteisest oluliselt erinevad ( $p \leq 0,05$ ), võib kasutada paariviisilist võrdlemist (nt Dunnett'i t-testi) või muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditesti (nt Williamsi testi). Et määrata NOEC ja LOEC, tuleks kasutada mitteparameetrilist meetodit (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmille või Jonckheere'i-Terpstra trenditesti).

**Piirsalduskatse**

66. Kui on tehtud piirsalduskatse (kontrollrühma võrdlemine ainult ühele kontsentratsioonile vastava katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tunnuse (usside üldarv ja usside kuivmassina väljendatav biomass) analüüsimiseks kasutada Studenti t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi, näiteks Manni-Whitney U-testi. Teave käesolevat katsemetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvutatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.

**▼ M6**

67. Kontrollrühmade (lahustita ja lahustiga kontrollproovide) vaheliste oluliste erinevuste kindlakstegemiseks võib kummagi kontrollrühma paralleelproove analüüsida piirsalduskatse puhul kirjeldatud viisil. Kui kõnealuste testidega ei tuvastata olulisi erinevusi, võib kõikide lahustita ja lahustiga kontrollproovide andmed ühte koondada. Vastasel juhul tuleks kõikide katserühmade andmeid võrrelda lahustiga kontrollproovide andmetega.

**Tulemuste tõlgendamine**

68. Kui esineb kõrvalekaldeid käesolevast katsemeetodist ja katsekontsentratsioonide puhul jäävad mõõdetud kontsentratsioonid kasutatava analüüsimeetodi määramispiiri lähedale, tuleks olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik. Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist tuleb registreerida.

**Katseprotokoll**

69. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

*— Uuritav kemikaal:*

- kemikaali identifitseerimisandmed (tavanimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sealhulgas puhtus ja kemikaali kvantitatiivse analüüsi meetod; kemikaali päritolu ning lahusti kasutamise korral lahusti identifitseerimisandmed ja kontsentratsioon;
- kõik katse eel kogutud kättesaadavad andmed kemikaali füüsikaliste ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta (nt lahustuvus vees, aururõhk, jaotuskoefitsient mullas (või andmete olemasolu korral settes),  $\log K_{ow}$ , püsivus vees jne).

*— Katseliik:*

- teaduslik nimetus, päritolu, kõik eeltötlused, kohandamine, kultiveerimistingimused jne.

*— Katsetingimused:*

- kasutatud katserežiim (nt staatiline, poolstaatiline või läbivoolurežiim);
- katseplaani (nt katsenõude arv, materjal ja suurus, vee maht nõu kohta (poolstaatilise ja läbivoolurežiimi puhul veekoguse vahetumiskiirus), sette mass ja maht nõu kohta, katse eel ja ajal kasutatavad aereerimistingimused, paralleelproovide arv, usside arv paralleelproovi kohta kokkupuuteperioodi alguses, katsekontsentratsioonide arv, kohandamis-, tasakaalustus- ja kokkupuuteperioodi kestus, proovivõtusaeg);
- settekihi ja selle kohal oleva veekihi paksus;
- uuritava kemikaali eeltötluseks ja proovile lisamiseks kasutatud meetod;
- nominaalsed katsekontsentratsioonid, keemilise analüüsi jaoks proovide võtmise üksikasjalik kirjeldus ja uuritava kemikaali sisalduse määramiseks kasutatud analüüsimeetodid;
- sette omadused vastavalt punktides 24–25 kirjeldatule ja kõik muud mõõtmistulemused; kunstliku sette valmistamine;
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus ja kõik muud mõõtmistulemused) enne katse algust;
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sealhulgas sööda liik, selle valmistamine, kogus ja söötmissrežiim;

**▼ M6**

- valgustustihedus ja valgustusperiood(id);
  - kõik meetodid, mille abil on määratud bioloogilised näitajad (nt katseorganismide proovide võtmine, nende vaatlemine ja kaalumine) ja abiootilised näitajad (nt vee ja sette kvaliteedinäitajad);
  - kõikide keemiliseks analüüsiks võetud proovide maht ja/või kaal;
  - üksikasjalik teave kõikide keemiliseks analüüsiks võetud proovide töötlemise kohta, sealhulgas andmed uuritava kemikaali valmistamise, säilitamise, rikastamise, ekstraheerimise ja analüüsimise meetodite (ja nende täpsuse) kohta ning uuritava kemikaali mõõdetud sisalduse kohta.
- *Tulemused:*
- katsenõudes oleva vee kvaliteet (pH, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, karedus, ammoniaagisisaldus ja kõik muud mõõtmistulemused);
  - sette orgaanilise süsiniku üldsisaldus, kuivmassi ja märgmassi suhe, pH ja kõik muud mõõtmistulemused;
  - katse lõpus igas katsenõus loendatud usside üldarv ning samuti terviklike ja mitteterviklike usside arv, kui see määrati;
  - usside kuivmass igas katsenõus katse lõpus ja kui see määrati, siis ka usside osaproovi kuivmass katse alguses;
  - kõik ebanormaalse käitumise ilmingud kontrollrühmaga võrreldes (nt sette vältimine, väljaheitegraanulite esinemine või puudumine);
  - kõik suremust käsitlevad vaatlustulemused;
  - mürgisuse lõppnäitajate (nt EC<sub>x</sub>, NOEC ja/või LOEC) hinnanguline väärtus ja selle leidmiseks kasutatud statistilised meetodid;
  - nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõikide selliste analüüsitud tulemused, millega määrati uuritava kemikaali kontsentratsioon katsenõus;
  - kõik kõrvalekalded nõuetekohasuse kriteeriumidest.
- *Tulemuste hindamine:*
- tulemuste vastavus punktis 13 loetletud nõuetekohasuse kriteeriumidele;
  - tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

**KIRJANDUS**

- (1) EÜ (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. Euroopa Ühenduste Ametlike Väljaannete Talitus, Luksemburg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.

▼ M6

- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 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. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., ja 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) Käesoleva lisa peatükk C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega”.
- (7) USA Keskkonnakaitseamet (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Teine väljaanne. EPA 600/R-99/064, USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN, märts 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. Aruanne SPE 1/RM/32. Detsember 1997.
- (9) Hill, I. R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (toim.) (1993). Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Seminarilt „SETAC Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment”, 8.–10. november 1993, Renesse, Madalmaad.
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Toim. Streloke, M., ja Köpp, H. Berliin, 1995.
- (11) Riedhammer, C., ja Schwarz-Schulz, B. (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. *J. Soils Sediments* 1: 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. USA Materjalide Katsetamise Ühing, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 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, viies kavand, märts 2003; aruanne EPS 1/RM/.
- (16) Nikkilä, A., Halme, A., ja 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., ja Liu, D. H. W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. Lk 205–215. Väljaandes: Eaton, J. C., Parrish, P. R., ja Hendricks, A. C. (toim.), Aquatic Toxicology. ASTM STP 707. USA Materjalide Katsetamise Ühing.

## ▼ M6

- (18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O., ja 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. *Environ. Toxicol.* 14: 271–278.
- (19) Meyer, J. S., Boese, C. J., ja 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. Phys. C* 133: 99–109.
- (20) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D., ja 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: 1261–1266.
- (21) West, C. W., Mattson, V. R., Leonard, E. N., Phipps, G. L., ja Ankley, G. T. (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiologia* 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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., ja Rowland, C. D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Con. Tox.* 42: 292–302.
- (27) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J., ja 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. Con. Tox.* 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., ja Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 872–885.
- (29) Rodriguez, P., ja Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Väljaandes: Mudroch, A., Azcue, J. M., ja Mudroch, P. (toim.), Manual of bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph., Oehlmann, J., ja Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of <sup>14</sup>C-17 $\alpha$ -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59: 271–280.
- (31) Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., ja Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2000–2007.
- (32) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., ja Nagel, R. (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-Altstoff-V. Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt, Berliin) tellimusel; FKZ 360 12 001, märts 2000.

## ▼ M6

- (33) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Technol.* 32: 1503–1508.
- (34) Dermott, R., ja 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., ja Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Dev. Biol.* 138: 94–103.
- (36) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 22.
- (37) Käesoleva lisa peatükk C.1 „Äge mürgisus kaladele”.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariis.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G., ja Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35: 835–852.
- (40) Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., ja Streit, B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. Environ. Safe.* 39: 10–20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., ja Studinger, G. (1999). Seminar „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.–27.04.1999, Hochheim/Main, Saksamaa. Aruanne teadus- ja arendustegevuse projekti nr 298 67 419 kohta, Umweltbundesamt, Berliin.
- (42) Suedel, B. C., ja Rodgers, J. H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163–1175.
- (43) Naylor, C., ja Rodrigues, C. (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., ja 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., ja 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., ja 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., ja 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.



▼ **M6**

- (50) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, Prantsusmaa.
- (51) Liebig, M., Meller, M., ja Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Veranstaltungen 5/2004: Statusseminar – Sedimentkontakttests. 24.–25. märts 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Saksamaa. Lk 107–119.

**Täiendavad kirjandusallikad statistiliste meetodite kohta**

- Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 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 (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., ja Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11: 714–719; parandus: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1978): 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6: 65–70.
- Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.
- Miller, R. G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons, New York.
- Shapiro, S. S., ja 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.

▼ **M6***1. liide***Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kohandamisperiood** – periood, mille jooksul lastakse sette koostises olevatel mikroobipopulatsioonidel stabiliseeruda ja kõrvaldatakse näiteks sette koostisosadest pärit ammoniaak; see toimub enne settele uuritava kemikaali lisamist. Tavaliselt eemaldatakse kohandamisperioodi lõpus sette kohal olev vesi.

**EC<sub>x</sub>** – settes sisalduva uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul bioloogilisele näitajale avalduva mõju ulatus on kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul X % (nt 50 %).

**Tasakaalustusperiood** – periood, mille jooksul lastakse uuritaval kemikaalil jaotuda tahke faasi, poorivee ja sette kohal oleva vee vahel; see toimub pärast settele uuritava kemikaali lisamist ja enne katseorganismide lisamist.

**Kokkupuuteperiood** – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava kemikaaliga.

**Valmistatud sete** (*ehk taastatud, kunstlik või sünteetiline sete*) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette koostisosade imiteerimiseks.

**Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon** – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali olulist ( $p \leq 0,05$ ) mürgist mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peab kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil avalduv kahjulik mõju. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) on valitud.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ( $p \leq 0,05$ ) mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni.

**Jaotuskoefitsient süsteemis oktaanol/vesi** ( $K_{ow}$ ; *mõnikord kasutatakse ka tähist  $P_{ow}$* ) – *n*-oktaanolis lahustunud kemikaali ja vees lahustunud kemikaali tasakaalukontsentratsioonide suhe, millega iseloomustatakse kemikaali lipofiilsust (käesoleva lisa peatükk A.24). Koefitsienti  $K_{ow}$  või selle logaritmi ( $\log K_{ow}$ ) kasutatakse näitajana, mis võimaldab hinnata kemikaali veeorganismides bioakumuleerumise tõenäosust.

**Jaotuskoefitsient süsteemis orgaaniline süsinik/vesi** ( $K_{oc}$ ) – sette orgaanilise süsiniku fraktsioonis ja selle pinnal esineva kemikaali ning vees lahustunud kemikaali tasakaalukontsentratsioonide suhe.

**Sette kohal olev vesi** – katsenõus setet kattev veekiht.

**Poorivesi** – sette- või mullaosakeste vahelist ruumi täitev vesi.

**Rikastatud sete** – sete, millele on lisatud uuritavat kemikaali.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**▼M6**

## 2. liide

**Soovitatava taastatud vee koostis**

(käesoleva lisa peatüki C.1 (1) põhjal)

a) *Kaltsiumkloriidi lahus*

11,76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

b) *Magneesiumsulfaadi lahus*

4,93 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

c) *Naatriumvesinikkarbonaadi lahus*

2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

d) *Kaaliumkloriidi lahus*

0,23 g  $\text{KCl}$  lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.

Kõik kemikaalid peavad olema analüütilise puhtusastmega.

Destilleeritud või deioniseeritud vee elektrijuhtivus ei tohiks ületada väärtust  $10 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

Võetakse 25 ml iga lahust a–d ja segatakse omavahel ning saadud lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Kaltsiumi- ja magneesiumiioonide summaarne sisaldus sellises lahuses on 2,5 mmol/l.

Kaltsiumi- ja magneesiumiioonide suhe lahuses on 4:1 ning naatriumi- ja kaaliumiioonide suhe 10:1. Kõnealuse lahuse happeneutraliseerimisvõime  $K_{\text{S}4,3}$  on 0,8 mmol/l.

Lahjendusvett aereeritakse seni, kuni saavutatakse hapniku küllastuskontsentratsioon, ning seejärel lastakse sel enne kasutamist umbes kaks ööpäeva aereerimata seista.

## VIIDE

(1) Käesoleva lisa peatükk C.1 „Äge mürgisus kaladele”.

▼ **M6**

## 3. liide

**Nõuetekohase lahjendusvee füüsikalise-keemilised omadused**

Koostisaine	Kontsentratsioon
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 µg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

(OECD 1992. aasta juhendi (1) põhjal)

## VIIDE

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Pariis.

▼ **M6**

## 4. liide

**Soovitatav kunstlik sete – valmistamis- ja säilitamisjuhised****Sette koostisosad**

Koostisosa	Kirjeldus	Protsentuaalne osakaal sette kuivmassist
Turvas	Turbasamblaturvas, keskmise lagunemisastmega, õhu käes kuivatatud, nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud (osakeste suurus $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Kvartslüiv	Tera suurus $\leq 2$ mm, kusjuures $> 50$ % osakestest peaks olema vahemikus 50–200 $\mu\text{m}$	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliiniidisisaldus $\geq 30$ %	$20 \pm 1$
Sööt	<i>Nt pulbristatud nõgeselehed (folia urticae), kõrvenõgese (Urtica dioica) peeneks jahvatatud lehed (osakeste suurus <math>\leq 0,5</math> mm), farmaatsiastandarditele vastavad, inimitarbimiseks ette nähtud; lisatakse kuivale settele</i>	0,4–0,5
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	$2 \pm 0,5$
Kaltsiumkarbonaat	$\text{CaCO}_3$ , pulbristatud, keemiliselt puhas; lisatakse kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Elektrijuhtivus $\leq 10$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; lisatakse kuivale settele	30–50

*Märkus:* Kui võib eeldada, et ammoniaagisisaldus muutub tavapärasest suuremaks – näiteks kui on teada, et uuritav kemikaal pärsib nitrifitseerimist –, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikkast nõgeselehtede pulbrist tselluloosiga (nt keemiliselt puhta pulbrilise  $\alpha$ -tselluloosiga osakeste suurusega  $\leq 0,5$  mm (1, 2)).

**Valmistamine**

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Tõhusa homogenisaatori abil valmistatakse vajaliku koguse turbapulbri suspensioon deioniseeritud vees. Selle suspensiooni pH reguleeritakse  $\text{CaCO}_3$  abil väärtusele  $5,5 \pm 0,5$ . Suspensiooni hoitakse ettevaatlikult segades vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril  $20 \pm 2$  °C, et lasta pH-l ja mikroobipopulatsioonidel stabiliseeruda. Pärast seda määratakse pH uuesti; see peaks olema  $6,0 \pm 0,5$ . Seejärel segatakse turbasuspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH määratakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil väärtusele 6,5–7,5. Kui võib eeldada ammoniaagi teket, võib olla otstarbekas hoida sette pH väärtus alla 7,0 (nt vahemikus 6,0–6,5). Settest võetakse proovid kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks. Kui võib eeldada ammoniaagi teket, võib valmistatud setet hoida enne uuritava kemikaali lisamist seitse ööpäeva samades tingimustes, mida kasutatakse järgnevas katses (nt sette ja vee suhe 1:4, settekihi paksus sama kui katsenõudes), st sete

**▼ M6**

tuleks katta veekihiga, mida tuleks aereerida. Selle kohandamisperioodi lõpus tuleks sette kohal olev vesi eemaldada ja ära visata. Seejärel segatakse iga kontsentratsiooni puhul settesse uuritavat kemikaali sisaldav kvartslüü, sete jaotatakse katses kasutatavatesse paralleelrühadesse ja kaetakse katseveega. Nõusid inkubeeritakse samades tingimustes, mida kasutatakse järgnevas katses. Sellega algab tasakaalustusperiood. Sette kohal olevat vett tuleks aereerida.

Valitud sööt tuleks lisada settele enne uuritava kemikaali lisamist või sellega samaaegselt. Sööda võib algselt segada turbasuspensiooniga (vt eespool). Sööda ulatuslikku lagunemist katseorganismide lisamise eel – näiteks pika tasakaalustusperioodi puhul – saab ära hoida, kui jätta sööda lisamise ja kokkupuuteperioodi alguse vahele võimalikult lühike ajavahemik. Et tagada uuritava kemikaali segunemine söödaga, tuleks sööt segada settega hiljemalt uuritava kemikaali settele lisamise päeval.

**Säilitamine**

Kunstliku sette kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas või toatemperatuuril. Uuritavat kemikaali sisaldav valmistatud sete tuleks katses viivitamata ära kasutada. Rikastatud mulla proove võib nende analüüsimiseni säilitada konkreetse uuritava kemikaali jaoks soovitatavates tingimustes.

**VIITED**

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 202 67 429.
- (2) Liebig, M., Meller, M., ja Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Veranstaltungen 5/2004: Statusseminar – Sedimentkontakttests. 24.–25. märts 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Saksamaa. Lk 107–119.

▼ **M6**

## 5. liide

***Lumbriculus variegatus*'e kultiveerimise meetodid**

Alamklassi *Oligochaeta* sugukonda *Lumbriculidae* kuuluv *Lumbriculus variegatus* (Müller) elab mageveesetetes ja on ökotoksikoloogilistes katsetes laialdaselt kasutusel. Seda liiki saab laboritingimustes hõlpsalt kultiveerida. Kultiveerimismeetodite ülevaade on esitatud allpool.

**Kultiveerimismeetodid**

Üksikasjaliku ülevaate *Lumbriculus variegatus*'e kultiveerimise tingimustest on esitanud Phipps *et al.* (1993) (1), Brunson *et al.* (1998) (2), USA Materjalide Katsetamise Ühing (2000) (3) ja USA Keskkonnakaitseamet (2000) (4). Allpool on esitatud nende tingimuste lühikokkuvõte. *L. variegatus*'e kasutamise oluline eelis on selle liigi isendite kiire paljunemine ja sellest tulenev kiire biomassi suurenemine laboris kultiveeritavates populatsioonides (nt allikad 1, 3, 4, 5).

Usse võib kasvatada suurtes akvaariumides (mahuga 57–80 l) temperatuuril 23 °C valgustusperioodiga 16 tundi valgust (100–1 000 luksit) ja 8 tundi pimedust, kasutades looduslikku vett, mida uuendatakse iga päev (45–50 l akvaariumi kohta). Substraadi valmistamiseks lõigatakse pleegitamata pruunist paberist käterätikud ribadeks ning need võib seejärel segada mõne sekundiga kultiveerimisveega, et saada väikesed pabersubstraadi tüki. Saadud substraati võib seejärel kohe kasutada *Lumbriculus*'e kultiveerimisakvaariumis, kattes sellega akvaariumi põhja, või säilitada seda hilisemaks kasutamiseks deioniseeritud vees külmutatuna. Üldjuhul jagub uuest substraadist akvaariumis umbes kaheks kuuks.

Iga ussikuultuuri loomist alustatakse 500–1 000 ussiga, keda söödetakse perioodiliselt uuendatavas vees või läbivoolurežiimis 3 korda nädalas 10 ml suspensiooniga, mis sisaldab 6 g forelli noorkalade sööta. Staatilises või poolstaatilises kultuuris tuleks bakterite ja seente kasvu ärahoidmiseks söötmissagedust vähendada.

Nendes tingimustes kahekordistub isendite arv kultuuris üldjuhul umbes 10–14 päeva jooksul.

Teise võimalusena võib *Lumbriculus variegatus*'t kultiveerida süsteemis, mis koosneb kunstliku sette valmistamisel kasutatava kvartslüüsi kihist (paksus 1–2 cm) ja taastatud veest. Kultiveerimisnõudena võib kasutada 12–20 cm kõrgusi klaasist või roostevabast terasest nõusid. Vett nõudes tuleks kergelt aereerida (nt 2–4 mulli sekundis), kasutades Pasteuri pipetti, mis jääb settepinna umbes 2 cm kõrgusele. Et hoida ära näiteks ammoniaagi akumulatsioonid, tuleks sette kohal oleva vee uuendamiseks kasutada läbivoolusüsteemi või uuendada vett käsitsi vähemalt kord nädalas. Väheharjasusse võib kasvatada toatemperatuuril valgustusperioodiga 16 tundi valgust (valgustustihedus 100–1 000 luksit) ja 8 tundi pimedust. Poolstaatilise kultuuri puhul (vee uuendamine kord nädalas) söödetakse usse kaks korda nädalas söödaga TetraMin (nt 0,6–0,8 mg settepinna cm<sup>2</sup> kohta), mille võib lisada suspensioonina, mis sisaldab 50 mg söödett milliliitri deioniseeritud vee kohta.

*Lumbriculus variegatus*'e eemaldamiseks kultuurist võib näiteks viia substraadi väikese avaga võrgu abil või ainult organismid leegis töödeldud laia (umbes 5-millimeetrise läbimõõduga) suuga klaaspipeti abil eraldi keeduklaasi. Kui ussid viiakse keeduklaasi koos substraadiga, lastakse usse ja substraati sisaldaval keeduklaasil läbivoolurežiimis õõ läbi seista, et kõrvaldada keeduklaasist substraat; ussid jäävad nõu põhja. Seejärel saab ussid viia värskesse kultiveerimiskeskonnaga akvaariumidesse või neid katse jaoks täiendavalt töödelda, nagu on kirjeldatud allikates 3 ja 4 ning allpool.

*L. variegatus*'e kasutamisel settekatsetes on oluline pöörata tähelepanu selle liigi paljunemisviisile (arhitoomia ehk morfallaksis, vt nt allikas 6). Sellise mittesugulise paljunemise tulemusena tekib kaks fragmenti, mis teatava aja jooksul ei toitu, kuni pea- või sabaosad on regenereerinud (nt allikad 7, 8). See tähendab, et *L. variegatus*'e puhul ei ole kokkupuude saastunud sette allaneelamise kaudu pidev.

▼ **M6**

Seepärast tuleks kontrollimatu paljunemise ja regenereerumise minimeerimiseks ja katsetulemuste suure varieeruvuse ärahoidmiseks ussid sünkroonida. Katsetulemused võivad varieeruda, kui isendid, kes on fragmenteerunud ja seepärast teatava perioodi vältel ei toitu, puutuvad uuritava kemikaaliga kokku vähem kui isendid, kes katse vältel ei fragmenteeru (9, 10, 11). Ussid tuleks 10–14 päeva enne kokkupuuteperioodi algust kunstlikult fragmenteerida (sünkroonimine). Sünkroonimiseks tuleks valida suured (täiskasvanud) ussid, kellel soovitatavalt ei esine hiljutise morfallaksise tundemärke. Valitud ussid võib asetada alusklaasile tilka kultiveerimisvette ja need keha keskosast skalpelliga pooleks lõigata. Tuleks jälgida, et tagaosade suurus oleks sarnane. Seejärel tuleks tagaosadel lasta regenereerida uus peaosa kultiveerimishõudes, mis sisaldavad sama substraati, mida kasutatakse kultuuris ja taastatud vees kuni kokkupuuteperioodi alguseni. Uue peaosa regenereerumisest annab märku sünkroonitud usside kaevumine substraati (peaosa regenereerumises veendumiseks võib vaadelda usside representatiivset osaproovi binokulaarmikroskoobi all). Pärast seda on katseorganismide füsioloogiline seisund eeldatavalt sarnane. See tähendab, et kui katse ajal toimub sünkroonitud usside paljunemine morfallaksise teel, puutuvad praktiliselt kõik loomad rikastatud settega kokku eeldatavalt samal määral. Sünkroonitud usse tuleks sööta ühe korra niipea, kui ussid hakkavad substraati kaevuma, või 7 päeva pärast pooleks lõikamist. Söötmissrežiim peaks olema võrreldav söötmissrežiimiga tavapärasel kultuuris, kuid sünkroonitud usside söötmiseks võib olla soovitatav kasutada sama sööta kui katses. Usse tuleks hoida katses kasutataval temperatuuril  $20 \pm 2$  °C. Pärast regenereerumist tuleks katse jaoks valida terved täispikad ussid, kes reageerivad nõrgale mehaanilisele ärritajale aktiivse ujumise või roomamisega. Et hoida ära selliste usside vigastusi või autotoomiat, tuleks nende käsitsemisel kasutada näiteks leegis töödeldud servadega pipette või roostevabast terasest hambaorke.

***Lumbriculus variegatus*'e lähtekultuuride allikad (aadressid USAs pärinevad kirjandusallikast 4)**

**Euroopa**

ECT Ökotoxikologie GmbH  
Böttgerstr. 2–14  
D-65439 Flörsheim/Main  
Saksamaa

Bayer Crop Science AG  
Forschung und Entwicklung – Ökotoxikologie  
Alfred-Nobel-Str. 50  
D-40789 Monheim  
Saksamaa

Itä-Suomen yliopisto  
Vesistöökologian laboratorio  
Biologian laitos  
Yliopistokatu 7, PL 111  
FIN-80101 Joensuu  
Soome

Technische Universität Dresden  
Institut für Hydrobiologie  
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften  
Mommensenstr. 13  
D-01062 Dresden  
Saksamaa

C.N.R.– I.R.S.A.  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Ricerca sulle Acque  
Via Mornera 25  
I-20047 Brugherio MI

**USA**

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



▼ M6

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
---	--

## VIITED

- (1) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A., ja 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., ja 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. Con. Tox.* 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. Väljaandes: ASTM International 2004 Annual Book of Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) USA Keskkonnakaitseamet (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Teine väljaanne. EPA 600/R-99/064, USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN, märts 2000.
- (5) Kukkonen, J., ja 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., ja Fournier, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Dev. Biol.* 138: 94–103.
- (7) Leppänen, M. T., ja 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., ja 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., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D., ja Nagel, R. (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2000–2007.
- (10) Oetken, M., Ludwichowski, K.-U., ja Nagel, R. (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-Altstoff-V. Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt, Berliin) tellimusel; FKZ 360 12 001, märts 2000.
- (11) Leppänen, M. T., ja Kukkonen, J. V. K. (1998c). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32: 1503–1508.

▼ **M6**

## 6. liide

Võrdlusuuringu „sette mürgisuse hindamise katse *Lumbriculus variegatus*'ega”  
tulemuste kokkuvõte

Tabel 1.

Võrdlusuuringu raames tehtud eraldi katsete tulemused: usside keskmine arv lahustita ja lahustiga kontrollrühmas katse lõpus; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.

	Usside keskmine arv lahustita kontrollrühmas	SH	V (%)	n	Usside keskmine arv lahustiga kontrollrühmas	SH	V (%)	n
	<b>32,3</b>	7,37	22,80	3	<b>39,0</b>	3,61	9,25	3
	<b>40,8</b>	6,55	16,05	6	<b>36,0</b>	5,29	14,70	3
	<b>41,5</b>	3,54	8,52	2	<b>38,5</b>	7,05	18,31	4
	<b>16,3</b>	5,99	36,67	6	<b>30,8</b>	6,70	21,80	4
	<b>24,3</b>	10,69	43,94	3	<b>26,3</b>	3,06	11,60	3
	<b>28,5</b>	8,29	29,08	4	<b>30,7</b>	1,15	3,77	3
	<b>28,3</b>	3,72	13,14	6	<b>28,8</b>	2,56	8,89	6
	<b>25,3</b>	5,51	21,74	3	<b>27,7</b>	1,53	5,52	3
	<b>23,8</b>	2,99	12,57	4	<b>21,3</b>	1,71	8,04	4
	<b>36,8</b>	8,80	23,88	6	<b>35,0</b>	4,20	11,99	6
	<b>33,0</b>	3,58	10,84	6	<b>33,5</b>	1,73	5,17	4
	<b>20,7</b>	2,73	13,22	6	<b>15,0</b>	6,68	44,56	4
	<b>42,0</b>	7,07	16,84	6	<b>43,7</b>	0,58	1,32	3
	<b>18,2</b>	3,60	19,82	6	<b>21,7</b>	4,04	18,65	3
	<b>32,0</b>	3,95	12,34	6	<b>31,3</b>	4,79	15,32	4
<b>Laborite- vaheline keskmine</b>	<b>29,59</b>		<b>20,10</b>		<b>30,61</b>		<b>13,26</b>	
<b>SH</b>	<b>8,32</b>		<b>10,03</b>		<b>7,57</b>		<b>10,48</b>	
<b>n</b>	<b>15</b>				<b>15</b>			
<b>Minimaalne</b>	<b>16,3</b>				<b>15,0</b>			
<b>Maksimaalne</b>	<b>42,0</b>				<b>43,7</b>			
<b>V (%)</b>	<b>28,1</b>				<b>24,7</b>			

▼ **M6**

Tabel 2.

Võrdlusuuringu raames tehtud eraldi katsete tulemused: usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustita ja lahustiga kontrollrühmas katse lõpus; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.

	Usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustita kontrollrühmas	SH	V (%)	n	Usside keskmine summaarne kuivmass paralleelproovi kohta lahustiga kontrollrühmas	SH	V (%)	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
<b>Laborite- vaheline keskmine</b>	<b>25,15</b>		<b>20,36</b>		<b>27,68</b>		<b>17,53</b>	
<b>SH</b>	<b>7,87</b>		<b>12,56</b>		<b>7,41</b>		<b>9,10</b>	
<b>n</b>	<b>15</b>				<b>15</b>			
<b>Minimaal- ne</b>	<b>12,9</b>				<b>10,5</b>			
<b>Maksimaal- ne</b>	<b>41,3</b>				<b>41,4</b>			
<b>V (%)</b>	<b>31,3</b>				<b>26,8</b>			

## ▼M6

Tabel 3.

**Pentaklorofenooli mürgisus: kokkuvõtlikud andmed võrdlusuuringus kasutatud lõppnäitajate kohta – EC<sub>50</sub>, NOEC ja LOEC laboritevaheline keskvääratus; NOEC = täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon; LOEC = vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon; SH = standardhälve; V = variatsioonikordaja.**

Bioloogiline näitaja		Laboritevaheline keskmine (mg/kg)	Minimaalne	Maksimaalne	Laboritevaheline tegur	SH	V (%)	Geomeetriline keskmine (mg/kg)
<b>Usside üldarv</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>23,0</b>	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	<b>NOEC</b>	<b>9,9</b>	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	<b>LOEC</b>	<b>27,9</b>	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	<b>VTE (%)</b>	<b>22,5</b>	7,1	39,1				
<b>Usside summaarne kuivmass</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>20,4</b>	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	<b>NOEC</b>	<b>9,3</b>	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	<b>LOEC</b>	<b>25,7</b>	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	<b>VTE (%)</b>	<b>24,8</b>	10,9	44,7				
<b>Suremus/elulemus</b>	<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>25,3</b>	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	<b>NOEC</b>	<b>16,5</b>	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	<b>LOEC</b>	<b>39,1</b>	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
<b>Sigivus (usside arvu suurenemine paralleelproovi kohta)</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>20,0</b>	6,7	28,9	4,3	7,6		18,3
	<b>NOEC</b>	<b>7,9</b>	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	<b>LOEC</b>	<b>22,5</b>	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	<b>VTE (%)</b>	<b>29,7</b>	13,9	47,9				
<b>Kasv (biomassi suurenemine paralleelproovi kohta)</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>15,3</b>	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	<b>NOEC</b>	<b>8,7</b>	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	<b>LOEC</b>	<b>24,0</b>	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	<b>VTE (%)</b>	<b>32,2</b>	13,6	65,2				

VTE – väikseim tuvastatav erinevus kontrollväärtusest hüpoteesi kontrollimise ajal; kasutatakse statistilise võimese väljendamiseks.

## VIIDE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J., ja Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Koostöös R. Nageli ja B. Karaoglaniga. Aruanne Saksamaa Keskkonnaametile (Umweltbundesamt, Berliin), teadus- ja arendustegevuse projekt nr 202 67 429.

▼ **M6**

C.36. RÖÖVLESTA (*HYPOASPIS (GEOLAE LAP S) ACULEIFER*)  
SIGIVUSE KATSE MULLAS

▼ **M9**

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

▼ **M6****C.37. 21-PÄEVANE KATSE KALADEGA: LÜHIAJALINE SÕELKATSE ÖSTROGEENSE JA ANDROGEENSE TOIME NING AROMATAASI INHIBEERIMISE KONTROLLIMISEKS**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 230 (2009). Vajadus töötada välja ja valideerida kaladega tehtav katse, millega saab välja selgitada teatavaid endokriinsüsteemi mõjutavaid kemikaale, tuleneb murest, et keskkonnas esinev kemikaali kontsentratsioon võib avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka loomadele, kuna kõnealused kemikaalid mõjutavad endokriinsüsteemi. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate juhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud endokriinsüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. Üks tegevussuund oli töötada välja katsejuhend kemikaalide sõeluuringu tegemiseks, et selgitada välja kemikaale, mis mõjutavad kalade endokriinsüsteemi. 21-päevane kalade endokriinsüsteemi sõeluuring on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi teatavate kemikaalide laboritevaheliste uuringutega, millega tõendati, et katse annab asjakohaseid ja usaldusväärseid tulemusi östrogeense toimega või aromataasi inhibeervate kemikaalide kindlakstegemisel (1, 2, 3, 4, 5) kolme kalaliigi puhul (tüse tõmpnina, jaapani riisikala ja võõtdaanio); androgeense toime kindlakstegemine on võimalik tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala, kuid mitte võõtdaanio puhul. Käesolev katsemeetod ei võimalda kindlaks teha antiandrogeenseid kemikaale. Valideerimise on vastastikuse eksperdihinnangu korras läbi vaadanud katsejuhendite programmi (6) riiklike koordinaatorite määratud ekspertide komisjon. Katse eesmärk ei ole määrata konkreetset hormonaalse häire mehhanismi, kuna katseloomadel on töökorras hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telg, mis võib reageerida kemikaalidele, mis mõjutavad HAS-telge eri tasanditel. Kalade lühiajalises paljunemise katses (OECD katsejuhend nr 229) uuritakse tüseda tõmpnina sigivust ja, kui see on asjakohane, sugunäärmete histopatoloogiat, samuti määratakse kõiki näitajaid, mida uuritakse käesoleva katsemeetodiga. OECD katsejuhend nr 229 võimaldab sõelkatsega kindlaks teha kemikaale, mis eri mehhanismide, sealhulgas endokriinsüsteemi kaudu mõjutavad paljunemist. Neid võimalikke mehhanisme tuleks kaaluda, et valida kõige sobivam katsemeetod.
2. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* sõeluuringus hoitakse marja heitvaid emaskalu ja suguküpsed isaskalu koos ja kemikaaliga kokkupuutes nende elutsükli piiratud osa (21 päeva) jooksul. 21-päevase kokkupuuteperioodi lõpus mõõdetakse isas- ja emaskaladel, sõltuvalt liigist, üht või kaht bioloogilist näitajat, millest tehakse järeldused uuritava kemikaali östrogeense, aromataasi inhibeerväe või androgeense toime kohta; need näitajad on vitellogeniin ja teisesed sootunnused. Vitellogeniini määratakse nii tüseda tõmpnina, jaapani riisikala kui ka võõtdaanio puhul; teiseseid sootunnuseid mõõdetakse üksnes tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul.
3. Käesolevat bioloogilist katsemeetodit saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks teatavate endokriinsete toimete puhul ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (28).

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt ovipaarsete selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile. See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub see verega munarjadesse, kus arenevad munarakud seda seovad ja modifitseerivad. Vitellogeniin on peaaegu tuvastamatu isaskalade ja ebaküpsede emaskalade veresplasmas, kuna sellistel kaladel ei ole vereringes piisavalt östrogeeni, kuid nende maks on võimeline vitellogeniini sünteesima ja verre eritama vastuseks stimuleerimisele eksogeense östrogeeniga.

▼ **M6**

5. Vitellogeniini mõõtmise kaudu tehakse kindlaks kemikaalid, millel on mitmesuguseid östrogeenseid toimeid. Östrogeense toimega kemikaale on võimalik tuvastada vitellogeniini mõõtmisega isaskalades ja see on eelretsenseeritud teaduskirjanduses hästi tõendatud (nt (7)). Samuti on tõendatud, et vitellogeniini toodetakse pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (8, 9). Kui emaskalade veres vähendatakse östrogeeni taset, näiteks sellega, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks 17 $\beta$ -östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise; seda kasutatakse selliste kemikaalide leidmiseks, mis inhibeerivad aromataasi (10, 11). Vitellogeniini tasemes pärast kokkupuudet östrogeeniga või aromataasi inhibiitoriga ilmneva toime bioloogiline olulisus on hästi tõendatud. Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus.
6. Välja ja töötatud ja tavakasutamiseks edukalt standarditud mitu mõõtmismeetodit. Nende hulgas on liigspetsiifilised ensüümmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid, milles vitellogeniini mõõtmiseks üksikisenditelt saadud väikestes vere- või maksaproovides kasutatakse immunokeemiat (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Vitellogeniini mõõtmiseks võetakse tüseda tõmpnina vereproov, võõtdaanio vereproov või pea-saba homogenaat ja jaapani riisikala maks. Jaapani riisikala puhul on vitellogeniini verest ja maksast määramise tulemused omavahel heas korrelatsioonis (19). 6. liites on esitatud soovitatavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks. Laiialdaselt kättesaadavad on vitellogeniini mõõtmise komplektid; sellised komplektid peaksid põhinema valideeritud liigspetsiifilisel ELISA meetodil.
7. Teatavate liikide isaskalade teisesed sootunnused on väliselt nähtavad, mõõdetavad ja sõltuvad endogeensete androgeenide tasemest vereringes; see on nii tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul, kuid mitte võõtdaanio puhul, kellel ei ole mõõdetavaid teiseseid sootunnuseid. Emaskaladel säilib võime omandada isaskalale iseloomulikud teiseseid sootunnused, kui nad puutuvad kokku vees olevate androgeensete kemikaalidega. Teaduskirjandusest võib leida mitu uuringut, milles on tõendatud tüseda tõmpnina (20) ja jaapani riisikala (21) selline reageerimine androgeensetele kemikaalidele. Teiseste sootunnuste vähenemist isaskaladel tuleks tõlgendada ettevaatusega, kuna selliste andmete statistiline võimsus on väike; tõlgendamisel tuleks toetuda eksperdiarvamusele ja võtta arvesse tõendite kaalukust. Võõtdaanio kasutamisele selles katses on piiranguid, kuna sellel kalal puuduvad mõõdetavad teiseseid sootunnused, mille kaudu hinnata reaktsiooni androgeense toimega kemikaalidele.
8. Tüseda tõmpnina puhul on eksogeensete androgeenidega kokkupuute peamine näitaja pulmarüü kõbukeste arv emaskala ninamikul. Jaapani riisikala puhul on nn papillaarjätked peamine tunnus, et emaskala on kokku puutunud eksogeensete androgeensete kemikaalidega. 5.A ja 5.B liites on esitatud soovitatavad meetodid vastavalt tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala sootunnuste hindamiseks.
9. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

**KATSE PÕHIMÕTE**

10. Katses viiakse paljunemisvõimelised isas- ja emaskalad katsenõudes kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kuna nad on täiskasvanud ja paljunemiseas, on kumbagi sugu kerge eristada; samuti on võimalik analüüsida nende sootunnuseid iga otsitava näitaja määramiseks ning see tagab ka nende tundlikkuse väliste kemikaalide suhtes. Katse lõpus määratakse nende sugu sugunäärmete makroskoopilise vaatlusega pärast seda, kui kõht on

**▼ M6**

kääridega lahti lõigatud. Vastavate biokatse tingimuste ülevaade on esitatud 2. liites. Katset alustatakse tavaliselt kaladega, kes on võetud kudemisvalmis populatsioonist; vanu kalu ei tohiks kasutada. Juhised kalade vanuse ja paljunemisvõimelisuse kohta on esitatud kalade valikut käsitlevas punktis. Katse tehakse kemikaali kolmel kokkupuutekontsentratsioonil ning, vee kontrollrühmaga ja vajaduse korral ka lahusti kontrollrühmaga. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni kohta kasutatakse jaapani riisikala ja võõtdaanio puhul kahte nõu või paralleelkatset (kummaski nõus 5 isas- ja 5 emaskala) ning tüseda tõmpnina korral nelja nõu või paralleelkatset (igas nõus 2 isas- ja 4 emaskala). Sellega võetakse arvesse isase tüseda tõmpnina territooriumikäitumist, kuid säilitatakse samal ajal katse piisav statistiline võimsus. Kokkupuude kemikaaliga toimub 21 päeva ja kaladelt võetakse proovid kokkupuute 21. päeval.

11. Proovivõtmisel 21. päeval surmatakse kõik kalad humaanselt. Tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul mõõdetakse teisesed sootunnused (vt 5.A ja 5.B liide); võõtdaaniolt ja tüsedalt tõmpninalt võetakse vereproovid vitellogeniini määramiseks; võõtdaaniolt võib selle asemel koguda vitellogeniini määramiseks pea ja saba (6. liide); jaapani riisikalalt võetakse vitellogeniini määramiseks maks (6. liide).

**KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITTEERIUMID**

12. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised tingimused:

- suremus vee (või lahusti) kontrollrühmades ei tohiks kokkupuuteperioodi lõpuks ületada 10 %;
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist kogu kokkupuuteperioodi jooksul;
- vee temperatuur ei tohiks kogu kokkupuuteperioodi jooksul katsenõudes erineda rohkem kui  $\pm 1,5$  °C ja see tuleks hoida vahemikus  $\pm 2$  °C katsealusele liigile ettenähtud temperatuurist (2. liide);
- peaksid olema tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus  $\pm 20$  % mõõdetud keskmisest väärtusest.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

13. Tavalised laboriseadmed, eeskätt järgmised:
- a) hapniku- ja pH-mõõtur;
  - b) seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;
  - c) asjakohased temperatuuri reguleerimise ja eelistatavalt pideva jälgimise seadmed;
  - d) soovitatava laadimisnormi ja loomkoormuse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist mahutid (vt 2. liide);
  - e) tüseda tõmpnina ja võõtdaanio kudemissubstraat; vajalikud üksikasjad vt 4. liide;
  - f) sobiva täpsusega kaalud (st täpsusega  $\pm 0,5$  mg).



**▼ M6****Vesi**

14. Uuringus võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui  $\pm 0,5$  pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (näiteks uuritava kemikaaliga kompleksimoodustamise kaudu), tuleks vaheaegade järel võtta proove analüüsimiseks. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib neid määramisi teha harvem (nt iga kuue kuu järel). 3. liites on esitatud mõned lahjendusvee nõutavad keemilised omadused.

**Katselahused**

15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisega. Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava kemikaali segamise või loksutamisega lahjendusvees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on ikkagi hädavajalik, tuleb katses paralleelselt teha lahusti kontrolli katse samal lahusti kontsentratsioonil, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga kokkupuute katsetes. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahusti olla tehniliselt parim lahendus; sel juhul tuleks vaadata OECD juhenddokumenti (22) raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta. Lahusti valiku määravad kemikaali füüsikalised-keemilised omadused. OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100  $\mu\text{l/l}$ , millest tuleks kinni pidada. Kuid hiljutises ülevaates (23) tõsteti esile täiendavaid probleeme, mis tekivad, kui endokriinse toime uurimisel kasutatakse lahustit. Seetõttu soovitatakse, et kui lahusti on vajalik, peaks selle kontsentratsioon olema tehnilist teostatavust arvestades minimaalne (see sõltub uuritava kemikaali füüsikalised-keemilistest omadustest).
16. Katses kasutatakse läbivoolusüsteemi. Sellises süsteemis lisatakse ja lahjendatakse uuritava kemikaali põhilahust pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme ja küllastamissüsteemiga), et tekitada eri katsekambrites rida erinevaid kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja see ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu katse jooksul. Tuleks hoiduda kasutamast ebakvaliteetseid plastiktorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale. Materjali valimisel läbivoolusüsteemi jaoks tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist.

**Kalade pidamine**

17. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboripopulatsioonist, eelistatavalt samast parvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katsed kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele. On oluline, et laadimismäär ja loomkoormus (vt mõisted, 1. liide) sobiks katses kasutatavale liigile (vt 2. liide).
18. Pärast 48-tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja rakendatakse järgmisi kriteeriume:

**▼ M6**

- kui suremus on seitsme päeva jooksul suurem kui 10 % populatsioonist, jäetakse kogu partii kõrvale;
  - kui suremus on populatsioonist 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui nende järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale;
  - kui suremus on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 % populatsioonist, loetakse partii vastuvõetavaks.
19. Kohanemise ajal, kokkupuutele eelneval perioodil ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

**Kokkupuute-eelne periood ja kalade valimine**

20. Soovitatakse kasutada ühenädalast kokkupuute-eelset perioodi, kus kalad pannakse nõudesse, mis on sarnased tegelikus katses kasutatavatele. Kalu tuleks sööta *ad libitum* kogu pidamisperioodi ja katse vältel. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnustega kummastki soost täiskasvanud kaladega, kes pärinevad labori suguküpsete kalade varudest (nt nende teisesed sootunnused on tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul selgelt nähtavad) ning kes aktiivselt koevad. Üksnes üldiseks orienteerumiseks tuleb öelda (ja seejuures ei tohi jätta arvestamata konkreetse kalapartii tegeplikku paljunemiskäitumist), et tüseda tõmpnina vanus peaks olema ligikaudu 20 ( $\pm 2$ ) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril  $25 \pm 2$  °C. Jaapani riisikala vanus peaks olema ligikaudu 16 ( $\pm 2$ ) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril  $25 \pm 2$  °C. Võõtdaanio vanus peaks olema ligikaudu 16 ( $\pm 2$ ) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril  $26 \pm 2$  °C.

**KATSE KAVANDAMINE**

21. Kasutatakse uuritava kemikaali kolme kontsentratsiooniga rühmi, üht (vee) kontrollrühma ja vajaduse korral üht lahusti kontrollrühma. Andmeid võib analüüsida, et teha kindlaks statistiliselt olulised erinevused kemikaaliga kokku puutunud rühma ja kontrollrühma näitajate vahel. Kõnealune analüüs näitab, kas uuritava kemikaaliga saadud andmeid võib kasutada riskihindamisel või oleks vaja teha täiendav pikemaajaline katse kahjuliku mõju (ellujäämisele, arengule, kasvule ja paljunemisele avaldum mõju) väljaselgitamiseks (24).
22. Võõtdaanio ja jaapani riisikala puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igast kontsentratsioonitaseme rühmast (5 isas- ja 5 emaskala kummastki paralleelkatsest) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini ja vajaduse korral teisesed sootunnused. Tüseda tõmpnina puhul võetakse kokkupuute 21. päeval isas- ja emaskalad igast kontsentratsioonitaseme rühmast (2 isas- ja 4 emaskala igast paralleelkatsest; paralleelkatseid tehakse neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini ja teisesed sootunnused.

**Katsekonsentratsioonide valimine**

23. Selle katse puhul peab kõrgeim katsekonsentratsioon olema maksimaalne talutav kontsentratsioon (MTC), mis tehakse kindlaks vahemiku leidmise katsega või muude mürgisuse andmete põhjal, 10 mg/l või vees lahustuvuse piirkonsentratsioon, olenevalt sellest, milline neist on väiksem. Uuritava kemikaali maksimaalne talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suremus on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi kasutamiseks on vaja empiirilisi andmeid ägeda mürgisuse kohta või muid mürgisuse andmeid, mille põhjal saab hinnata maksimaalse talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja tavaliselt nõuab see erialateadmisi.

**▼M6**

24. Katse on vaja teha kolmel kontsentratsioonil, mis erinevad konstantse kordaja võrra, mis võib olla kuni 10; lisaks tuleb teha kontrollkatse lahjendusveega (ja vajaduse korral ka lahusti kontrollkatse). Soovitatakse, et kontsentratsioonide suhtarv oleks vahemikus 3,2 kuni 10.

**KATSE KÄIK****Katsealuste kalade valimine ja kaalumine**

25. Tähtis on, et kalade kehamassi erinevused katse alguses oleksid minimaalsed. 2. liites on esitatud käesolevas katsemeetodis eri liikide puhul soovitatavad suurusevahemikud. Kogu katses kasutatava kalade partii puhul peaksid katse alguses isas- ja emaskalade individuaalse kehamassi erinevused olema vahemikus  $\pm 20\%$  samasooliste kalade aritmeetilisest keskmisest. Soovitatakse enne katset kaaluda samast kalade partiist osaproov, et arvutada välja keskmine kaal.

**Kokkupuutetingimused***Kestus*

26. Katse kestab 21 päeva alates kokkupuute-eelse perioodi lõppemisest. Soovitatakse kokkupuute-eelne periood on üks nädal.

*Söötmine*

27. Kalu tuleks sööta sobiva söödaga (2. liide) *ad libitum* ja piisaval määral, et nende organism oleks heas seisundis. Hoold tuleb kanda mikroobide kasvu ja vee hägustumise ärahoidmise eest. Üldreeglina võib päevaratsiooni jagada kaheks või kolmeks võrdseks osaks ja sööta kalu mitu korda päevas vähemalt kolmetunniste vaheaegadega. Ühekordne suurem söödakogus on samuti lubatav, eelkõige nädalalõpul. Kalu ei tohiks sööta 12 tunni jooksul enne proovivõtmist/lahkamist.
28. Kalasööda kohta peaks olema teada saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike (PAH) ja polüklooritud bifenüülid (PCB) sisaldus. Suure fütoöstrogeenisaldusega sööta, mis maskeeriks kalade reaktsiooni teadaolevale östrogeeni agonistile (nt 17 $\beta$ -östradiol), ei tohiks kasutada.
29. Sööda ülejäägid ja väljaheitel tuleks eemaldada katsenõudest vähemalt kaks korda nädalas, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil.

*Valgus ja temperatuur*

30. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

**Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

31. Enne kokkupuuteperioodi alustamist tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Kõik vajalikud analüüsimeetodid peaksid olema kontrollitud, sealhulgas peaks olema kontrollitud uuritava kemikaali stabiilsus katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapärase ajavahemike tagant järgmiselt: lahjendusvee ja põhilahuste voolu kiirust tuleks katse jooksul eelistatavalt kontrollida iga päev, kuid vähemalt kaks korda nädalas, ja see ei tohiks kogu uuringu jooksul varieeruda rohkem kui 10 %. Uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon soovitatatakse määrata kõikides nõudes katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega.
32. On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20\%$  nominaalsest kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nominaalsetel või mõõdetud väärtustel.
33. Proove võib olla vaja filtrida (nt läbi 0,45  $\mu\text{m}$  suuruste pooridega filtri) või tsentrifuugida. Sellise vajaduse korral tuleks eelistada tsentrifuugimist. Kuid kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtrimine lubatud.

**▼M6**

34. Katse ajal mõõdetakse lahustunud hapniku sisaldust, temperatuuri ja pH-d kõigis katsenõudes vähemalt kord nädalas. Üldkaredust ja leelisust tuleks kontrollkatse nõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katse nõus mõõta vähemalt kord nädalas. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

**Vaatlused**

35. Katse käigus või katse lõpetamisel hinnatakse mitut üldist näitajat (nt ellujäämine) ja mitut bioloogilist põhinäitajat (nt vitellogeniini tase). Allpool on kirjeldatud nende näitajate mõõtmist ja hindamist ning nende kasulikkust.

*Ellujäämine*

36. Kalad tuleks katseperioodi jooksul üle vaadata iga päev; kõik surmajuhumid tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei tohiks asendada ei kontrollrühma(de) ega ka katseryhmade nõudes. Katse ajal surnud kalade sugu tuleks määrata sugunäärmete makroskoopilise hindamisega.

*Käitumine ja välimus*

37. Igasugune ebatavaline käitumine (võrreldes kontrollrühmaga) tuleks registreerida; see võib hõlmata üldise mürgisuse tunnuseid, nagu hingeldamine, koordineerimata ujumine, tasakaalu kaotamine, ebatüüpiline liikumatus või söömine. Lisaks tuleb registreerida välised anomaaliad (näiteks veritsus, värvuse nõrgenemine). Selliseid mürgisuse tunnuseid tuleks andmete tõlgendamisel hoolikalt kaaluda, kuna need võivad viidata kemikaali kontsentratsioonile, millel endokriinse toime biomarkerid ei ole usaldusväärsed. Sellised käitumise vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks edaspidi järgida kaladega tehtavate katsete puhul. Näiteks on tüsedä tömpnina puhul täheldatud normaalsel isaskaladel või maskuliniseerunud emaskaladel androgeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel territooriumiga seotud agressiivsust; võõtdaanio puhul on tavaline paaritumis- ja kudemiskäitumine – koidikul pärast valgeks minemist – östrogeense või antiandrogeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel takistatud või ilmneb vähem.
38. Kuna mõned välistunnused (eelkõige värvus) võivad kala käsitlemise käigus kiiresti muutuda, on oluline registreerida kvalitatiivsed tähelepanekud enne kalade katsesüsteemist välja võtmist. Tüsedä tömpnina saadud seniste kogemuste kohaselt võivad mõned endokriinse toimega kemikaalid esialgu tekitada muutusi järgmistes välistes tunnustes: keha värvus (hele või tüme), värvumismuster (vertikaalsete vöötide olemasolu) ja kehakuju (pea ja rinnaosa). Seepärast tuleks kogu katse jooksul ja pärast katse lõpetamist jälgida kalade füüsilist välimust ja registreerida muutused.

*Kalade humaanne surmamine*

39. 21. päeval, st kemikaaliga kokkupuute lõpetamisel tuleks kalad humaanselt surmata vajaliku koguse trikaiiniga (trikaiinmetaansulfonaat, metakaiin, MS-222 (CASi nr 886-86-2), 100–500 mg/l), mis on limaskestä ärrituse vähendamiseks puhverdatud 300 mg/l NaHCO<sub>3</sub>-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8); seejärel võetakse veri või koed vitellogeniini määramiseks, nagu on selgitatud jaotises „Vitellogeniin“.

▼ **M6***Teiseste sootunnuste vaatlemine*

40. Mõned endokriinse toimega kemikaalid võivad põhjustada muutusi spetsiifilistes teisestes sootunnustes (pulmarüü kõbrukeste arv isasel tüsedal tõmpninal, isase jaapani riisikala papillaarjätked). Teatava toime mehhanismiga kemikaalid võivad põhjustada teiseste sootunnuste ebanormaalsel ilmumist vastassoost isenditel; näiteks sellised androgeenireseptori agonistid nagu trenboloon, metüültestosteroon ja dihidrotestosteroon võivad põhjustada emasel tüsedal tõmpninal silmapaistvate pulmarüü kõbrukeste tekkimise või emasel riisikalal papillaarjätkede väljaarenemise (11, 20, 21). Samuti on teatatud, et östrogeenireseptori agonistid võivad vähendada pulmarüü kõbrukeste arvu ja täiskasvanud isaskala turjapadjandi suurust (25, 26). Sellised üldised morfoloogilised vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset ja kvantitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks edaspidi järgida kaladega tehtavate katsete puhul. Tüsedal tõmpnina pulmarüü kõbrukeste arvu ja suurust ning jaapani riisikala papillaarjätkeid saab kas otse või mugavamini mõõta fikseeritud isenditel. Tüsedal tõmpnina ja jaapani riisikala teiseste sootunnuste hindamise soovitatav kord on esitatud vastavalt 5.A ja 5.B liites.

*Vitellogeniin*

41. Veri võetakse sabaarterist või -veenist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartoruga või selle asemel süstla abil tehtava südamepunktsiooniga. Sõltuvalt kala suurusest on kogutava vere maht tüsedal tõmpnina isendi puhul üldiselt vahemikus 5–60 µl ja võõtdaanio isendi puhul 5–15 µl. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimisega ja seda hoitakse koos proteaasiinhibiitoritega – 80 °C juures kuni vitellogeniini määramiseni. Teise võimalusena kasutatakse vitellogeniini määramiseks kudede allikana jaapani riisikala maksa või võõtdaanio pea-saba homogeenaati (6. liide). Vitellogeniin tuleks mõõta valideeritud homoloogse ELISA meetodiga, kasutades homoloogset vitellogeniini standardit ja homoloogseid antikehi. Soovitatav on kasutada meetodit, millega on võimalik tuvastada vitellogeniini nii väikeses sisalduses kui mõni ng plasma ml kohta (või ng koe mg kohta), mis on tausttase kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalas.
42. Vitellogeniini mõõtmise kvaliteeti kontrollitakse standardite ja tühikatsetega ning vähemalt kahe mõõtmise tegemisega. Iga ELISA meetodi puhul tuleb teha maatriksiefekti (proovi lahjendamise mõju) katse, et määrata proovi minimaalne lahjendustegur. Igal ELISA plaadil, mida kasutatakse vitellogeniini määramiseks, peaksid olema järgmised kvaliteedikontrolli proovid: vähemalt 6 kaliibrimisstandardit, mille kontsentratsioonivahemik hõlmab vitellogeniini kontsentratsiooni eeldatavat vahemikku, ja vähemalt üks mittespetsiifilise sidumise tühikatse (kaks paralleelkatset). Nendes tühikatsetes peaks neeldumine olema vähem kui 5 % kaliibrimisstandardi puhul täheldatavast maksimaalsest neeldumisest. Igast proovi lahjendusest analüüsitakse vähemalt kahte alikvooti (kahes paralleelaugus). Kui tulemused paralleelaugudes erinevad rohkem kui 20 %, tuleb teha kordusanalüüs.
43. Kaliibrimisgraafiku korrelatsioonikordaja ( $R^2$ ) peab olema suurem kui 0,99. Hea korrelatsioon ei ole siiski piisav, et tagada ennustatavate väärtuste õigsus kõigis kontsentratsioonivahemikes. Lisaks kaliibrimisgraafiku piisavalt heale korrelatsioonile peab ka iga standardi kontsentratsioon, mis arvutatakse kaliibrimisgraafiku põhjal, olema vahemikus 70–120 % oma nominaalsest kontsentratsioonist. Kui nominaalsed kontsentratsioonid kalduvad

▼ **M6**

eemaldama kaliibrimise regressioonisirgest (nt madalatel kontsentratsioonidel), võib olla vajalik jagada kaliibrimisgraafik madalale ja kõrgele kontsentratsioonile vastavateks osadeks või kasutada neeldumisandmete lähendamiseks mittelineaarset mudelit, mis neid õigesti kirjeldaks. Kui graafik jagatakse kaheks osaks, peaks kummaski osas olema  $R^2 > 0,99$ .

44. Avastamispiir (*limit of detection*, LOD) on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon ning määramispiir (*limit of quantitation*, LOQ) on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon, mis on korrutatud väikseima lahjendusteguriga.
45. Igal vitellogeniinanalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga (7. liide). Eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Biomarkerite põhjal mõju hindamine dispersioonanalüüsiga (ANOVA)**

46. Kemikaali võimaliku endokriinse mõju tuvastamiseks võrreldakse biomarkerite väärtusi kontrollrühma vastavate näitajatega, kasutades dispersioonanalüüsi (ANOVA). Kui kasutatakse lahusti kontrollrühma, tuleb iga tulemusnäitaja puhul teha asjakohane statistiline test lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade vahel iga tulemusnäitaja jaoks. Juhendid, kuidas kasutada lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade andmeid edasises statistilises analüüsis, võib leida OECD 2006. aasta dokumendis (27). Kõiki bioloogiliste vastuste andmeid tuleks analüüsida ja need esitada eraldi kummagi soo kohta. Kui parameetriliste meetodite vajalikud eeldused ei ole täidetud – tegemist on normaaljaotusest erineva jaotuse (nt Shapiro-Wilki test) või heterogeense hajuvusega (Bartletti test või Levene'i test), tuleks kaaluda andmete teisendamist, et muuta hajuvus enne ANOVA tegemist homogeenseks, või kaalutud ANOVA kasutamist. Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist ei ole monotoonne, võib kasutada Dunnetti testi (parameetiline) või mitmest paariviisilist võrdlemist või Manni-Whitney testi Bonferroni parandusega (mitteparameetiline). Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist on ligikaudu monotoonne, võib kasutada muid statistilisi teste (nt Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi test). 8. liites on esitatud statistilist analüüsi käsitlev otsustusskeem, mis aitab leida kasutamiseks kõige sobivama statistilise testi. Täiendav teave on kättesaadav ka OECD dokumendis, milles käsitletakse praegusi meetodeid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks (27).

**Katsetulemuste esitamine**

47. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist.

*Uurimislabor:*

- vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;
- iga labor peaks olema tõendanud oma oskusi, kasutades mitmesuguseid esindavaid kemikaale.

*Uuritav kemikaal:*

- uuritava kemikaali iseloomustused;
- füüsilised ja asjakohased füüsilis-keemilised omadused;

**▼M6**

- katses kasutatud kontsentratsiooniga lahuste valmistamise meetod ja sagedus;
- teave stabiilsuse ja biolagunduvuse kohta.

*Lahusti:*

- lahusti iseloomustus (kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon);
- lahusti valimise põhjendus (kui lahusti on muu kui vesi).

*Katseloomad:*

- liik ja liin;
- tarnija ja tema konkreetne käitis;
- kalade vanus katse alguses ja paljunemis-/kudemisseisund;
- loomade aklimatiseerimise korra üksikasjad;
- kalade kehamass kemikaaliga kokkupuute alguses (kalaparvest võetud osaproovi põhjal).

*Katsetingimused:*

- kasutatud katsemeetod (katse tüüp, laadimisnorm, loomkoormus jne);
- põhilahuse valmistamise meetod ja voolukiirus;
- nominaalsed katsekonsentratsioonid, iga nädal mõõdetud katselahuste kontsentratsioonid ja kasutatud analüüsimeetod, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning tõendid selle kohta, et need mõõtmised näitavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni tegelikust lahuses;
- lahjendusvee omadused (pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloorisisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus ja kõik muud mõõdetud näitajad);
- vee kvaliteet katsenõus: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda (söötade) tüüp, päritolu, lisatud kogus ja söötmise sagedus ning asjakohaste saasteainete analüüs (nt polüklooritud bifenüülid, polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid).

*Tulemused:*

- tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele;
- andmed suremuse kohta iga katsekonsentratsiooni rühmades ja kontrollrühmas;
- kasutatud statistilise analüüsi meetodid, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite valimise põhjendus;
- bioloogiliste vaatluste andmed üldiste morfoloogiliste muutuste kohta, sealhulgas teisest sootunnust ja vitellogeniini kohta;

▼ **M6**

- andmete analüüsi tulemused, eelistatavalt tabelite ja graafikute kujul;
- kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad ilmingud, mida põhjustas uuritav kemikaal.

**TULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KATSETULEMUSTE KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED**

48. Käesolevas osas on esitatud mõningad kaalutlused, mida tuleks arvesse võtta mitmesuguste mõõdetavate näitajate kohta saadud katsetulemuste tõlgendamisel. Tulemuste tõlgendamisel tuleb olla ettevaatlik, kui uuritav kemikaal põhjustab selgelt mürgitust või mõjutab katseloomade üldist seisundit.
49. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks jälgida, et ei ületataks maksimaalset talutavat kontsentratsiooni, muidu ei saa andmeid mõistlikult tõlgendada. On oluline, et vähemalt ühe kontsentratsiooni juures ei ilmneks märke mürgisuse kohta. Haiguse ja toksilise mõju tundemärke tuleks põhjalikult hinnata ja esitada need katseprotokollis. Näiteks on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus. Mõju tõlgendamist võivad hõlbustada andmed sellistel kontsentratsioonidel, kus andmeid ei moonuta süsteemne toksilisus.
50. Katsetulemuste kehtivaks tunnistamisel tuleb arvesse võtta mitut aspekti. Juhinduda tuleb sellest, et vitellogeniini tase kontrollrühmades peaks isas- ja emaskaladel olema erinev; erinevus peaks olema ligikaudu kolm suurusjärku tüseda tõmpnina ja võõtdaanio puhul ning umbes üks suurusjärk jaapani riisikala puhul. Valideerimisprotokollides (1, 2, 3, 4) on esitatud näited väärtuste kohta, mis määrati kontrollrühmade ja uuritava kemikaaliga rühmade puhul. Kõrge vitellogeniinitase kontrollrühma isaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ja nõrkade östrogeeni agonistide tuvastamise võimet. Madal vitellogeniinitase kontrollrühma emaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ning aromataasi inhibiitorite ja östrogeeni antagonistide tuvastamise võimet. Valideerimisuringuid kasutati selliste suumiste väljatõõtamiseks.
51. Kui laboris ei ole asjaomast katset varem tehtud või seal on toimunud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalade liin või tarnija), siis on soovitatav teha tehnilise pädevuse uuring. Soovitatav on kasutada kemikaale, millel on terve rida toimemehhanisme või mis avaldavad mõju mitmele otsitavale näitajale. Praktikas kutsutakse iga laborit üles looma varasemate kontrollrühma andmete põhjal oma andmekogu isas- ja emaskalade näitajate kohta ning tegema positiivse kontrolli katse östrogeense toimega kemikaaliga (nt 17β-õstradiool kontsentratsioonis 100 ng/l või mõni teadaolev nõrk agonist), mille mõjul tõuseb vitellogeniini tase isaskalades, positiivse kontrolli katse aromataasi pärssiva kemikaaliga (nt fadrosool või prokloraas kontsentratsioonis 300 µg/l), mille tõttu väheneb emaskalade vitellogeniinisaldus, ning positiivse kontrolli katse androgeense toimega kemikaaliga (nt 17β-trenboloon kontsentratsioonis 5 µg/l), mis põhjustab emastel tüsedatel tõmpninel ja jaapani riisikaladel isaskalade teiseste sootunnuste ilmumist. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate valideerimisuringute andmetega (1, 2, 3), et kinnitada labori pädevust.
52. Üldiselt tuleks vitellogeniini mõõtmised lugeda positiivseks, kui tuvastatakse vitellogeniinitaseme statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) tõus isaskalades või statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) langus emaskalades vähemalt suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil kontrollrühmaga võrreldes, kui samas ei ilmne üldise mürgisuse märke. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutava kontsentratsiooni ja toime vahelise sõltuvuse tuvastamine. Nagu eespool märgitud, ei tarvitse vitellogeniini sisalduse vähene mine olla tingitud üksnes endokriinsest mehhanismist, kuid positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada tõõndina endokriinse mõju kohta *in vivo* ja seda tuleks selguse saamiseks tavaliselt täiendavalt uurida.



**▼ M6**

## KIRJANDUS

- (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> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.

▼ **M6**

- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131.
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\beta$ -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 ja 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 17 $\beta$ -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

**▼M6**

- (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve ja 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.

▼ **M6**

*1. liide*

**Lühendid ja mõisted**

**Kemikaal** – aine või segu.

**CV** – variatsioonikordaja.

**ELISA** – ensüümimmunosorptsioonanalüüs.

**Laadimisnorm** – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

**Loomkoormus** – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

**VTG (vitellogeniin)** – fosfolipoglükoproteiin, mis on munakollases esineva valgu eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikides munemise teel paljunevate liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

**HAS-telg** – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

**MTC** – maksimaalne talutav kontsentratsioon, mis on ligikaudu 10 % LC<sub>50</sub> väärtusest.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

## ▼M6

## 2. liide

## Kalade endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide sõeluuringu katse tingimused

1. Soovitav liik	Tüse tõmpnina ( <i>Pimephales promelas</i> )	Jaapani riisikala ( <i>Oryzias latipes</i> )	Vöötdaanio ( <i>Danio rerio</i> )
2. Katse tüüp	Läbivooluga	Läbivooluga	Läbivooluga
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valgustus	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood (koidu/hämariku üleminekuid võib korraldada, kuid neid ei peeta tingimata vajalikuks)	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust
7. Laadimisnorm	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Katsekambri suurus	10 l (miinimum)	2 l (miinimum)	5 l (miinimum)
9. Katselahuse maht	8 l (miinimum)	1,5 l (miinimum)	4 l (miinimum)
10. Katselahuse kogu ruumala asendamine	Vähemalt 6 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
11. Katseloomade vanus	Vt punkt 20	Vt punkt 20	Vt punkt 20
12. Täiskasvanud kala ligikaudne märgkaal (g)	Emased: 1,5 ± 20 % Isased: 2,5 ± 20 %	Emased: 0,35 ± 20 % Isased: 0,35 ± 20 %	Emased: 0,65 ± 20 % Isased: 0,4 ± 20 %
13. Kalade arv katsenõu kohta	6 (2 isaskala ja 4 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)
14. Kontsentratsioonide arv	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	= 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)
15. Nõude arv ühe kemikaalikeskonnasiooni kohta	Vähemalt 4	Vähemalt 2	Vähemalt 2
16. Kalade arv ühe katses kasutatud kontsentratsiooni kohta	16 täiskasvanud emaslooma ja 8 isaslooma (4 emaslooma ja 2 isaslooma igas paralleelkatsenõus)	10 täiskasvanud emaslooma ja 10 isaslooma (5 emaslooma ja 5 isaslooma igas paralleelkatsenõus)	10 täiskasvanud emaslooma ja 10 isaslooma (5 emaslooma ja 5 isaslooma igas paralleelkatsenõus)
17. Söötmissrežiim	Elus või külmutatud soolase vee krevettide täiskasvanud või noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas (ad libitum), müügil olev kalasööt või nende kombinatsioon

▼ **M6**

18. Aeratsioon	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
19. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekllooritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekllooritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekllooritud kraanivesi
20. Kokkupuute-eelne periood	Soovitavalt 7 päeva	Soovitavalt 7 päeva	Soovitavalt 7 päeva
21. Kemikaaliga kokkupuute kestus	21 päeva	21 päeva	21 päeva
22. Bioloogilised näitajad	ellujäämine, käitumine, teised sootunnused, vitellogeniin	ellujäämine, käitumine, teised sootunnused, vitellogeniin	ellujäämine, käitumine, vitellogeniin
23. Katse nõuetekohasus	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $25 \pm 2$ °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $24 \pm 2$ °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $26 \pm 2$ °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil

▼ **M6**

## 3. liide

**Mõned lahjendusvee nõutavad keemilised omadused**

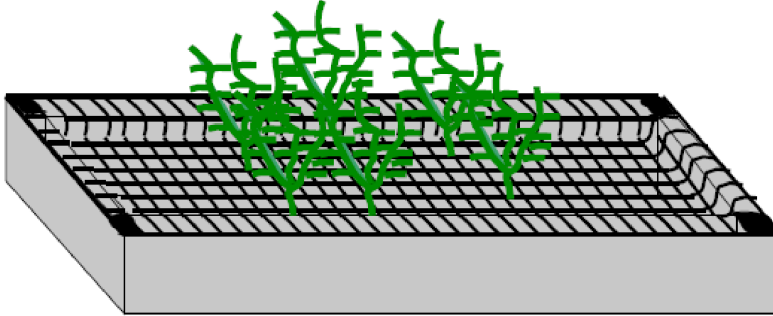
Koostisosa	Kontsentratsioon
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼ **M6**

## 4.A liide

**Vöötdaanio kudemissubstraat**

**Kudemisalus:** üleni klaasist instrumendinõu, näiteks 22 × 15 × 5,5 cm (pikkus × laius × sügavus), kaetud eemaldatava roostevabast terastraadist võrega (võresilma suurus 2 mm). Võre peaks katma instrumendinõu valendiku allpool nõu äärt.



Võre peale tuleks kinnitada kudemissubstraat. See peaks moodustama struktuuri, millesse kalad saavad siseneda. Sobivad näiteks rohelisest plastikmaterjalist kunstlikud akvaariumitaimed (NB! tuleb arvestada uuritava kemikaali võimaliku adsorbeerumisega plastikmaterjalile). Plastikmaterjali tuleb leostada piisava koguse sooja veega piisavalt kaua, et hoida ära kemikaalide leostumine vette katse ajal. Klaasmaterjali kasutamisel tuleks tagada, et kalad ei saaks vigastusi ega peaks oma aktiivse tegevuse käigus taluma ruumikitsikust.

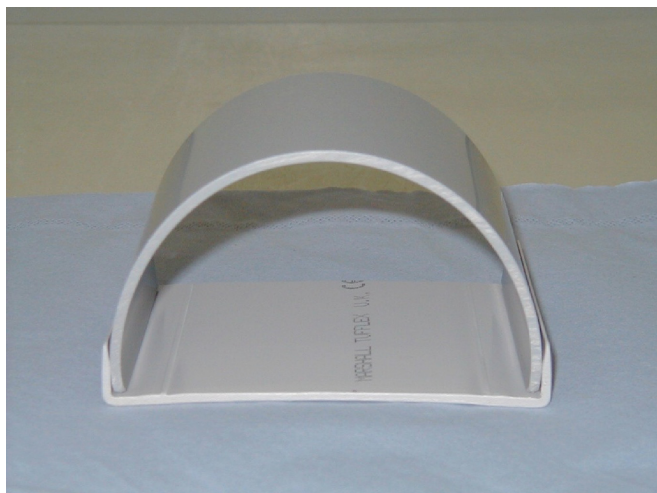
Vahemaa aluse ja kambri klaasseinte vahel peaks olema vähemalt 3 cm, et kudemine toimuks kindlalt vaagnale. Alusele koetud marjaterad langevad läbi võre ja need võib koguda 45–60 minutit pärast valgustuse sisselülitamist. Läbipaistvad marjaterad ei ole kleepuvad ja on külvalguses kergesti loendatavad. Kui ühe nõu kohta kasutatakse viit emaskala, võib marjaterade arvu kuni 20 ühe päeva kohta pidada väikeseks, kuni 100 – keskmiseks ja üle 100 – rikkalikuks saagiseks. Kudemisalus tuleks eemaldada, marjaterad kokku koguda ja kudemisalus uuesti katsenõusse tagasi panna kas võimalikult hilja õhtul või väga vara hommikul. Aeg kudemisaluse tagasipanekuni ei tohiks olla pikem kui üks tund, sest vastasel juhul võib kudemissubstraadi olemasolu mõjutada kalu individuaalselt paarituma ja kudema ebatavalisel ajal. Kui olukord tingib kudemisaluse hilisema sissepanemise, tuleks seda teha vähemalt 9 tundi pärast valgustuse sisselülitamist. Sellisel hilisel kellaajal kudemist enam ei toimu.



**▼M6***4.B liide***Tüsedä tömpnina kudemissubstraat**

Igasse katsekambrisse pannakse kaks või kolm plastikust, klaasist, keraamilist või roostevabast terasest kudemisvõlvi ja kandikut (nt 80 mm pikkune hall kaarja ristlõikega rentslikivi, mis asub 130 mm pikkusel servadega kandikul) (vt joonis). Korralikult vanandatud polüvinüülkloriid- või keraamilised võlvid on tõendatult sobiv kudemissubstraat (Thorpe *et al.*, 2007).

On soovitatav võlvid karestada, et parandada nakkuvust. Kandikud tuleks samuti varustada kaitsevõrega, et takistada kalade juurdepääsu koetud marjale, kui marjaterade tõhus nakkuvus kasutatava kudemissubstraadiga ei ole tõendatud.



Alus on tehtud nii, et see peaks kinni kõik marjaterad, mis ei nakku kudemisvõlvi pinnaga ja kukuvad sellepärast alusele (või marjaterad, mis on koetud otse lamedale plastikalsele). Kõiki kudemissubstrate tuleks enne kasutamist vähemalt 12 tundi lahjendusveega leostada.

**VIIDE**

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.

▼ **M6**

## 5.A liide

**Teiste sootunnuste hindamine tüseda tõmpnina puhul endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks****Ülevaade**

Endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks sobivad täiskasvanud tüseda tõmpnina potentsiaalselt olulised välistunnused hõlmavad järgmist: värvus (st hele/tume), värvumismuster (st vertikaalsete vöötide olemasolu või puudumine), kehakuju (st pea ja rinnaosa kuju, kõhu väljavenitatus) ja spetsiifilised teised sootunnused (st pulmarüükõbrukeste arv ja suurus, turjapadjandi ja kudemise-lundi suurus).

Pulmarüü kõbrukesed asuvad tüseda tõmpnina suguliselt aktiivse isaskala pea peal (turjapadjandil) ja on tavaliselt paigutatud bilateraalsümmeetriliselt (Jensen *et al.*, 2001). Kontrollrühma emaskaladel ning noortel isas- ja emaskaladel kõbruke si ei ole (Jensen *et al.*, 2001). Isaskala silmade ümber ja söõrmete vahel võib olla kuni kaheksa eraldi kõbrukest. Suurim arv kõbruke si ja suurimad kõbrukesed asuvad kahel paralleelsel joonel otse söõrmete all ja suu kohal. Paljudel kaladel on kõbrukeste rühmad alalõua all; suule kõige lähemaid kõbruke si on tavaliselt üks paar, edasi kõhu poole võib neid olla kuni neli tükki. Kõbrukeste tegelik arv on harva üle 30 (vahemik 18–28; Jensen *et al.*, 2001). Suurem osa (arvuliselt) kõbruke si kujutab endast eraldi võrdlemisi ümmargust struktuuri, mille kõrgus on ligikaudu võrdne selle raadiusega. Enamikul suguliselt aktiivsetel isaskaladel on vähemalt mõned kõbrukesed suurenenud ja esil, nii et neid ei ole võimalik eristada eraldi struktuurina.

Endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide hulgas võivad teatavat liiki kemikaalid põhjustada teatavate vastassoo teiste sootunnuste ebanormaalse ilmumise; näiteks sellised androgeenireseptori agonistid nagu 17β-metüültestosteroon ja 17β-trenboloon võivad põhjustada emasel tüsedal tõmpninal pulmarüü kõbrukeste ilmumise (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), samal ajal kui östrogeenireseptori agonistid võivad vähendada isaskaladel pulmarüü kõbrukeste arvu või suurust (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

Allpool on esitatud tüseda tõmpnina pulmarüükõbrukeste kirjeldamise meetod, mida kasutatakse Minnesota osariigis Duluthis asuvas Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseameti laboris. Konkreetseid tooteid ja/või seadmed võib asendada võrreldavate kättesaadavate materjalidega.

Kõbruke si on kõige parem vaadelda valgustusega suurendusklaasi või valgustusega (3X) lahkamismikroskoobiga. Vaadeldge kala selja poolt ja eest (peaga vaataja poole).

a) Pange kala väiksele Petri tassile (läbimõõt nt 100 mm), esiotsaga enda poole ja kõhuga allapoole. Seadke objektiiv fookus nii, et oleks võimalik vaadelda kõbruke si. Pöörake kala ettevaatlikult ja aeglaselt küljelt küljele, et tuvastada kõbrukeste piirkonnad. Loendage ja hinnake kõbrukesed.

b) Korrake vaatlust pea kõhupoolel, olles pannud kala Petri tassil selili esiotsaga enda poole.

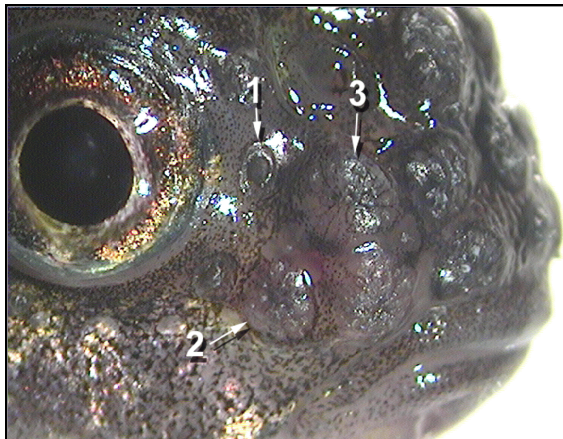
c) Iga kala vaatlus tuleks viia lõpule kahe minutiga.

▼ **M6****Köbrukeste arv ja hindamine**

Täiskasvanud tüseda tõmpnina köbrukeste olemasolu ja suuruse hindamiseks on määratletud kuus konkreetset ala. Olemasolevate köbrukeste asukohta ja arvu kaardistamiseks on välja töötatud vorm (vt käesoleva liite lõpus). Iga kala köbrukeste arv ja suurus registreeritakse kvantitatiivselt järgmiselt: 0 – puuduvad, 1 – olemas, 2 – suurenenud ja 3 – tugevasti väljendunud (joonis 1).

0 punkti – köbrukeste ei ole. 1 punkt – köbrukesed on olemas, igal köbrukesel on üks kõrgeim punkt, mille kõrgus on ligikaudu võrdne raadiusega (diameetriga). 2 punkti – suurenenud köbrukesed, mille kude meenutab kujult täрни, millel on tavaliselt lai alus keskelt algavate radiaalsete vagudega. Köbrukeste tipp on sageli ebakorrapärasem, mõnikord võib olla mõnevõrra ümardunud. 3 punkti – selgelt väljendunud köbrukesed, on tavaliselt üsna suured ja ümmargused; struktuur on ebaselgem. Mõnikord on need köbrukesed kokku kasvanud ja moodustavad ühtse massi, mis hõlmab üht või mitut ala (B, C ja D, mida on kirjeldatud allpool). Värvumine ja muster on sarnased 2 punktile vastavate köbrukeste omale, kuid on mõnikord raskesti eristatavad. Selle süsteemi kasutamise korral on normaalsel kontrollrühma isasel, kelle köbrukeste arv on 18–20, üldine köbrukeste punkti-summa < 50 (Jensen *et al.*, 2001).

Joonis 1



Tegelik köbrukeste arv võib mõnel kalal olla suurem, kui on vormil (liide A) asjaomases hindamispiirkonnas lahtreid. Kui see on nii, võib täiendada hinded märkida lahtri sisse, lahtri paremale või vasakule. Vormist ei pea olema näha sümmeetriat. Täiendav meetod selliste köbrukeste kaardistamiseks, mis paiknevad piki suu horisontaaltasapinda vertikaalselt paaris või ühendatuna, on märkida kummagi köbrukeste hinne samasse lahtrisse.

Kaardistamispiirkonnad on järgmised.

A – silmade ümber olevad köbrukesed. Kaardistatakse selja poolt kõhu poole piki silma eesmist äärt. Tavaliselt on kontrollrühma isaskaladel neid mitu, kontrollrühma emaskaladel neid ei ole; androgeenidega kokku puutunud emaskaladel esinevad need paaris (üks kummagi silma juures) või üksikult.

B – sõõrmete (meeleelundikanalite avade) vahel olevad köbrukesed. Kontrollrühma kõrgema hindega (2 – suurenenud või 3 – selgelt väljendunud) isaskaladel on need tavaliselt paaris. Kontrollrühma emaskaladel neid ei ole; androgeenidega kokku puutunud emaskaladel võib neid esineda ja need võivad olla teataval määral arenenud.

C – otse sõõrmetest eespool suuga paralleelselt asuvad köbrukesed. Suguküpsetel kontrollrühma isaskaladel on need tavaliselt suurenenud ja selgelt väljendunud. Vähem arenenud isaskaladel ja androgeeniga kokku puutunud emaskaladel on need olemas või suurenenud.

▼ **M6**

D – kõbrukesed, mis paiknevad paralleelselt piki suujoont. Üldiselt klassifitseeritakse need kontrollrühma isaskaladel „arenenuks”. Kontrollrühma emaskaladel neid ei ole, kuid androgeenidega kokku puutunud emaskaladel on need olemas.

E – alalõual suu kõrval paiknevad kõbrukesed, tavaliselt väiksed ja paarikaupa. Kontrollrühma isaskaladel ning kemikaaliga kokku puutunud isaskaladel ja emaskaladel võivad need olla mitmesugused.

F – kõbrukesed, mis paiknevad alast E kõhu pool. Tavaliselt väiksed ja paaris. Neid esineb kontrollrühma isastel ja androgeeniga kokku puutunud emaskaladel.

**VIITED**

- (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- $\beta$  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.

**Kõbrukeste hindamise vorm****Numbriline hinnang****ID** \_\_\_\_\_

1 – on olemas

**Kuupäev** \_\_\_\_\_

2 – suurenenud

**Üldsumma** \_\_\_\_\_

3 – tugevasti väljendunud

	<b>A</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	<b>B</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	<b>C</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
	<b>D</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>

	<b>E</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	
	<b>F</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>

▼ **M6**

## 5.B liide

**Teiste sootunnuste hindamine jaapani riisikala puhul endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks**

Allpool on kirjeldatud papillaarjätete (\*) mõõtmist; nimetatud jätked on jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) teised sootunnused.

- (\*) Papillaarjätteid esineb tavaliselt ainult täiskasvanud isaskaladel ja need asuvad pärakuuime tagumisest otsast lugedes teisel kuni seitsmendal või kaheksandal uimekiirel (joonised 1 ja 2). Mõnikord harva esineb selliseid jätteid siiski ka pärakuuime tagumisest otsast lugedes esimesel uimekiirel. Käesolev standardne töökord hõlmab jätete mõõtmist esimesel uimekiirel (uimekiire järjekorranumber saadakse siin loendamisega pärakuuime tagumisest otsast).
- (1) Pärast maksa väljalõikamist (6. liide) pannakse rümp (pea ülespoole, saba allapoole) koonilise katseklaasi, mis sisaldab ligikaudu 10 ml puhverdatud neutraalse pH-ga 10 % formaliinilahust. Kui sugunäärmed fikseeritakse mingi muu lahusega kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus, tehke pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga ristilõige läbi rümbe, hoolitsedes selle eest, et gonopoorid ja sugunäärmed ise ei saaks viga (joonis 3). Pange kala keha peapoolne osa fikseerimislahusesse, et fikseerida sugunäärmed, ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, nagu on kirjeldatud eespool.
  - (2) Pärast seda, kui kala keha on pandud 10 % neutraalsesse puhverdatud formaliini, võtke pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja tõmmake seda umbes 30 sekundit, et hoida pärakuuim lahti. Pärakuuimest kinnivõtmisel võtke pintsettide vahele mõned uimekiired uime eesosas ja jälgige, et papillaarjätked ei saaks kriimustada.
  - (3) Pärast seda, kui olete pärakuuime hoidnud lahti ligikaudu 30 sekundit, hoidke kala keha 10 % neutraalses puhverdatud formaliinis toatemperatuuril kuni papillaarjätete mõõtmiseni (neid tuleks mõõta pärast vähemalt 24 tunni pikkust fikseerimist).

**Mõõtmine**

- (1) Pärast kala keha fikseerimist 10 % neutraalses puhverdatud formaliinis vähemalt 24 tundi võtke kala rümp koonilisest katseklaasist ja pühkige formaliin filterpaberisse (või paberrätikusse).
- (2) Pange kala kõhuga ülespoole. Seejärel löigake väikeste lahkamiskääridega pärakuuim ettevaatlikult ära (parem on löigata uim ära koos väikse koguse seda toetava koega).
- (3) Võtke ärälõigatud pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja pange see objektiklaasile, millel on mõni tilk vett. Seejärel katke pärakuuim katteklaa-siga. Olge ettevaatlik, et pintsettidega pärakuuimest kinni võttes ei saaks papillaarjätked kriimustada.
- (4) Loendage bioloogilise mikroskoobi abil (tavaline või invertmikroskoop) loenduri abil papillaarjätetega liigeseplaatide arv. Papillaarjäteteks loetakse väikest rühma jätkeid liigeseplaadi tagumisel serval. Kirjutage iga

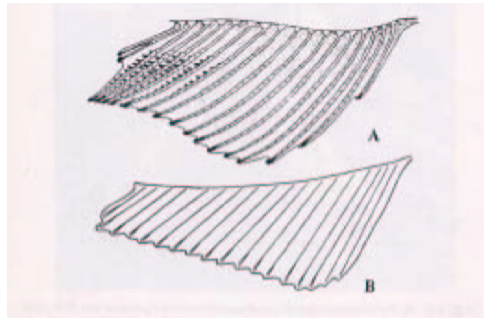
▼ **M6**

uimekiire papillaarjätketega liigeseplaatide arv töölehele (nt esimene uimekiir: 0, teine uimekiir: 10, kolmas uimekiir: 12 jne) ning sisestage nende arvude summa iga kala kohta Exceli tabelisse. Vajaduse korral tehke pärakuimest pilt ja loendage papillaarjätketega liigeseplaatide arv fotolt.

- (5) Pärast mõõtmist pange pärakuim koonilisse katseklaasi (1) ja hoidke see alles.

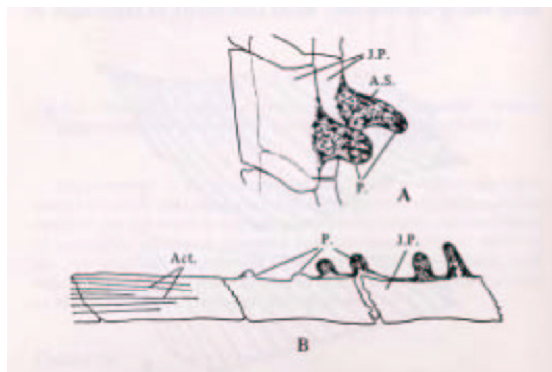
*Joonis 1.*

Pärakuime kuju ja suuruse soolised erinevused. A – isaskala; B – emaskala. 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.



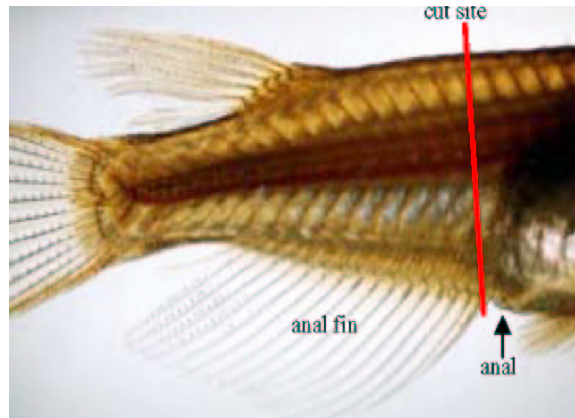
*Joonis 2.*

A. Jätked pärakuime kiire liigeseplaatidel. J.P. (*joint plate*) – liigeseplaat; A.S. (*axial space*) – teljesuunaline vahekaugus; P. (*process*) – jätke. B. Uimekiire lõpuosa. Otsas on aktinotrihhiumid (Act.) (luuniidid). 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.



▼ M6*Joonis 3.*

Kala keha, millel on näidatud lõikamiskoht, kui sugunäärmed fikseeritakse muus lahuses kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus. Sellisel juhul lõigatakse keha pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiga läbi (punane joon); peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks ette nähtud lahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse.



▼ **M6**

## 6. liide

**Vitellogeniini määramise puhul soovitatav proovi võtmise kord**

Tuleks olla hoolikas, et hoida ära isas- ja emaskalade vitellogeniiniproovide ristsaastumist.

**Meetod 1A. Tüsedä tömpnina vere võtmine sabaveenist/-arterist**

Pärast tuimestamist lõigatakse sabavars skalpelliteraga osaliselt läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Kui veri on kogutud, eraldatakse kiiresti plasma tsentrifuugimisega 3 minuti jooksul 15 000 g juures (või selle asemel 10 minuti jooksul 15 000 g ja 4 °C juures). Soovi korral võib määrata pärast tsentrifuugimist hematokriti. Plasmakogus eemaldatakse seejärel hematokriti määramiseks ette nähtud mikrokapillaartorust ja säilitatakse tsentrifuugitopsis 0,13 ühiku aprotiniini (proteaasiinhibiitor) juuresolekul – 80 °C juures, kuni on võimalik määrata vitellogeniin. Olenevalt tüsedä tömpnina suurusest (see sõltub soost), on ühest kalast kogutava plasma maht tavaliselt vahemikus 5–60 mikroliitrit (Jensen *et al.*, 2001).

**Meetod 1B. Tüsedä tömpnina vere võtmine südamest**

Teise võimalusena võib vere koguda südamepunktsiooniga, kasutades hepariniseeritud süstalt (1 000 ühikut hepariini ml kohta). Veri viiakse üle Eppendorfi katsutisse (mida hoitakse jää peal) ja seejärel tsentrifuugitakse (5 minutit, 7 000 g, toatemperatuuril). Plasma kantakse üle puhastesse Eppendorfi katsutitesse (aliquootidena, kui plasma maht seda võimaldab) ja külmutatakse viivitamata – 80 °C juures, kus seda säilitatakse kuni analüüsimiseni (Panter *et al.*, 1998).

**Meetod 2A. Jaapani riisikala maksa väljalõikamine**

Katses kasutatavate kalade eemaldamine katsekambrist

- (1) Katses kasutatavad kalad tuleks katsekambrist eemaldada väikse kahvaga. Olge hoolikas, et mitte pillata neid teise katsekambrisse.
- (2) Üldiselt tuleks katses kasutatavad kalad eemaldada järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahusti kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll. Lisaks tuleks ühest katsekambrist eemaldada kõigepealt kõik isaskalad ja seejärel allesjäänud emaskalad.
- (3) Iga kala sugu tehakse kindlaks väliste teiseste sootunnuste järgi (nt pära-kuime kaju).
- (4) Paigutage uuritavad kalad transpordimahutisse ja viige nad maksa väljalõikamiseks töölauale. Kontrollige katsekambri ja mahuti märgistuse õigsust ning veenduge, et katsekambrist võetud kalade arv ja katsekambrisse jäänud kalade arv vastavad eeldustele.
- (5) Kui kalade sugu ei ole võimalik tuvastada välise vaatlusega, eemaldatakse katsekambrist kõik kalad. Sellisel juhul tuleks nende sugu määrata sugunäärmete või teiseste sootunnuste vaatlemisega stereomikroskoobi abil.



**▼M6**

Maksa väljalõikamine

- (1) Viige kala väikse kahvaga transpordimahutist üle tuimastilahusesse.
- (2) Pärast seda, kui kala on tuimestatud, viige ta tavaliste pintsettidega üle filterpaberile (või paberrätikule). Kala võtmisel haarake pintsettidega peast, et mitte murda saba.
- (3) Pühkige vesi kala pealt filterpaberisse (või paberrätikusse).
- (4) Pange kala kõhuga ülespoole. Seejärel tehke lahkamiskääridega väike lõige risti üle kõhupoolse kaelaosa ja kõhu keskosa.
- (5) Pistke lahkamiskäärid väiksesse sisselõikesse ja lõigake kõht piki keskjoont lahti lõpusekattest saba pool asuvast punktist kuni päraku peapoolse servani. Olge ettevaatlik ja ärge torgake kääre liiga sügavale, et mitte vigastada maksa või sugunäärmeid.
- (6) Järgmised toimingud tehke stereomikroskoobi all.
- (7) Pange kala kõhuga ülespoole paberrätikule (või klaasist Petri tassile või objektiklaasile).
- (8) Venitage kõhuõõne seinad laiali täppistööks ette nähtud pintsettidega ja võtke siseelundid välja. Vajaduse korral võib siseelundid välja võtta ka kõhuõõne ühe seina kõrvaldamisega.
- (9) Teise paari täppispintsettide abil tooge esile maksa ja sapipõie ühenduskoht. Haarake kinni sapijuhast ja lõigake sapipõis ära. Olge ettevaatlik, et sapipõis ei läheks katki.
- (10) Haarake kinni söögitorust ja lõigake seedekulgla maksast samal viisil lahti. Olge ettevaatlik, et seedekulgla sisu ei voolaks välja. Lõigake sabapoolne seedekulgla osa pärakest lahti ja eemaldage seedekulgla kõhuõõnest.
- (11) Kärpige maksa kõrval olevat rasva ja muid kudesid. Olge ettevaatlik, et maks ei saaks kriimustada.
- (12) Haarake täppispintsettidega maksa väratipiirkonnast ja tõstke maks kõhuõõnest välja.
- (13) Pange maks objektiklaasile. Eemaldage vajaduse korral täppispintsettidega maksa pinnalt kogu rasv ja muu kude (nt kõhukelme).
- (14) Mõõtke maksa mass elektroonilise analüütilise kaaluga, kasutades taarana 1,5 ml mikrokatsuti. Märkige maksa mass töölehele (täpsusega 0,1 mg). Kontrollige mikrokatsuti etiketil oleva identifitseerimisteabe õigsust.
- (15) Sulgege maksa sisaldava mikrokatsuti kork. Pange mikrokatsuti jahutusega (või jääl olevasse) hoidjasse.
- (16) Pärast ühe maksa väljalõikamist puhastage lahkamisriistad või asendage need puhastega.

**▼M6**

(17) Eemaldage eespool kirjeldatud viisil maks kõikidelt transpordimahutis olevatelt kaladelt.

(18) Pärast seda, kui maks on eemaldatud kõikidelt transpordimahutis olnud kaladelt (st kõigilt katsekambris olnud isas- ja emaskaladelt), pange kõik maksaproovid katsutihoidjasse, millel on identifitseerimisandmetega etikett, ja hoidke seda sügavkülmikus. Kui maksale hakatakse eeltöötlust tegema varsti pärast väljalõikamist, viiakse proovid järgmisele töölauale jahutusega katsutihoidjas (või jääl olevas hoidjas).

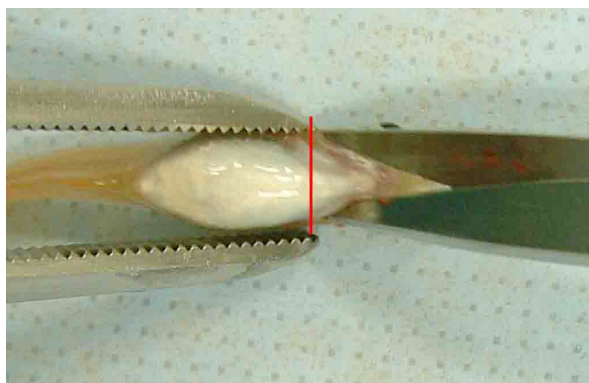
Pärast kaladelt maksa väljalõikamist on rümp valmis teiseste sootunnuste mõõtmiseks.

Proov

Säilitage maksaproove temperatuuril  $\leq -70$  °C, kui neile ei hakata eeltöötlust tegema vahetult pärast väljalõikamist.

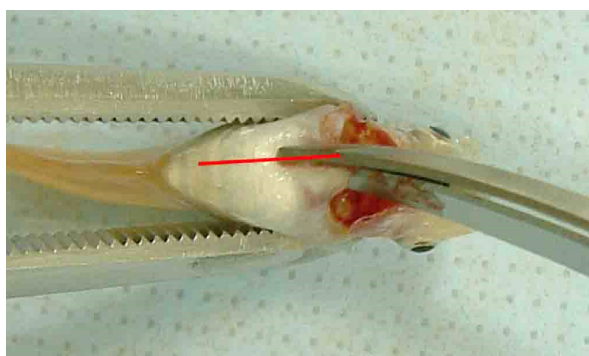
*Joonis 1.*

**Lõige kääridega tehakse vahetult rinnauidedest eespool.**



*Joonis 2.*

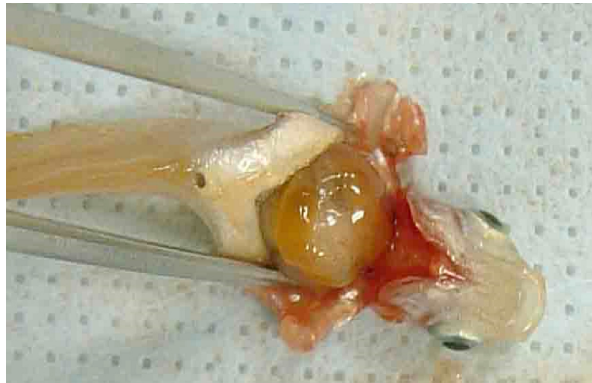
**Kõhu keskjooant mööda lõigatakse kõht lahti punktini, mis asub umbes 2 mm päarakust pea pool.**



▼ **M6**

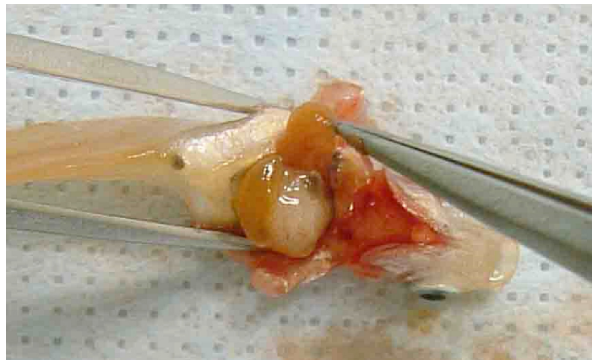
*Joonis 3.*

**Kõhuseinad lükatakse pintsettidega laiali, et paljastada maks ja muud siseelundid. (Teise võimalusena võib kõhuseinad küljele lahti tõmmatult kinnitada nõeltega.)**



*Joonis 4.*

**Maks eraldatakse pintsettide abil ümbritsevatest kudedest.**



*Joonis 5.*

**Sooled tõmmatakse ettevaatlikult pintsettidega eemale.**



▼ **M6**

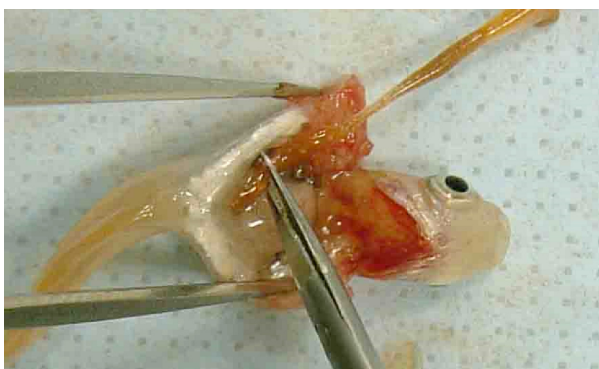
*Joonis 6.*

Soolestiku mõlemad otsad ja mesenteeriumimanused lõigatakse käärde abil lahti.



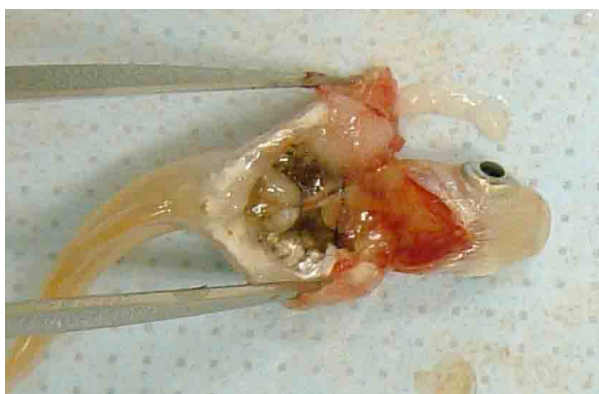
*Joonis 7 (emaskala).*

Emaskala puhul toimitakse samal viisil.



*Joonis 8.*

Lõpule viidud lahkamine.



**Meetod 2B. Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) maksa celtõõtlemine vitellogeniini määramiseks**

Võtke ELISA komplektist homogeniseerimispuhver ja jahutage see purustatud jää abil maha (lahuse temperatuurini  $\leq 4$  °C). Kui kasutatakse EnBio ELISA süsteemi homogeniseerimispuhvrit, sulatage lahus toatemperatuuril ja siis jahutage pudelit purustatud jääs.

**▼ M6**

Arvutage maksa jaoks vajalik homogeniseerimispuhvri maht, lähtudes maksa massist (lisage 50 µl homogeniseerimispuhvrit homogeniseeritava maksa mg kohta). Kui maksa mass on näiteks 4,5 mg, on vajalik homogeniseerimispuhvri kogus 225 µl. Koostage homogeniseerimispuhvri mahtude loetelu kõikide maksade jaoks.

Maksa ettevalmistamine eeltöötlemiseks

- (1) Võtke 1,5 ml mikrokatsuti maksaga sügavkülmikust välja vahetult enne eeltöötlemist.
- (2) Isaskalade maksa eeltöötlus peaks toimuma enne emaskalade maksa eeltöötlust, et hoida ära vitellogeniiniga saastumist. Peale selle peaks katserrühmade kalade maksade eeltöötlemine toimuma järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahusti kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll.
- (3) Sügavkülmikust teataval ajahetkel võetavate maksaproove sisaldavate 1,5 ml mikrokatsutite arv ei tohiks ületada proovide arvu, mida saab samaaegselt tsentrifugida.
- (4) Paigutage maksa sisaldavad 1,5 ml mikrokatsutid proovi numbri järgi jääga hoidjasse (maksa üles sulatada ei ole vaja).

Eeltöötluste tegemine

1. Homogeniseerimispuhvri lisamine

- (1) Vaadake homogeniseerimispuhvri mahtude loetelust, milline kogus puhvrit tuleb lisada konkreetsele maksaproovile, ja seadke mikropipett (mahuvahemikuga 100–1 000 µl) vajalikule mahule. Pange mikropipeti otsa puhas otsik.
- (2) Võtke vajalik homogeniseerimispuhvri kogus reaktiivipudelist ja lisage 1,5 ml mikrokatsutisse, milles on maks.
- (3) Lisage samal viisil homogeniseerimispuhver kõikidesse 1,5 ml mikrokatsutisse, milles on maks. Mikropipeti otsikut ei ole seejuures vaja vahetada uue vastu. Kui aga otsik saastub või tekib saastumise kahtlus, tuleks otsik välja vahetada.

2. Maksa homogeniseerimine

- (1) Pange mikrokatsutis homogeniseerimise seadmele uus nui.
- (2) Viige nui 1,5 ml mikrokatsutisse. Hoidke mikrokatsutis homogeniseerimise seadet nii, et maks oleks pressitud nuia ja 1,5 ml mikrokatsuti seina vahele.
- (3) Laske homogenisaatoril mikrokatsutis töötada 10–20 sekundit. Jahutage homogeniseerimise ajal 1,5 ml mikrokatsutit purustatud jääga.
- (4) Tõstke nui 1,5 ml mikrokatsutist välja ja jätke segu seisma umbes 10 sekundiks. Seejärel vaadeldge suspensiooni.
- (5) Kui suspensioonis on näha maksatükikesi, korrake toiminguid (3) ja (4), et saada rahuldav maksahomogenaat.

**▼ M6**

- (6) Jahutage maksasuspensiooni jääga katsutihoidjas kuni tsentrifuugimiseni.
  - (7) Vahetage homogenisaatori nui uue vastu enne iga homogeniseerimist.
  - (8) Homogeniseerige kõik maksad homogeniseerimispuhvriga vastavalt eespool kirjeldatud korrale.
3. Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugimine
- (1) Kontrollige, et jahutatud tsentrifuugikambri temperatuur oleks  $\leq 5$  °C.
  - (2) Pange 1,5 ml mikrokatsutid homogeniseeritud maksa suspensiooniga jahutatud tsentrifuugi (vajaduse korral tasakaalustage tsentrifuug).
  - (3) Tsentrifuugige homogeniseeritud maksa suspensiooni 13 000 g juures 10 minutit temperatuuril  $\leq 5$  °C. Kui supernatant eraldub korralikult, võite tsentrifugaaljõudu ja aega vastavalt vajadusele muuta.
  - (4) Pärast tsentrifuugimist kontrollige, et supernatant on piisaval määral eraldunud (pinnal – lipiidid, keskel – supernatant, alumine kiht – maksakude). Kui eraldumine ei ole piisav, tsentrifuugitakse suspensiooni uuesti samades tingimustes.
  - (5) Võtke kõik proovid jahutatud tsentrifuugist ja pange need proovi numbri järgi jääga katsutihoidjasse. Olge ettevaatlik, et tsentrifuugimisega eraldatud kihte mitte uuesti suspendeerida.
4. Supernatandi kogumine
- (1) Pange neli supernatandi säilitamiseks ette nähtud 0,5 ml mikrokatsutit katsutihoidjasse.
  - (2) Võtke mikropipetiga 30 µl supernatanti (keskmine kiht) ja viige see ühte 0,5 ml mikrokatsutitest. Olge ettevaatlik, et mitte võtta lipiide pinnalt ega maksakudet alumisest kihist.
  - (3) Võtke veel supernatanti ja pange see eespool kirjeldatud viisil veel kahte 0,5 ml mikrokatsutisse.
  - (4) Võtke mikropipetiga ülejäänud supernatant (võimaluse korral  $\geq 100$  µl). Seejärel pange see supernatant viimasesse 0,5 ml mikrokatsutisse. Olge ettevaatlik, et mitte võtta pinnalt lipiide ega alumisest kihist maksakudet.
  - (5) Sulgege 0,5 ml mikrokatsuti kork ja kirjutage supernatandi maht etiketile. Seejärel jahutage mikrokatsutid jääga katsutihoidjas viivitamata maha.
  - (6) Vahetage mikropipeti otsik uue vastu iga kord enne uue supernatandi võtmist. Kui otsiku külge kleepub suur kogus lipiide, vahetage otsik kohe, et hoida ära maksaekstrakti saastumist rasvaga.
  - (7) Pange kogu tsentrifuugitud supernatant nelja 0,5 ml mikrokatsutisse vastavalt eespool kirjeldatud korrale.

**▼ M6**

(8) Pärast supernatandi viimist 0,5 ml mikrokatsutitesse pange need kõik identifitseerimisetiketiga katsutihoidjasse ja seejärel külmutage need kohe sügavkülmikus. Kui vitellogeniini kontsentratsioonid mõõdetakse kohe pärast eeltöötlemist, hoidke üks 30 µl supernatanti sisaldav 0,5 ml mikrokatsuti jahutatult katsutihoidjas ja viige see töölauale, kus tehakse ELISA. Sellisel juhul pange ülejäänud mikrokatsutid katsutihoidjatesse ja külmutage need sügavkülmikus.

(9) Pärast supernatandi võtmist visake ülejäänud materjal ära.

**Proovi säilitamine**

Säilitage maksahomogenaadi supernatandiga 0,5 ml mikrokatsuteid temperatuuril  $\leq -70$  °C, kuni neid kasutatakse ELISA tegemiseks.

**Meetod 3A. Võõtdaanio vere võtmine sabaveenist/-arterist**

Kohe pärast tuimestamist lõigatakse sabavars risti läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Vere kogus on vahemikus 5–15 µl, sõltuvalt kala suurusest. Mikrokapillaartorusse lisatakse võrdne kogus aprotiniiniga puhvrit (6 µg/ml fosfaatpuhvriisandiga soolalahuses (PBS)) ja plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (5 minutit, 600 g). Plasma kogutakse katseklaasidesse ja säilitatakse temperatuuril  $-20$  °C kuni vitellogeniini või muude huvipakkuvate valkude määramiseni.

**Meetod 3B. Võõtdaanio vere võtmine südamepunktsiooniga**

Vere hüübimise ja valkude lagunemise takistamiseks võetakse proovid fosfaatpuhvriisandiga soolalahusesse (PBS), mis sisaldab hepariini (1 000 ühikut/ml) ja proteaaside inhibiitorit aprotiniini (2 trüpsiiniinhibiitori ühikut (TIU) / ml). Puhvri komponendina soovitatakse kasutada hepariini ammooniumsoola ja lüofiliseeritud aprotiniini. Vereproovi võtmiseks soovitatakse kasutada 1 ml süstalt, millel on fikseeritud peen nõel (nt Braun Omnikan-F). Süstlasse tuleks eelnevalt võtta puhverlahust (ligikaudu 100 µl), et iga kala väike verekogus süstlast puhverlahusega täielikult kätte saada. Vereproovid võetakse südamepunktsiooniga. Kõigepealt tuleks kala tuimestada MS-222-ga (100 mg/l). Nõuetekohane tuimestus võimaldab kasutajal eristada võõtdaanio südamelööke. Südame punkteerimisel hoidke süstla kolbi nõrga tõmbe all. Kogutava vere maht on vahemikus 20–40 mikrolitrit. Pärast südamepunktsiooni tuleks vere ja puhvri segu panna katsutisse. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (20 minutit, 5 000 g) ja seda tuleks säilitada  $-80$  °C juures kuni analüüsi tegemiseni.

**Meetod 3C. Standardne töökord võõtdaanio pea ja saba homogeniseerimiseks**

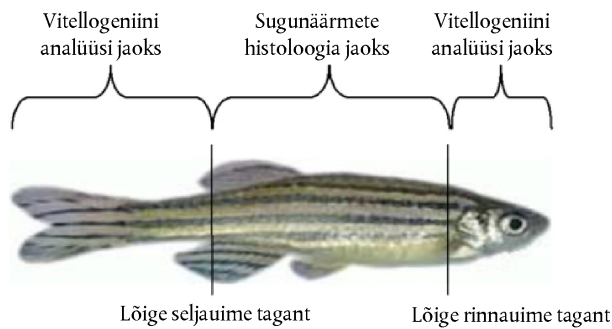
(1) Kalad tuimestatakse ja surmatakse humaansel viisil kooskõlas katsemeetodi kirjeldusega.

(2) Kala pea ja saba lõigatakse ära nii, nagu on näidatud joonisel 1.

Oluline märkus: kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks enne iga kala lõikamist loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga), et hoida ära kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalade saastumist emaskalade ja kemikaaliga kokku puutunud isaskalade vitellogeniiniga.

▼ **M6**

Joonis 1



- (3) Iga kala pea ja saba pannakse kokku ja nende summaarne mass mõõdetakse milligrammi täpsusega.
- (4) Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse nõusse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja külmutatakse  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures kuni homogeniseerimiseni või homogeniseeritakse kohe jää peal kahe plastikvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeniseerimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) Oluline märkus: katsutid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on kokkuviidavad vastava kehatükiga, mida kasutatakse sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks.
- (5) Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koemassiga võrreldes neljakordne kogus jääkülma homogeniseerimispuhvit (\*). Jätkatakse töötamist varrastega, kuni segu on homogeenne. Oluline märkus: iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.
- (6) Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja  $50\,000\text{ g}$  juures 30 minuti jooksul.
- (7) Pipetiga pannakse vähemalt kahte katsutisse  $20\text{ }\mu\text{l}$  supernatanti; pipeti ots viiakse allapoole pindmist rasvakihti ja supernatant eemaldatakse nii, et rasva- ja sademefraktsioon kaasa ei tuleks.
- (8) Katsuteid säilitatakse temperatuuril  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  kuni kasutamiseni.

(\*) **Homogeniseerimispuhver:**

- $50\text{ mM}$  Tris-HCl pH 7,4,  $1\%$  proteaasiinhibiitorite segu (Sigma):  $12\text{ ml}$  Tris-HCl pH 7,4 +  $120\text{ }\mu\text{l}$  proteaasiinhibiitorite segu;
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), näiteks Taani firmalt Bie & Berntsen;
- proteaasiinhibiitorite segu: Sigma (imetajate kudede jaoks), tootenumber P 8340.
- Märkus: homogeniseerimispuhver peaks olema valmistatud samal päeval. Pange kasutamise ajaks jää peale.



**▼ M6**

## 7. liide

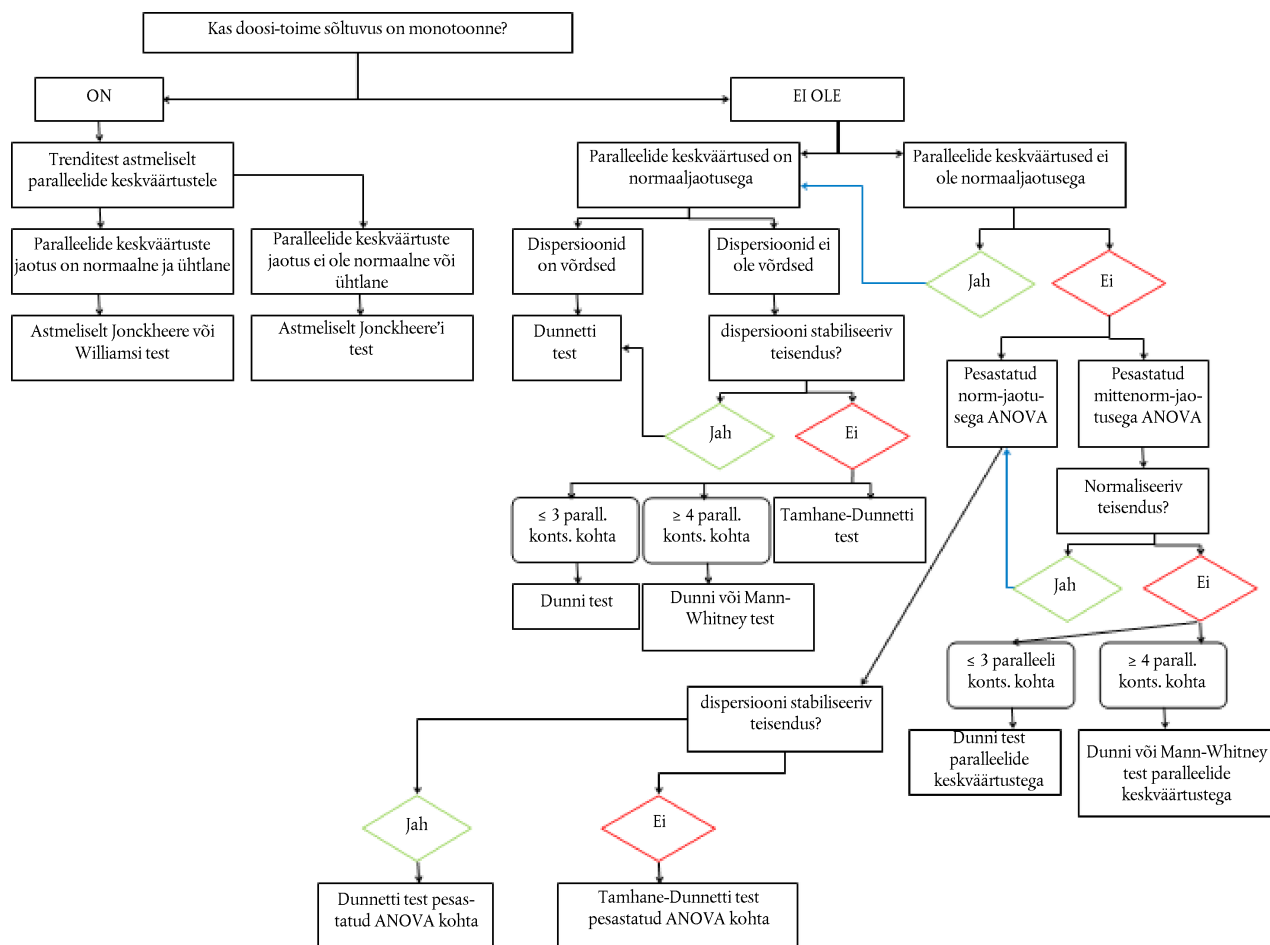
**Vitellogeniiniga rikastatud proovid ja eri analüüsid kasutatav vitellogeniini võrdlusstandard**

Igal vitellogeniinianalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga. Vitellogeniin, millest valmistatakse eri katsetes kasutatav võrdlusstandard, peab olema muust partiist kui see, mida kasutatakse katse kalibrimisstandardite tegemiseks.

Rikastud proov valmistatakse teadaoleva koguse võrdlusstandardi lisamisega kontrollrühma isaskalade plasmaproovile. Proovi rikastatakse nii, et saavutatakse vitellogeniini kontsentratsioon, mis on 10–100 korda suurem kui kontrollrühma isaskalade plasmas olev eeldatav kontsentratsioon. Kontrollrühma isaskalade plasma, mida rikastatakse, võib pärineda kas ühelt või mitmelt kalalt.

Kontrollrühma isaskalade rikastamata plasma osaproovi analüüsitakse vähemalt kahes paralleelaugus. Rikastatud plasmal analüüsitakse samuti vähemalt kahes paralleelaugus. Eeldatava kontsentratsiooni määramiseks liidetakse kontrollrühma isaskalade kahes rikastamata proovis sisalduva vitellogeniinikoguse keskvaartu- sele rikastamisel lisatud arvutuslik vitellogeniinikogus. Eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

Statistilise analüüsi otsustamis skeem



▼ **M6****C.38. KAHEPAIKSETE METAMORFOOSI KATSE****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 231 (2009). Vajadus töötada välja ja valideerida katse, mille abil saaks välja selgitada kemikaale, mis avaldavad mõju selgroogsete loomade kilpnäärmesüsteemile, tuleneb kartustest, et kemikaalid võivad juba keskkonnas oleva kontsentratsiooni juures avaldada kahjulikku mõju nii inimestele kui ka elusloodusele. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuuna olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja kemikaalid, mis võivad kahjustada endokriinsüsteemi, ja teha kindlaks nende mõju. Üks tegevussuund oli töötada välja katsejuhend sõeluuringu tegemiseks, millega selgitatakse välja kemikaale, mis mõjutavad selgroogsete kilpnäärmesüsteemi. Tehti ettepanek tõhustada selleks suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevast uuringut närilistel (vt käesoleva lisa peatükk B.7) ja kahepaiksete metamorfoosi katset (*Amphibian Metamorphosis Assay*, AMA). Tõhustatud katsemeetod B.7 on läbinud valideerimise ja läbivaadatud katsemeetod on avaldatud. Kahepaiksete metamorfoosi katse on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi, mis hõlmas laborisiseseid ja laboritevahelisi uuringuid, millega tõendati katsemeetodi asjakohasust ja usaldusväärsust (1, 2). Seejärel läbis katse valideerimine vastastikuse hindamise sõltumatute ekspertide rühma poolt (3). Käesolev katsemeetod põhineb kogemustel, mis on saadud kilpnääret mõjutavate kemikaalide väljaselgitamiseks kasutatava meetodi valideerimisel, ning mujal OECD riikides tehtud töödel.

**KATSE PÕHIMÕTE**

2. Kahepaiksete metamorfoosi katse on sõeluuring, mis on ette nähtud selliste kemikaalide empiiriliseks kindlakstegemiseks, mis võivad takistada hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telje normaalset talitlust. Nimetatud katse kujutab endast üldistatud selgroogsete mudelit, kuivõrd see põhineb hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telje evolutsioonis konserveerunud struktuuridel ja funktsioonidel. See on oluline katse, kuna kahepaiksete metamorfoos on hästi uuritud ja kilpnäärmest sõltuv protsess, mis reageerib hüpotalamuse-ajuripatsi-kilpnäärme telje mõjutavatele kemikaalidele ja on ainus olemasolev meetod, millega saab uurida kilpnäärme aktiivsust looma morfoloogilise arengu käigus.
3. Katse üldise korralduse kohaselt viiakse *Xenopus laevis*'e kulleled arengustaadiumis 51 kokkupuutesse uuritava kemikaali vähemalt kolme eri kontsentratsiooniga ja kontrolliks ka lahendusveega 21 päeva jooksul. Iga kokkupuuteuring tehakse nelja paralleelkatsega. Kulleste tihedus katse alustamise ajal on 20 kullest katseakvaariumi kohta iga katserühma puhul. Uuritavad näitajad on tagajäseme pikkus, vähemaa ninamikust kuni pärakuavani (*snout to vent length*, SVL), arengustaadium, märgkaal, kilpnäärme histoloogia ja igapäevased tähelepanekud surmajuhtumite kohta.

**MEETODI KIRJELDUS****Katses kasutatav liik**

4. *Xenopus laevis*'t kasvatatakse plaaniliselt kogu maailma laborites ja see liik on kaubanduslikult kergesti kättesaadav. Selle liigi esindajatesindajate paljunemist on kerge aastaringselt esile kutsuda inimese kooriongonadotropiini süstimisega ja saadavaid vastseid võib regulaarselt kasvatada valitud arengustaadiumideni suurtes kogustes, mis võimaldab kasutada

**▼ M6**

konkreetse arengujärguga seotud katse-eeskirja. Katses on soovitatav kasutada vastseid, kes on saanud samas laboris elavatelt täiskasvanud konnadelt. Vähem soovitatava asendusvõimalusena võib katse tegemist kavandav labor tellida mune või looteid ja lasta neil aklimatiseeruda; vastse-järkudes noorloomade tellimine katses kasutamiseks on lubamatu.

**Seadmed ja vajalikud vahendid**

5. Käesoleva katse tegemiseks on vaja järgmisi seadmeid ja vahendeid:
  - a) süsteem kemikaaliga kokkupuutesse viimiseks (vt kirjeldus allpool);
  - b) klaasist või roostevabast terasest akvaariumid (vt kirjeldus allpool);
  - c) paljundusnõud;
  - d) temperatuuri kontrollimise seade (nt jahutid või kütteseadmed, mis on reguleeritavad temperatuurile  $22 \pm 1$  °C);
  - e) termomeeter;
  - f) binokulaarne lahkamismikroskoop;
  - g) mikroskoobiga ühendatav digitaalne fotoaparaat vähemalt 4-megapikselse lahutusvõimega;
  - h) kujutise digiteerimise tarkvara;
  - i) Petri tass (nt  $100 \times 15$  mm) või võrreldava suurusega läbipaistvast plastikust kamber;
  - j) analüütiline kaal, millega on võimalik kaaluda kolme kümnendkoha (mg) täpsusega;
  - k) lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõtja;
  - l) pH-meeter;
  - m) valgustatuse mõõtja, mis võimaldab mõõta tulemust luksides;
  - n) mitmesugused klaasist laborinõud ja muud vahendid;
  - o) reguleeritavad pipetid (10–5 000 µl) või valik muid sama suurusvahemiku pipette;
  - p) uuritav kemikaal piisavas koguses uuringu läbiviimiseks, eelistatavalt ühest partiist;
  - q) analüüsivahendid, mis sobivad uuritava kemikaali määramiseks või leping analüüsiteenuste saamiseks.

**Kemikaali uuritavus**

6. Kahepaiksete metamorfoosi katse põhineb veekaudse kokkupuute eeskirjal, mille puhul uuritav kemikaal viiakse katsekambritesse läbivoolusüsteemi kaudu. Läbivoolumeetoditega saab aga uurida ainult piiratud hulka kemikaalitüüpe, ja uuritavus oleneb kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Seepärast tuleb enne käesoleva eeskirja kasutamist koguda kemikaali kohta teavet, mis on vajalik tema uuritavuse kindlakstegemiseks, ning tutvuda OECD juhendiga, milles käsitletakse veekeskkonna jaoks mürgisuse määramist uurimisel raskusi valmistavate ainete ja segude (4) puhul.

▼ **M6**

Omadused, mis näitavad, et kemikaali mõju veesüsteemides võib olla raske uurida: kõrge oktanooli-vee jaotuskoeffitsient ( $\log K_{ow}$ ), suur lenduvus, kalduvus hüdrolüüsiks, kalduvus fotolüüsiks tavalistes labori valgustustingimustes. Ka muud tegurid võivad olla asjakohased uuritava seisukohast ja neid tuleks määrata iga juhtumi puhul eraldi. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik korralikult uurida läbivoolukatsesüsteemis, võib kasutada staatilist uuendussüsteemi. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik uurida kummagi süsteemi abil, siis tuleb loobuda selle uurimisest käesoleva eeskirja järgi.

**Kokkupuutesüsteem**

7. Võimaluse korral tuleb eelistada läbivooluga lahjendussüsteemi staatilise uuendussüsteemi ees. Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused ei sobi läbivooluga lahjendussüsteemi kasutamiseks, võib selle asemel kasutada muud kemikaaliga kokkupuute süsteemi (nt staatilist uuendussüsteemi). Süsteemi kõik veega kokkupuutuvad osad peaksid olema klaasist, roostevabast terasest või polütetrafluoroetüleenist. Kasutada võib ka sobivaid plastikuid, kui need ei kahjusta tulemuste usaldusväärsust. Kokkupuutenõudeks peaksid olema klaasist või roostevabast terasest akvaariumid, mis on varustatud püsttorudega, mis tagavad nõus oleva vee ligikaudse ruumala vahemikus 4,0–10,0 liitrit ja minimaalse veesügavuse 10–15 cm. Süsteem peaks võimaldama kasutada kõiki kokkupuutekontsentratsioone ja teha kontrollkatset, nelja paralleelkatsega iga doosirühma kohta. Voolukiirus igas nõus peaks olema konstantne, nii et oleks võimalik säilitada bioloogilisi tingimusi kui ka kemikaaliga kokkupuute tingimusi (nt 25 ml/min). Kokkupuutenõud tuleks kokkupuutesüsteemis kohtadele paigutada juhuvaliku alusel, et vähendada asukohta, sealhulgas temperatuuri, valgustuse intensiivsuse jm väikeste erinevuste võimalikku mõju. Kasutada tuleks luminofoorlampe ning valgustusperioodi 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust; valguse intensiivsus vee pinnal peab olema 600–2 000 luksit (luumen/m<sup>2</sup>). Igas katsenõus tuleks vesi hoida temperatuuril 22 ± 1 °C, pH vahemikus 6,5–8,5 ning lahustunud hapniku (DO) kontsentratsioon > 3,5 mg/l (> 40 % õhu küllastuskontsentratsioonist). Vee temperatuuri, pH-d ja lahustunud hapniku kontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kord nädalas; temperatuuri tuleks eelistatavalt mõõta pidevalt vähemalt ühes katseanumas. 1. liites on kirjeldatud katsetingimusi, mida tuleks kasutada käesoleva eeskirja järgi katse tegemisel. Lisateavet läbivooluga kokkupuutesüsteemi ja/või staatilise uuendussüsteemi koostamise kohta võib leida katsejuhendis *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) ja üldistes veekeskonna suhtes mürgisuse määramise juhendites.

*Vee kvaliteet*

8. Kasutada võib iga kohapeal kättesaadavat vett (nt allikavesi või aktiivsoel filtritud kraanivesi), mis võimaldab *X. laevis*'e kulleste normaalset kasvu ja arengut. Kuna kohaliku vee kvaliteet võib olenevalt asukohast oluliselt erineda, tuleb teha vee kvaliteedi analüüs, eriti juhul, kui puuduvad varasemad andmed selle vee kasutamise kohta *Xenopus*'e kasvatamiseks. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sellele, et vesi ei sisaldaks vaske, kloori ja kloramiini, mis on konnade ja kulleste jaoks mürgised. Lisaks soovitatakse vees analüüsida (joogivee desinfitseerimise kõrvalsaaduste) fluoriidi, perkloriidi ja kloriidi sisaldust, kuna kõik need anioonid on kilpnäärmes

▼ **M6**

joodi transportiva süsteemi substraadid ja nendest ükskõik millise kõrgem sisaldus muudab uuringu tulemuse mitte usaldatavaks. Analüüs tuleks teha enne katse algust ja katse ajal ei tohiks vees neid anioone tavaliselt olla.

*Jodiidi kontsentratsioon katsevees*

9. Selleks et kilpnääre saaks sünteesida kilpnäärmehormoone, peab vastsele olema vee ja sööda kaudu kättesaadav piisav kogus jodiidi. Praegu ei ole empiirilisi suuniseid minimaalse jodiidi kontsentratsiooni kohta. Siiski võib jodiidi kättesaadavus mõjutada kilpnäärmesüsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele teguritele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust; see aspekt väärib tähelepanu kilpnäärme histopatoloogia alaste tulemuste tõlgendamisel. Seepärast tuleb katsearuandes ära märkida katseks kasutatud vees mõõdetud jodiidi kontsentratsioonid. Olemasolevate valideerimisuuringu tulemuste põhjal on käesolev eeskiri andnud häid tulemusi, kui jodiidi (I<sup>-</sup>) sisaldus katseks kasutatud vees oli vahemikus 0,5–10 µg/l. Ideaaljuhul peaks jodiidi kontsentratsioon katseks kasutatud vees olema vähemalt 0,5 µg/l. Kui katseks kasutatav vesi saadakse deioniseeritud veest kunstlikult, tuleks sellele lisada jodiidi minimaalses kontsentratsioonis 0,5 µg/l. Katsearuandesse tuleks märkida joodi või muude soolade täiendav lisamine katseks kasutatud vette.

**Loomade pidamine***Täiskasvanute hooldus ja järglaste saamine*

10. Täiskasvanud konnade hooldamine ja nendelt järglaste saamine toimub vastavalt üldistele suunistele ja lugeja leiab selle kohta üksikasjalikuma teabe konnaloote teratogeneesi katse (*Frog Embryo Teratogenesis Assay, FETAX*) juhendist (6). Sellistes üldistes suunistes on esitatud näide sobivate hooldamis- ja järglaste saamise meetodite kohta, kuid ranget kinnipidamist neist suunistest ei nõuta. Paljunemise algatamiseks süstitakse kolmele kuni viiele täiskasvanud emas- ja isaslooma paarile inimese kooriongonadotropiini (hCG). Emas- ja isasisenditele süstitakse vastavalt ligikaudu 800–1 000 RÜd ja 600–800 RÜd hCG-d, mis on lahustatud 0,6–0,9 % soolalahuses. Paljunduspaare hoitakse suurtes nõudes, häirimata ja püsivates tingimustes, et esile kutsuda kopulatsiooni (ampleks). Igas paljuõunõus peaks olema roostevabast terasest või plastikvõrgust topelt-põhi, läbi mille munamassid kukuvad nõu põhjale. Hilisel pärastlõunal süstitud konnad koevad enamiku mune järgmise päeva hommikupoolikul. Kui on koetud ja viljastatud piisav kogus mune, eemaldatakse täiskasvanud isendid paljuõunõust.

*Vastsete eest hoolitsemine ja vastsete valimine*

11. Pärast täiskasvanud isendite eemaldamist paljuõunõust kogutakse munad ja hinnatakse nende eluvõimet, kasutades esindavat loodete valikut kõiki-dest paljuõunõudest. Parim kudu (parimad kuded) (soovitatakse valida 2-3 kudu nende kvaliteedi hindamiseks) valitakse välja loodete elujõulisuse ja piisava arvu (vähemalt 1 500 loodet) põhjal ja tuleks säilitada. Kõik uuringus kasutatavad organismid peavad pärinema ühest kudemissündmusest (s.o kodusid ei tohi kokku segada). Looded viiakse üle suurele lame-dale vaagnale või pannile ning kõik ilmselt surnud või ebanormaalsed munad (vt määratlus (5)) kõrvaldatakse pipeti või silmapipeti abil. Kõigi kolme kudu terved looted viiakse üle kolme eraldi koorumisnõusse. Neli päeva pärast koorumisnõusse üleviimist valitakse välja parim kudu, arves-tades elujõulisust ja koorumise edukust, ning vastsed kantakse üle kasva-tusnõudesse, mida võetakse vajalik arv ja milles temperatuur on 22 ± 1 °C.

▼ **M6**

Lisaks võetakse veel täiendavaid vastseid lisanõudesse, et kasutada neid asendusmaterjalina, kui kasvatusnõudes peaks osa vastseid esimese nädala jooksul surema. Selliselt toimides hoitakse isendite tihedust ühtlasena ja sellega vähendatakse ühe kudu kohordis esinevaid arenguerinevusi. Kõiki kasvatusnõusid tuleb sifoonimisega iga päev puhastada. Ettevaatusabinõuna tuleb eelistatult kasutada vinüülist või nitrilkkumist, mitte lateksist kindaid. Esimesel nädalal tuleks iga päev kõrvaldada surnud vastsed ja asendada need asendusvastsetega, et säilitada organismide tihedust. Vastseid tuleks sööta vähemalt kaks korda päevas.

12. Kokkupuute-eelse etapi jooksul harjutatakse kulleseid tegeliku kokkupuuteetapi tingimustega nagu sööda liik, temperatuur, valguse ja pimeduse vaheldumise tsüklid ja kasvukeskkond. Seepärast on soovitatav, et sama kasvukeskkonna- ja lahjendusvett kasutataks nii kokkupuute-eelsel ajal kui ka kokkupuute ajal. Kui kulleste kasvatamiseks kokkupuute-eelsel etapil kasutatakse staatilist kasvatamissüsteemi, tuleks kasvukeskkond täielikult asendada vähemalt kaks korda nädalas. Tuleks vältida vastsete liigset tihedust kokkupuute-eelsel etapil, mis põhjustab „trügimist“, kuna sellised efektid võivad märgatavalt mõjutada kulleste arengut edasisel katseetapil. Seepärast ei tohiks kasvatamistihedus olla suurem kui ligikaudu neli kullest kasvukeskkonna liitri kohta (staatilise kokkupuutesüsteemi puhul) või kümme kullest kasvukeskkonna liitri kohta (kusjuures läbivoolu kiirus on näiteks 50 ml/min kokkupuute-eelsel etapil või kasvatamissüsteemis). Sellistes tingimustes peaksid kulleled arenema staadiumist 45/46 staadiumini 51 kaheistkümnepäevaga. Sellist põhipopulatsiooni esindavat kulleste valikut tuleks iga päev uurida arengustaadiumi määramiseks, et leida sobiv aeg kemikaaliga kokkupuute alustamiseks. Kullestele stressi ja traumade tekitamine, eriti nende ümbertõstmise, akvaariumi puhastamise ja vastsete käsitsemise ajal tuleb püüda viia miinimumini. Tuleb vältida stressi tekitavaid tingimusi, nagu vali ja/või lakkamatu müra, akvaariumile koputamine, akvaariumi vibreerimine, liigne askeldamine laboriruumis ja keskkonnatingimuste (valgustatus, temperatuur, pH, lahustunud hapniku sisaldus, vee voolukiirus, jne) järsud muutused. Kui kulleled ei jõua 17 päevaga pärast viljastamist staadiumini 51, tuleb üheks võimalikuks süüdlaseks pidada liigset stressi.

*Vastsete kasvatamine ja söötmine*

13. Kulleseid söödetakse müügil oleva kullsesöödaga, mida kasutati valideerimisuuringus (vt ka 1. liide), kogu kokkupuute-eelsel ajal (pärast Nieuwkoop ja Faberi (NF) staadiumi 45/46 (8)) ja kogu 21 päeva kestva katseperioodi jooksul; võib kasutada ka muud sööta, mille kohta on tõendatud, et kahepaiksete metamorfoosi katses annab see sama häid tulemusi. Kokkupuute-eelse perioodi söötmissrežiim tuleks hoolikalt kohandada vastavaks arenevate kulleste vajadustele. See tähendab, et vastkoorunud kullestele tuleb pakkuda väikseid söödakoguseid mitu (vähemalt kaks) korda päevas. Liigseid söödakoguseid tuleks vältida, et *i*) säilitada vee kvaliteeti ja *ii*), et vältida lõpusefiltrite ummistumist söödaosakeste ja detriidiga. Valideerimisuuringus kasutatud kullsesööda igapäevast kogust

▼ **M6**

tuleks suurendada vastavalt kulleste kasvule kuni ligikaudu 30 mg-ni looma kohta päevas enne katse alustamist. Valideerimisuringud on näidanud, et kõnealune müügil olev sööt tagab *X. laevis*'e kulleste korraliku kasvu ja arengu ning et see koosneb peentest osakestest, mis püsivad vees kaua aega hõljuvas olekus ning uhutakse lõpuks veevooluga nõust välja. Seepärast tuleks päevane söödakogus jagada väiksemateks osadeks, mida söödetakse kullestele vähemalt kaks korda päevas. Kõnealuse sööda kasutamise kord on esitatud tabelis 1. Söödetavad kogused tuleks registreerida. Sööta võib anda kuivana või valmistada lahjendamisveega põhilahus ja sööta sellega. Sellist põhilahust tuleks uuesti valmistada üle päeva ja muul kui kasutamise ajal hoitakse seda temperatuuril 4 °C.

Tabel 1.

**Kahepaiksete metamorfoosi katse valideerimisuringu elupuhuses järgus kasutatud *X. laevis*'e kulleste kaubandusliku sööda kasutamise kord läbivoolumeetodi tingimustes**

Uuringu päev	Söödaratsioon (mg sööda looma kohta päevas)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

**Analüütiline keemia**

14. Enne uuringu tegemist tuleb hinnata uuritava kemikaali stabiilsust, kasutades olemasolevat teavet kemikaali lahustuvuse, lagundatavuse ja lenduvuse kohta. Igast paralleelkatsenõust tuleb igal kontsentratsioonil võtta proovid analüütilise keemia analüüside jaoks katse alustamise päeval (katse 0-päev) ja seejärel katse jooksul igal nädalal, et saada vähemalt neli proovi. Samuti on soovitatav analüüsida iga uuritavat kontsentratsiooni süsteemi ettevalmistamise ajal, enne katse alustamist, et kontrollida süsteemi toimimist. Lisaks on soovitatav analüüsida põhilahuseid, kui neid vahetatakse, eriti kui põhilahuse ruumala ei ole piisavalt suur, et tagada vajaliku kemikaalikoguse olemasolu keskkonnas kogu rutiinse proovivõtu-perioodi kestel. Kui kemikaali ei ole võimalik määrata mõne katses kasutatava kontsentratsiooni või kõigi kontsentratsioonide juures, tuleb määrata kemikaali sisaldus põhilahustes ja registreerida süsteemi voolukiirused, et saaks arvutada nimikontsentratsioonid.

**Kemikaali lisamine**

15. Meetod, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks süsteemi, sõltub kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Vees lahustuvat kemikaali võib lahustada katsekeskkonna alikvootides, mis võimaldab kemikaali lisada uuritava kontsentratsiooni saavutamiseks läbivoolusüsteemis. Kui kemikaal on toatemperatuuril vedel ja vees halvasti lahustuv, saab seda lisada vedelik-vedeliku küllastusseadme meetoditega. Kui kemikaal on toatemperatuuril tahke ja vees halvasti lahustuv, saab seda lisada klaasvatt-täidisega küllastuskoloni abil (7). Parem oleks kasutada kandaineta katse-süsteemi, kuid uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalise-keemilised omadused, mistõttu tõenäoliselt on vaja kasutada erinevaid meetodeid



▼ **M6**

kemikaali viimiseks vette, milles korraldatakse kokkupuude kemikaaliga. Tuleks püüda toime tulla ilma lahustita või kandaineta, kuna: *i*) teavad lahustid võivad olla mürgised või avaldada ebasoovitavat või ootamatut endokrinoloogilist mõju, *ii*) kemikaalide uurimine kõrgemal kontsentratsioonil kui nende lahustuvus vees (nagu lahustite kasutamisel võib sageli juhtuda) võib põhjustada vigu tegeliku kontsentratsiooni määramisel ja *iii*) lahusti kasutamine pikaajalises katses võib põhjustada olulist biokilede tekkimist, mis on seotud mikroobide tegevusega. Raskusi valmistava kemikaali uurimisel võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning tuleb arvesse võtta OECD juhendit raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimise kohta (4), et teha kindlaks parim meetod. Lahusti valiku määravad kemikaali füüsikalises-keemilises omadused. Veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimisel on edukalt kasutatud lahustina atsetooni, etanooli, metanooli, dimetüülformamiidi ja trietüleenglükooli. Kui kandainena kasutatakse lahustit, peab lahusti kontsentratsioon olema tunduvalt allpool pikaajaliselt täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni (NOEC); OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100 µl/l; hiljutises ülevaates (12) on soovitatud kasutada lahusti kontsentratsiooni 20 µl lahjendamiseks kasutatava vee 1 liitri kohta. Kui kandainena kasutatakse lahustit, tuleks hinnata vastavaid lahusti kontrollkatseid, lisaks lahustivabadele kontrollkatsetele (puhas vesi). Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik vee kaudu manustada, kas kemikaali füüsikalises-keemiliste omaduste (madal lahustuvus) või piiratud kättesaadavuse tõttu, võib kaaluda kemikaali manustamist söödaga. Söödaga manustamise teel saavutatud kokkupuute kohta on tehtud eeltöid, kuid sellist kokkupuuteviisi tavaliselt ei kasutata. Meetodi valimine tuleks dokumenteerida ja seda tuleks analüüsi tegemisega kontrollida.

**Uuritavate kontsentratsioonide valimine***Suurima uuritava kontsentratsiooni määramine*

16. Kõnealuse katse puhul peaks suurima uuritava kontsentratsiooni määrama uuritava kemikaali lahustuvuse piir, ägedat mürgitust põhjustava kemikaali korral suurim talutav kontsentratsioon või tuleks valida kontsentratsioon 100 mg/l, olenevalt sellest, milline neist on väiksem.
  
17. Uuritava kemikaali suurim talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suurem ägeda mürgituse tõttu on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi kasutamiseks on vaja empiirilisi andmeid suuremuse kohta ägeda mürgituse tagajärjel, millest saab hinnata suurima talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja tavaliselt nõuab see professionaalseid teadmisi. Kuigi suurima talutava kontsentratsiooni määramiseks on tehniliselt võib-olla kõige õigem kasutada regressioonimudeleid, võib selle kontsentratsiooni hea lähenduse leida olemasolevatest andmetest ägeda mürgisuse kohta: võetakse 1/3 keskmise letaalse kontsentratsiooni LC<sub>50</sub> väärtusest. Katses kasutatava liigi kohta ei tarvitse ägeda mürgisuse andmeid siiski olemas olla. Kui liigispetsiifilisi ägeda mürgisuse andmeid ei ole, võib teha 96-tunnise LC<sub>50</sub> katse kullsetega, kes on esindavad (st samas arengustaadiumis) kahepaiksete metamorfoosi katses kasutatavate kulleste suhtes. Kui on olemas andmed muude liikide (nt LC<sub>50</sub> kalade või muu kahepaikseliigi) kohta, võib kasutada asjatundlikku hindamist, et liikidevahelise ekstrapolatsiooniga hinnata suurim talutav kontsentratsioon.
  
18. Kui kemikaal ei ole akuutselt toksiline ja on lahustuv üle 100 mg/l, tuleks suurimaks katses kasutatavaks kontsentratsiooniks võtta 100 mg/l, kuna seda loetakse enamasti „praktiliselt mittetoksiliseks.”

**▼ M6**

19. Kui läbivoolumeetodiga ei ole võimalik saavutada suurimat talutavat kontsentratsiooni, võib kasutada staatilist uuendussüsteemi, kuigi see ei ole soovitatav meetod. Kui kasutatakse staatilisi uuendamismeetodeid, tuleb dokumenteerida uuritava kemikaali kontsentratsiooni stabiilsus; kontsentratsioon peab püsima lubatava vea piirides. Uuendamise ajavahemikuks soovitatakse võtta 24 tundi. Uuendamise ajavahemik, mis on pikem kui 72 tundi, ei ole lubatav. Lisaks tuleks iga uuendamisajavahemiku lõpus vahetult enne uuendamist mõõta vee kvaliteedi näitajaid (nt lahustunud hapniku sisaldus, temperatuur, pH jne).

*Uuritavate kontsentratsioonide vahemik*

20. On vaja *vähemalt* kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja kontrollkatset puhta veega (ning kandeaine kontrollkatset, kui kandeaine on vajalik). Katses kasutatud suurima ja väikseima kontsentratsiooni minimaalne erinevus peaks olema umbes üks suurusjärk. Kasutatavate dooside suhe võib olla kuni 0,1 ja võib minimaalselt olla 0,33.

**MÄÄRAMISE KÄIK****Katse alustamine ja läbiviimine***Nullpäev*

21. Kokkupuudet tuleks alustada siis, kui piisav arv kulleseid kokkupuute-eelses populatsioonis on jõudnud arengustaadiumi 51 vastavalt Nieuwkoopile ja Faberile (8) ja nende vanus on kuni 17 päeva pärast viljastamist. Katseloomade valimiseks võetakse põhipopulatsioonist terveid normaalse välimusega kulleseid ühte anumasse, milles on piisav kogus lahjendusvett. Arengustaadiumi määramiseks tuleks kulleseid üksikshaaval võtta kogumisnõust väikse võrgu või võrkfiltriga ja kanda läbipaistvasse mõõtmiskambris (nt 100 millimeetrine Petri tass), milles on lahjendusvesi. Staadiumi määramisel on eelistatav mitte kasutada tuimastust, kuid üksikshaaval võib kulleseid enne käitlemist tuimastada, kasutades trikaiinmetaansulfonaati (100 mg/l) (nt MS-222), mis on sobivalt puhverdatud naatriumvesinikkarbonaadiga (pH 7,0). Kui tuimastust (näiteks MS-222-ga) kasutatakse, tuleb selle meetodi korralik rakendamine omandada kogenud laboris ja seda tuleks kirjeldada katsetulemuste esitamise juures. Loomi tuleks selle ülekandmise ajal käidelda ettevaatlikult, et vüa käitlemisest tingitud stress miinimumini ja vältida nende vigastamist.
22. Looma arengustaadium määratakse kindlaks binokulaarse lahkamismikroskoobi abil. Arengustaadiumi lõpliku varieeruvuse vähendamiseks on oluline viia staadiumi määramine läbi võimalikult täpselt. Vastavalt Nieuwkoopile ja Faberile (8) on staadiumis 51 olevate loomade väljavalmisel esmatähtsaks arengunäitajaks tagajäseme morfoloogia. Tagajäseme morfoloogilisi näitajaid tuleks uurida mikroskoobi all. Kulleste arengustaadiumi kohta põhjaliku teabe saamiseks tuleks kasutada Nieuwkoopile ja Faberi juhendit (8), kuid staadiumi saab usaldatavalt ära määrata silmatorkavate morfoloogiliste tunnuste järgi. Arengustaadiumi määramise lihtsustamiseks ja standardimiseks kogu katse ajal võib kasutada järgmist tabelit, mille kohaselt määratakse silmatorkavad morfoloogilised tunnused, mis on seotud eri staadiumidega, kui eeldatakse normaalset arengut.

## ▼ M6

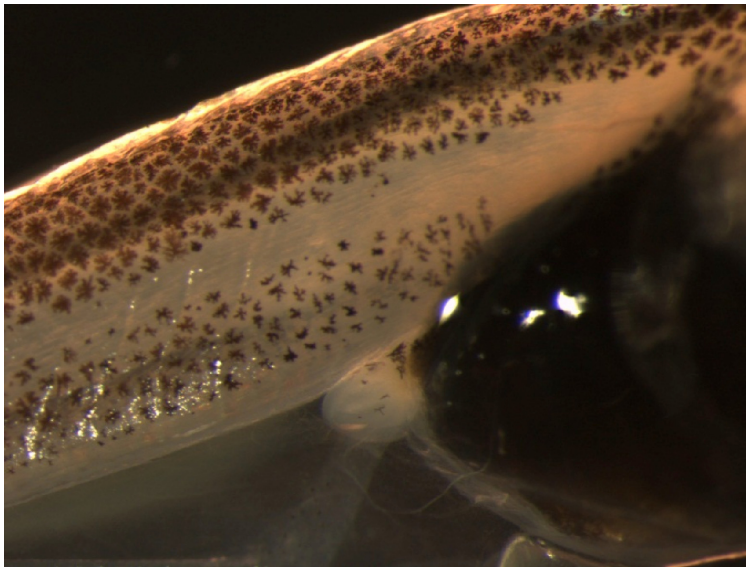
Tabel 2.

**Silmatorkavad morfoloogilised tunnused arengustaadiumi määramiseks Nieuwkoop ja Faberi juhendi järgi.**

Silmatorkavad morfoloogilised tunnused	Arengustaadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Tagajäse	X	X	X	X	X	X	X									
Esijäse						X	X	X	X	X						
Kraniofatsiaalne struktuur										X	X	X	X			
Haistmisnärvimorfoloogia											X	X	X			
Saba pikkus													X	X	X	X

23. Katse alustamisel peaksid kõik kulleused olema staadiumis 51. Selle staadiumi kõige silmatorkavam morfoloogiline tunnus on tagajäse morfoloogia, mis on näidatud joonisel 1.

Joonis 1.

***Xenopus laevis*'e kullese tagajäse morfoloogia arengustaadiumis 51.**

24. Lisaks arengustaadiumi valikule võib katseloomi soovi korral valida veel suuruse järgi. Selleks tuleks nullpäeval mõõta keha kogupikkus (mitte vahemaa ninamikust pärakuavani) ligikaudu 20st kullesest koosneva alarühma jaoks, kes on Nieuwkoop ja Faberi (NF) staadiumis 51. Pärast keskmise keha kogupikkuse arvutamist selle kulleste alarühma jaoks võib katseloomade kogupikkuse jaoks seada ülem- ja alampiiri vahemikus keskmine pikkus  $\pm 3$  mm (staadiumi 51 kulleste keskmine keha kogupikkus on vahemikus 24,0–28,1 mm). Siiski määratakse iga katselooma küpsus katses osalemiseks peamiselt arengustaadiumi järgi. Kulleused, kellel esineb selgelt nähtavaid väärendeid või vigastusi, tuleks katsest välja jätta.

▼ **M6**

25. Kullest, kes vastavad eespool kirjeldatud arengustaadiumi etapi kriteeriumidele, pannakse puhta kasvatamisveega nõusse, kuni staadiumi määramine on lõpule viidud. Kui staadiumide määramine on lõpetatud, jaotatakse kullest juhulikult uuritava kemikaaliga kokkupuute nõudesse, kuni igas nõus on 20 kullest. Iga kokkupuutenõu loomad vaadatakse seejärel üle ebanormaalse välimuse suhtes (näiteks vigastused, ebanormaalne ujumisviis, jne). Selgelt haiglase välimusega kullest tuleks kokkupuutenõudest kõrvaldada ja asendada värskest valitud kullestega kogumisnõust.

**Vaatlused**

26. Põhjalikum teave katse lõpetamise korra ja kullest töötlemise kohta on esitatud kahepaiksete kilpnäärme histoloogiat käsitlevas OECD juhenddokumendis (9).

*7. päeval tehtavad mõõtmised*

27. Igast paralleelkatsenõust eemaldatakse 7. päeval viis juhulikult valitud kullest. Kasutatav juhuliku valiku kord peaks tagama igale katseloomale ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Seda on võimalik saavutada iga juhuvalikumeetodiga, kuid selle jaoks tuleb kõik kullest püüda võrku. Valimata jäänud kullest lastakse esialgsesse nõusse tagasi ja väljavalitud kullest surmatakse humaanselt näiteks MS-222 lahuses kontsentratsiooniga 150–200 mg/l, mille pH on naatriumvesinikkarbonaadi juuresolekul viidud 7,0 juurde. Humaanselt surmatud kullest loputatakse veega ja pühitakse kuivaks; seejärel määratakse kehamass milligrammi täpsusega. Iga kullese puhul määratakse tagajäseme pikkus, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani ja (binokulaarse lahkamismikroskoobi abil) arengustaadium.

*21. päeval tehtavad mõõtmised (katse lõpetamine)*

28. Katse lõpetamisel (21. päeval) eemaldatakse ülejäänud kullest katsenõudest ja surmatakse humaanselt näiteks MS-222 lahuses (150–200 mg/l), mis on puhverdatud naatriumvesinikkarbonaadiga, nagu eespool kirjeldatud. Kullest loputatakse veega ja pühitakse kuivaks; seejärel määratakse kehamass milligrammi täpsusega. Iga kullese puhul määratakse arengustaadium, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani ja tagajäseme pikkus.
29. Kõik vastsed paigutatakse Davidsoni fikseerimislahusesse 48–72 tunniks, kas kogukehaproovina või kärbitud, aga alalõuga sisaldava pea kudede proovina histoloogiliseks hindamiseks. Histopatoloogiliste uuringute jaoks valitakse kokku viis kullest igast paralleelkatsenõust. Kuna folliikulirakkude kõrgus sõltub arengustaadiumist (10), on histoloogiliseks analüüsiks kullest valimisel kõige sobivam meetod kasutada alati samas staadiumis olevaid isendeid, kui see on võimalik. Samas arengustaadiumis isendite valimiseks tuleb enne nende väljavalmist ja andmete saamiseks ja säilitamiseks vajalikku edasist töötlemist määrata kõigi kullest arengustaadium. See on vajalik, kuna arengus ilmneb normaalne divergents, mille tõttu igas paralleelkatsenõus tekib erinev jaotus arengustaadiumide järgi.
30. Histopatoloogiliseks analüüsiks valitud loomi (n = 5 igast paralleelkatsenõust) tuleks võrrelda kontrollkatse (ühendatud paralleelkatsed) mediaanses arengustaadiumis olevate loomadega, kui see on võimalik. Kui paralleelkatsenõus on rohkem kui viis kullest sobivas staadiumis, valitakse viis kullest juhuvalikuga.

▼ **M6**

31. Kui paralleelkatsenõus on vähem kui viis kullest sobivas staadiumis, võetakse lähimast madalamast või kõrgemast arengustaadiumist viis juhuslikult valitud kullest, et jõuda valimi üldsuuruseni viis kullest paralleelkatse kohta. Eelistatavalt tuleks otsus – võtta valimisse täiendavaid vastseid lähimast madalamast või kõrgemast arengustaadiumist – teha üldise hinnangu põhjal, milline on kulleste jaotus arengustaadiumide järgi kontrollkatsenõudes ja kemikaaliga kokkupuute uurimise nõudes. See tähendab, et kui kemikaaliga kokkupuute pidurdab arengut, peaksid täiendavad kulleled olema võetud lähimast madalamast staadiumist. Kui kemikaaliga kokkupuute aga kiirendab arengut, peaksid täiendavad kulleled olema võetud lähimast kõrgemast staadiumist.
32. Kui kokkupuute uuritava kemikaaliga tekitab suuri muutusi kulleste arengus, ei tarvitse kemikaaliga kokkupuutesse viidud rühmadel olla arengustaadiumide jaotuse poolest kontrollkatse arvatud mediaanse arengustaadiumiga kattuvust. Ainult sellistel juhtudel tuleks valimismeetodit muuta ja kasutada kontrollrühma mediaansest staadiumist erinevat arengustaadiumi, et saada arengustaadiumi järgi sobitatud proovid kulleste kilpnäärme histopatoloogia uurimiseks. Lisaks sellele, kui arengustaadiume ei saa määrata (nt asünkroonia tõttu), tuleks igast paralleelkatsenõust võtta juhuslikult viis kullest histoloogilise analüüsi jaoks. Aruandes tuleks selgitada, milliste põhimõtete alusel võeti valimisse kulleled, kes on muus arengustaadiumis kui kontrollrühma mediaanne arengustaadium.

**Bioloogiliste näitajate määramine**

33. 21-päevase kokkupuuteetapi ajal mõõdetakse tähtsamaid näitajaid 7. ja 21. päeval, kuid katseloomi on vaja jälgida iga päev. Tabelis 3 on antud ülevaade mõõdetavatest näitajatest ja vastavatest vaatlusaegadest. Üksikasjalikum teave, kuidas apikaalsete näitajate mõõtmisi ja histoloogilisi hindamisi tehniliselt teostatakse, on esitatud OECD juhenddokumendis (9).

Tabel 3.

**Tähtsaimate näitajate määramise ajad kahepaiksete metamorfoosi katses.**

Apikaalsed näitajad	Iga päev	7. päev	21. päev
— suremus	•		
— arengustaadium		•	•
— tagajäseme pikkus		•	•
— vahemaa ninamikust kuni pärakuavani		•	•
— keha märgmass		•	•
— kilpnäärme histoloogia			•

▼ **M6****Apikaalsed näitajad**

34. Kahepaiksete metamorfoosi katse apikaalsed näitajad on arengustaadium, tagajäseme pikkus, ninamiku-pärakuava vahekaugus ja märgmass ning igauht neist on lühidalt vaadeldud allpool. Täpsem tehniline lisateave neid näitajaid käsitlevate andmete kogumise ja arvuti abil analüüsimise kohta on esitatud viidatud juhenddokumentides, mida on soovitatav kasutada.

*Arengustaadium*

35. *X. laevis*'e kulleste arengustaadium määratakse vastavalt Nieuwkoop'i ja Faberi (8) esitatud arengustaadiumide määramise kriteeriumidele. Arengustaadiumi andmeid kasutatakse selleks, et teha kindlaks, kas areng on kiirenenud, muutunud asünkroonseks, aeglustunud või jäänud mõjutamata. Arengu kiirenemine või aeglustumine määratakse kindlaks kontrollrühma ja katserühmade kulleste saavutatud mediaanse arengustaadiumi võrdlemisel. Asünkroonse arenguga on tegemist siis, kui uuritud koed ei ole väärmoodusistega ega ebanormaalset, kuid ühe kullese morfogeneesi suhteline ajastus või eri kudede arengu ajastus on häiritud.

*Tagajäseme pikkus*

36. Kilpnäärmehormoonide kontrolli all olevad tagajäseme diferentseerumine ja kasv on peamised arengunäitajad, mida on juba kasutatud arengustaadiumi määramisel. Tagajäseme areng on arengustaadiumi määramisel kvalitatiivne näitaja, kuid siin vaadeldakse seda kvantitatiivse näitajana. Seepärast mõõdetakse tagajäseme pikkus kui näitaja, mis võimaldab kindlaks teha mõju kilpnäärmeljele (joonis 2). Kooskõla tagamiseks mõõdetakse vasema tagajäseme pikkust. Tagajäseme pikkust hinnatakse nii katse 7. kui ka 21. päeval. 7. päeval mõõdetakse tagajäset lihtsalt, nagu on näidatud joonisel 2. 21. päeval on tagajäseme pikkuse mõõtmine aga keerulisem, kuna tagajäsemel on paindekohad. Seepärast tuleks tagajäseme pikkuse mõõtmisel 21. päeval alustada kehaseinast ja mõõta piki jäseme keskjoont, järgides kõiki jäseme kõverusi. Muutusi tagajäseme pikkuses 7. päeval, isegi kui neid ei ole 21. päeval, peetakse ikkagi oluliseks kilpnäärmele avalduva võimaliku mõju kindlakstegemisel. Pikkuse mõõtmise tulemused saadakse digifotolt, kasutades kujutise analüüsi tarkvara, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis kahepaiksete kilpnäärme histoloogilise uuringu kohta (9).

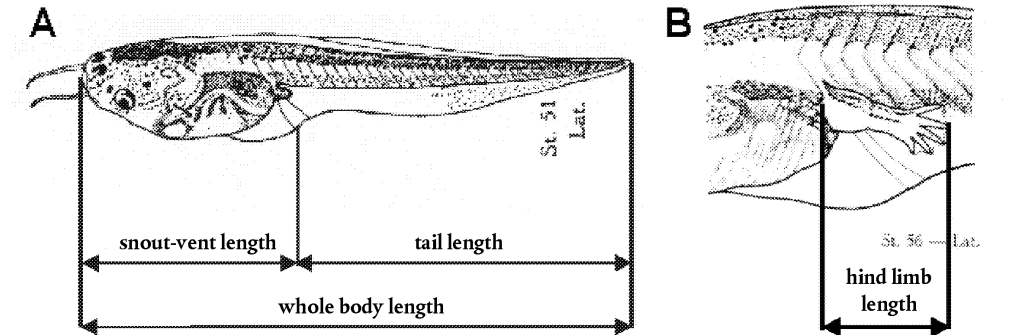
*Kehapikkus ja märgkaal*

37. Ninamiku-pärakuava vahekauguse (SVL) (joonis 2) ja märgmassi mõõtmine on võetud katse-eeskirja, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku mõju kulleste kasvukiirusele, võrreldes kontrollrühmaga, ja see on kasulik uuritava kemikaali üldise mürgisuse tuvastamisel. Kuna vee eemaldamine kulleste kehamassi määramiseks võib kullestel tekitada stressi ja põhjustada nahavigastusi, tehakse need mõõtmised 7. päeval valitud kulleste alarühmas ja kõigi ülejäänud kulleste puhul katse lõpus (21. päev). Kooskõla huvides kasutatakse pärakuava koljupoolset serva sabapikkuse mõõtmisel piirina.
38. Kulleste kasvu hindamiseks kasutatakse ninamiku-pärakuava vahekaugust (SVL), nagu on näidatud joonisel 2.

## ▼ M6

Joonis 2.

*X. laevis*'e kulleste kehapikkust iseloomustavad mõõtmised (A) ja tagajäseme pikkuse mõõtmine (B) (1).



### Kilpnäärme histoloogia

39. Kuigi arengustaadium ja tagajäseme pikkus on olulised näitajad, mille järgi hinnatakse kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutusi metamorfilises arengus, ei saa arengu aeglustumist iseendast pidada kilpnäärmeaktiivsuse vastaseks diagnostiliseks indikaatoriks. Mõned muutused võivad olla nähtavad üksnes põhjaliku histopatoloogilise analüüsiga. Diagnostiliste kriteeriumide hulka kuuluvad kilpnäärme hüpertroofia/atroofia, folliikulirakkude hüpertroofia ja hüperplaasia ning täiendavate kvalitatiivsete kriteeriumidena: folliikuli valendiku ristlõikepindala, kolloidsus ja folliikulirakkude kõrgus ja kuju. Registreeritakse mõju olulisus (neli astet). Teave histoloogiliseks analüüsiks vajalike proovide saamise ja töötlemise ning koeproovide histoloogilise analüüsi kohta on esitatud juhenddokumentides „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation” ning „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas” (9). Labor, milles katset tehakse esimest korda (esimesi kordi), peaks pöörduma õppimiseks ja nõuannete saamiseks kogenud patoloogi poole, enne kui ta asub tegema histoloogilist analüüsi ja hindama kilpnääret. Apikaalsete näitajate ilmsed ja olulised muutused, mis näitavad arengu kiirendamist või asünkroonsust, võivad muuta kilpnäärme histopatoloogilise analüüsi mittevajalikuks. Selgete morfoloogiliste muutuste või arengupeatust näitavate tõendite puudumine tähendavad siiski, et on vaja teha histoloogiline analüüs.

### Suremus

40. Kõiki nõusid tuleb kontrollida iga päev surnud kulleste suhtes ja iga nõu kohta need numbrid registreeritakse. Iga surmajuhtumi kohta registreeritakse kuupäev, kemikaali kontsentratsioon ja nõu number. Surnud loomad tuleks katsenõudest kohe eemaldada, kui neid märgatakse. Suremuse määr üle 10 % võib osutada sobimatutele katsetingimustele või uuritava kemikaali mürgisusele.

### Täiendavad tähelepanekud

41. Ebanormaalse käitumise juhtumid ja selgelt nähtavad väärendid ning kahjustused tuleks registreerida. Iga ebanormaalse käitumise juhtumi, selgelt nähtava väärendi või kahjustuse kohta registreeritakse kuupäev, kemikaali kontsentratsioon ja nõu number. Normaalse käitumisega kullestest hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted

▼ **M6**

liiguvad ja nad reageerivad ärritajatele. Ebanormaalse käitumise näideteks on pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, ümberpööratud või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine ja ärritajatele mitte reageerimine. Lisaks tuleks protokollis registreerida suured erinevused sööda tarbimises eri kontsentratsiooniga katsenõudes. Olulisteks väärenditeks ja kahjustusteks võivad olla morfoloogilised kõrvalekalded (näiteks deformeerunud jäsemed), hemorraagilised lesioonid, bakteri- või seennakkused, kui nime-tada vaid mõnda. Sellised otsustused on kvalitatiivsed ja neid tuleks käsitleda kui haiguse või stressi kliinilisi tunnuseid võrdluses kontrollrühma loomadega. Kui selliste tunnuste esinemine või esinemismäär on kemikaaliga kokkupuute uurimise nõudes suurem kui kontrollrühmas, tuleks neid käsitada selge mürgisuse tunnustena.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete kogumine**

42. Kõik andmed tuleks koguda elektrooniliste või käsitsi mõõtmise süsteemide abil, mis vastavad heale laboritavale. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:

*Uuritav kemikaal:*

- uuritava kemikaali iseloomustus: füüsikalised-keemilised omadused; teave stabiilsuse ja biolagunevuse kohta;
- keemiline teave ja andmed: lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus. Uuritavat kemikaali käsitlev teave hõlmab selle tegelikke ja nimikontsentratsioone ning mõnel juhul, kui see on asjakohane, ka teavet süsteemis tekkivate ühendite kontsentratsioonide kohta. Uuritavat kemikaali võib olla vajalik määrata nii põhilahuses kui ka uuritavates lahustes;
- lahusti (kui kandeaine on muu kui vesi): lahusti valiku põhjendus ja lahusti omadused (nimetus, kasutatud lahusti kontsentratsioon);

*Katsetingimused:*

- andmed katse läbiviimise kohta: need hõlmavad tähelepanekuid katse-süsteemi, toetava keskkonna ja taristu toimimise kohta. Tüüpilised andmed hõlmavad järgmist: ruumi temperatuur, katsenõude temperatuur, valgustusperiood, kokkupuutesüsteemi oluliste osade (nt pumbad, tsüklihooldajad, rõhud) toimimine, voolukiirused, veetasemed, varulahusepudeli vahetamised ja andmed söötmise kohta. Üldised vee kvaliteedi näitajad on järgmised: pH, lahustunud hapniku sisaldus, elektri-juhtivus, joodi üldsisaldus, leelisus ja karedus;
- kõrvalekalded katsemeetodist: selles osas tuleks esitada teave või selgitused kõigi katsemeetodist kõrvalekaldumiste kohta;

*Tulemused:*

- bioloogilised tähelepanekud ja andmed: need hõlmavad iga päev tehtud tähelepanekuid surmajuhtumite, sööda tarbimise, ebanormaalse ujumise, letargia, tasakaalukaotuste, väärendite, vigastuste jne kohta. Ettenähtud ajavahemike järel kogutavad tähelepanekud ja andmed hõlmavad järgmist: arengustaadium, tagajäseme pikkus, ninamiku-pärakuava vahekaugus ja märgkaal;



▼ **M6**

- statistilise analüüsi meetodid ja kasutatud meetodite õigustus; statistilise analüüsi tulemused, eelistatavalt tabelitena;
- histoloogilised andmed: need hõlmavad jutustavat kirjeldust, samuti konkreetseid tähelepanekuid, millele on omistatud raskusastme ja esinemissageduse hindepunktid, nagu on üksikasjalikult kirjeldatud histopatoloogia juhenddokumendis;
- konkreetset juhtumit käsitlevad tähelepanekud: sellised tähelepanekud peaksid hõlmama jutustavat kirjeldust kõigest uuringu käigus nähtust, mis ei kuulu eespool kirjeldatud kategooriatesse.

**Andmete esitamine**

43. Iga päev kogutavate andmete tabelid on esitatud 2. liites; neid võib kasutada lähteandmete sisestamise ja kokkuvõtivate statistiliste arvutuste tegemise suunisenä. Lisaks on esitatud aruandetabelid, milles on mugav esitada määratavaid näitajaid käsitlevaid koondandmeid. 2. liites on esitatud ka histoloogilise hindamise aruandetabelid.

**Uuringu kvaliteedi kriteeriumid ja uuringu vastuvõetavus/nõuetekohasus**

44. Üldiselt tähendavad suured kõrvalekalded katsemeetodist, et andmeid ei saa kasutada tõlgendamiseks ega katsearuandes esitamiseks. Seepärast on töötatud välja allpool tabelis 4 esitatud kriteeriumid, mis aitavad määrata tehtud uuringu kvaliteeti ja hinnata üldist katseloomade olukorda.

Tabel 4.

**Kahepaiksete metamorfoosi katse kvaliteedi kriteeriumid**

Kriteerium	Lubatavad piirid
Uuritava aine kontsentratsioonid katses	Katses mõõdetud kontsentratsiooni varieerumine (KV) püsib 21 päeva jooksul vahemikus $\leq 20\%$
Suremus kontrollrühmades	$\leq 10\%$ – kontrollrühma paralleelkatsetes ei tohiks suremus olla suurem kui 2 kullest rühma kohta
Kontrollrühmade minimaalne mediaanne arengustaadium katse lõpus	57
Kontrollrühma arengustaadiumide jaotus	Arengustaadiumide jaotuse 10. ja 90. protsentil ei tohiks erineda rohkem kui 4 staadiumi võrra
Lahustunud hapniku kontsentratsioon	$\geq 40\%$ õhu küllastuskontsentratsioonist (*)
pH	pH peaks olema hoitud vahemikus 6,5–8,5. Paralleelrühmade ja eri kontsentratsioonide rühmade nõudes ei tohi erinevus olla suurem kui 0,5.
Vee temperatuur	$22 \pm 1$ °C. Paralleelrühmade ja eri kontsentratsioonide rühmade nõudes oleva vee temperatuuri erinevus ei tohi olla suurem kui 0,5 °C.
Katses kasutatud, ilma selge mürgisuseta kontsentratsioonide arv	$\geq 2$
Paralleelkatsete tulemused	Kuni 2 paralleelkatset kogu uuringu kohta võivad ebaõnnestuda

▼ **M6**

Kriteerium	Lubatavad piirid
Eritingimused lahusti kasutamise korral	Kui kandeainena kasutatakse lahustit, tuleb teha nii lahusti kontrollkatsed kui ka kontrollkatsed puhta veega ja esitada tulemused
	Statistiliselt olulisi erinevusi lahusti kontrolli ja vee kontrolli vahel töödeldakse eraldi. Vt allpool lisateave
Staatilise uuendusüsteemi eritingimused	Tuleb teatada esindavate keemiliste analüüside tulemused enne ja pärast uuendamist
	Vahetult enne uuendamist tuleks mõõta ammoniaagisisaldust
	Vahetult enne uuendamist tuleks mõõta kõik veekvaliteedi parameetrid, mis on loetletud 1. liite tabelis 1
	Uuendamiste vahel ei tohiks olla rohkem kui 72 tundi
	Sobiv söötmise ajakava (50 % igapäevasest söödarátsioonist peab olema kaubanduses leiduv kullisesööt)

(\*) Vee õhustatuse taset võib hoida barboteerimisseadme (mullitaja) abil. Mullitaja on soovitatav seadistada sellisele intensiivsusele, et mullid ei tekitaks kullestele asjatut stressi.

**Katse nõuetekohasus**

45. Katset võib pidada vastuvõetavaks ja nõuetekohaseks, kui on täidetud järgmised nõuded.

Katse, mille puhul otsustati, et mõju kilpnäärmele puudub, on nõuetekohane, kui:

- (1) igas kemikaaliga kokkupuute rühmas ja ka kontrollrühmas ei ületa suremus 10 %. Üheski paralleelkatses ei tohi suremus olla suurem kui kolm kullest, muidu loetakse paralleelkatse kehtetuks;
- (2) vähemalt kahel uuritava kemikaaliga kokkupuute kontsentratsioonil peavad kõik neli paralleelkatset olema õnnestunud ja analüüsiks kasutatavad;
- (3) vähemalt kaks uuritava kemikaaliga kokkupuute kontsentratsiooni, mis ei põhjusta selget mürgistust, peavad olema kasutatavad analüüsiks.

Katse, mille puhul otsustati, et kemikaal avaldab mõju kilpnäärmele, on nõuetekohane (kehtib), kui:

- (1) kontrollrühmades ei ületa suremus kahte kullest paralleelkatse kohta.

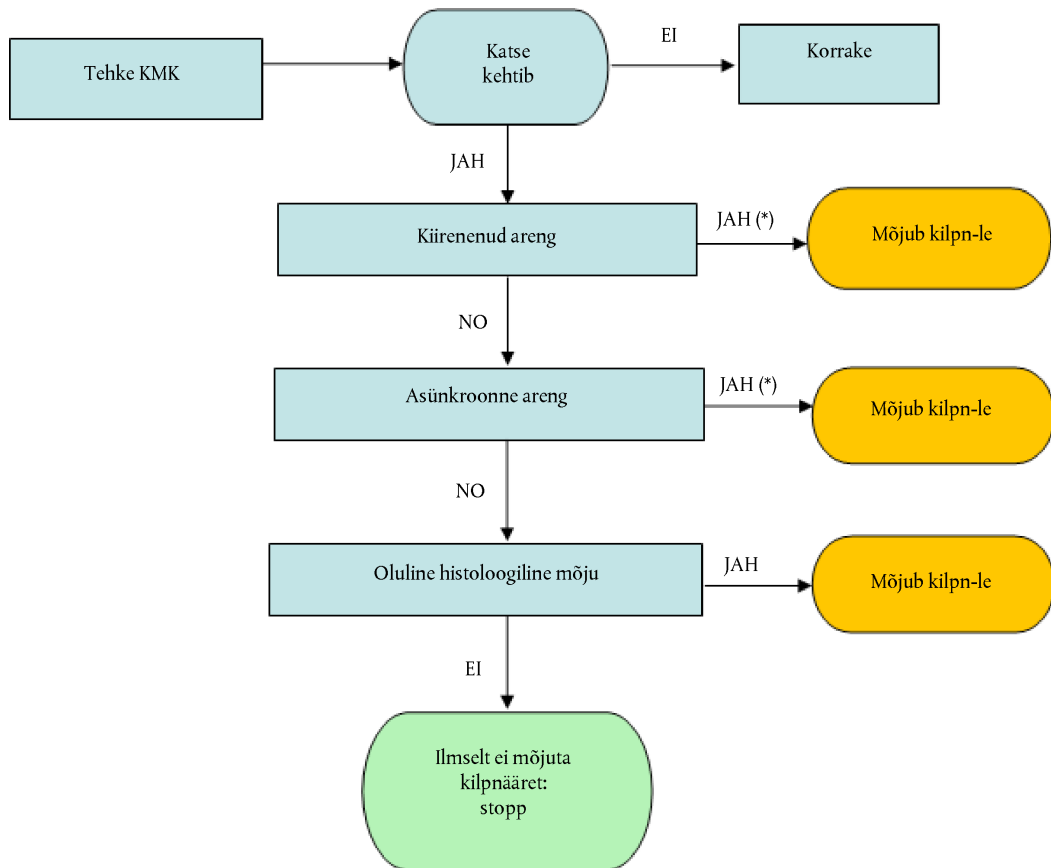
**Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse puhul**

46. Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse jaoks töötati välja selleks, et see aitaks biokatset läbi viia ja selle tulemusi loogiliselt tõlgendada (vt skeem joonisel 3). Otsustamisskeemis tegelikult kaalutakse määratud näitajaid, kusjuures arengu kiirenemisele, asünkroonsele arengule ja kilpnäärme histopatoloogiale omistatakse suur kaal ning arengu aeglustumisele, ninamiku-päraku vahemaale ja keha märgkaalule, mida võib mõjutada kemikaali üldine mürgisus, omistatakse väiksem kaal.

## ▼ M6

Joonis 3.

## Otsustamis skeem kahepaiksete metamorfoosi katse (KMK, ingl k. AMA) puhul



(\*) Mõni reguleeriv asutus võib nõuda histoloogia uurimist, vaatamata olulistele erinevustele, mis avalduvad kiirenenud arengu ja asünkroonse arenguna. Käesolevat uuringut tegeval laboril soovitatakse vajaliku pädeva asutusega enne uuringu tegemist nõu pidada, et teha kindlaks, milliste näitajate määramist nõutakse.

*Kiirenenud areng (tehakse kindlaks arengustaadiumi, ninamiku-päraku vahemaa ja tagajäseme pikkuse alusel)*

47. Kiirenenud areng esineb teadaolevalt üksnes kilpnäärmehormoonidega seotud mõjude toimetel. See võib olla mõju perifeersetele kudedele, mida põhjustab kilpnäärmehormooni otsene sidumine selle hormooni retseptorile (näiteks T4-le), või mõju, mis muudab kilpnäärmehormooni sisaldust veres. Kummalgi juhul peetakse seda piisavaks tõendiks, mis näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Kiirenenud arengut hinnatakse ühel meetodil kahest. Kõigepealt võib hinnata üldist arengustaadiumi, kasutades standardmeetodit, mida on üksikasjalikult kirjeldanud Nieuwkoop ja Faber (8). Teiseks võib arvuliselt väljendada konkreetseid morfoloogilisi omadusi nagu tagajäseme pikkus 7. ja 21. päeval, millel on positiivne korrelatsioon agonistliku mõjuga kilpnäärmehormooni retseptorile. Kui esineb statistiliselt oluline arengu kiirenemine või tagajäseme pikkuse suurenemine, siis näitab uuring, et kemikaal mõjutab kilpnääret.

▼ **M6**

48. Katseloomade arengu kiirenemise hindamine, võrreldes kontrollrühma loomadega, toimub järgmise nelja näitaja statistilise analüüsi tulemuste põhjal:

— tagajäseme pikkus (normeeritud ninamiku-päraku vahemaaga) uuringu 7. päeval;

— tagajäseme pikkus (normeeritud ninamiku-päraku vahemaaga) uuringu 21. päeval;

— arengustaadium uuringu 7. päeval;

— arengustaadium uuringu 21. päeval.

49. Tagajäseme pikkuse statistiline analüüs peab põhinema vasaku tagajäseme pikkuse mõõtmise tulemustel. Tagajäseme pikkus normeeritakse; selleks leitakse looma tagajäseme pikkuse ja ninamiku-päraku vahemaa suhtarv. Normeeritud väärtuste keskvaartusi iga kontsentratsioonitaseme juures võrreldakse omavahel. Arengu kiirenemist näitab tagajäseme (normeeritud) pikkuse keskvaartuse oluline suurenemine kemikaaliga kokkupuute rühmades, võrreldes kontrollrühma vastava näitajaga 7. ja/või 21. päeval (vt 3. liide).

50. Arengustaadiumide statistiline analüüs peaks põhinema arengustaadiumi määramisel, lähtudes Nieuwkoopi ja Faberi (8) morfoloogilistest kriteeriumidest. Arengu kiirenemist näitab see, kui arengustaadiumi väärtuste multikvantaalse analüüsiga leitakse selle oluline suurenemine kemikaaliga kokkupuute rühmades, võrreldes kontrollrühma vastava näitajaga 7. ja/või 21. päeval.

51. Kahepaiksete metamorfoosi katse puhul loetakse kas või ühelegi eespool nimetatud neljast näitajast avalduvat märkimisväärset mõju piisavaks tõendiks, et areng on kiirenenud. See tähendab, et olulist mõju tagajäseme pikkusele konkreetsel ajahetkel ei pea kinnitama oluline mõju tagajäseme pikkusele teisel ajahetkel ega oluline mõju arengustaadiumile samal ajahetkel. Teiselt poolt, olulist mõju arengustaadiumile konkreetsel ajahetkel ei pea kinnitama oluline mõju arengustaadiumile teisel ajahetkel ega oluline mõju tagajäseme pikkusele samal ajahetkel. Tõendusmaterjal kiirenenud arengu kohta muutub siiski kaalukamaks, kui oluline mõju tuvastatakse mitmele näitajale.

*Asünkroonne areng (määratakse arengustaadiumide kriteeriumide põhjal)*

52. Asünkroonsele arengule on iseloomulik see, et ühe kullese morfogeneesi või eri kudede arengu suhteline ajastus on häiritud. Kui iga konkreetse staadiumi puhul tüüpiliseks peetavate morfoloogiliste näitajate komplekti abil ei ole võimalik selgelt kindlaks teha looma arengustaadiumi, näitab see, et koed arenevad metamorfoosi ajal asünkroonselt. Asünkroonne areng näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Ainsad asünkroonsed arengut põhjustavad teadaolevad toimetehhanismid on kemikaalide mõju kilpnäärmehormoonide perifeersele mõjule ja/või kilpnäärmehormoonide metabolismile arenevates kudedes, nagu on täheldatud dejodinaasi inhibiitorite puhul.

▼ **M6**

53. Asünkroonse arengu hindamine katseloomadel võrreldes kontrollrühmade loomadega põhineb üldisel morfoloogilisel hindamisel, mis toimub uuringu 7. ja 21. päeval.
54. Nieuwkoop ja Faberi esitatud *Xenopus laevis*'e normaalse arengu kirjeldus (8) määrab raamistiku, mille põhjal tehakse kindlaks normaalne kudede ümberkujunemise järjestus. Mõiste „asünkroonne areng” osutab konkreetset sellistele kõrvalekalletele kullise üldises morfoloogilises arengus, mis ei võimalda arengustaadiumi kindlat määramist Nieuwkoop ja Faberi (8) kriteeriumide alusel, kuna peamised morfoloogilised tunnused osutavad eri arengustaadiumidele.
55. Nagu ütleb juba termin „asünkroonne areng”, tuleks siin vaadelda üksnes juhtumeid, kus konkreetsete kudede ümberkujunemise käigus esineb kõrvalekalle, võrreldes muude kudede ümberkujunemise käiguga. Mõned klassikalised välised avaldumisvormid on esijäsemete hilinenud moodustumine või moodustumata jäämine, vaatamata sellele, et tagajäsemed ja saba koed arenevad normaalselt või isegi kiiremini, või lõpuste enneaegne resorbeerumine, võrreldes tagajäseme morfogeneesi ja saba resorbeerumise staadiumiga. Looma areng loetakse asünkroonseks, kui talle ei saa omistada arengustaadiumi, kuna ta ei vasta enamikule olulistele Nieuwkoop ja Faberi (8) staadiumide kriteeriumidele, või kui tal esineb ühe või mitme olulise tähtsusega tunnuse ilmumise suur hilinemine või kiirenemine (nt saba on täielikult resorbeerunud, kuid esijäsemeid ei ole tekkinud). See hindamine toimub kvalitatiivselt ja seejuures tuleks uurida kõiki Nieuwkoop ja Faberi (8) loetletud olulisi arengutunnuseid. Siiski ei ole vaja registreerida uuritava looma iga olulise tunnuse arengustaadiumi. Kui loom tunnistatakse asünkroonse arenguga isendiks, siis talle Nieuwkoop ja Faberi (8) järgi arengustaadiumi ei omistata.
56. Seega keskne kriteerium, mille järgi ebanormaalse morfoloogilise arengu juhtumid tunnistatakse asünkroonse arengu juhtumiteks, on see, et kudede ümberkujunemise suhteline ajastus ja kudede morfogenees on häiritud, samas kui vastavate kudede morfoloogia ise ei ole selgelt ebanormaalne. Üks suurte morfoloogiliste kõrvalekallete sellist tõlgendust illustreeriv näide on see, et tagajäseme hilinenud morfogenees võrreldes muude kudede arenguga vastab asünkroonse arengu kriteeriumile; juhtumeid, kus tagajäsemed hoopis puuduvad, sõrmed on ebanormaalsed (nt mõni sõrm/varvas või selle osa puudub, esineb lisasõrmi/-varbaid), või muid ilmseid jäsemete väärarenguid ei loeta asünkroonseks arenguks.
57. Peamised morfoloogilised tunnused, mille koordineeritud toimumist metamorfoosi ajal tuleb hinnata selles kontekstis, peaksid hõlmama tagajäseme morfogeneesi, esijäseme morfogeneesi, esijäseme ilmumist, saba resorbeerumise staadiumi (eelkõige sabauime resorbeerumist) ja pea morfoloogiat (näiteks lõpuste suurus ja resorptsiooni järk, alalõua morfoloogia, Meckeli kõhre esiletungimine).
58. Olenevalt kemikaali toimest võib esineda mitmesuguseid suuri morfoloogilisi fenotüüpe. Mõned klassikalised välised avaldumisvormid (fenotüübid) on esijäsemete hilinenud moodustumine või puudumine, vaatamata sellele, et tagajäsemed ja saba koed arenevad normaalselt või isegi kiiremini, lõpuste enneaegne resorbeerumine, võrreldes tagajäseme ja saba ümberkujunemisega.

▼ M6*Histopatoloogia*

59. Kui kemikaal ei ole selgelt mürgine, ei kiirenda arengut ega põhjusta asünkroonset arengut, siis hinnatakse asjakohase juhenddokumendi (9) abil kilpnäärme histopatoloogiat. Arengu pidurdumine mürgisuse puudumise korral on selge märk kilpnäärmevastase toime kohta, kuid arengustaadiumide analüüsimine on vähem tundlik ja väiksema diagnostilise väärtusega kui kilpnäärme histopatoloogiline analüüs. Seepärast on sellisel juhul vaja teha kilpnäärme histopatoloogiline analüüs. Mõju kilpnäärme histoloogiale on tõendatud ka siis, kui mõju arengule ei leitud. Kui kilpnäärmes leitakse histopatoloogilisi muutusi, loetakse, et kemikaal mõjutab kilpnääret. Kui ei ole arengu aeglustumisi ega kilpnäärme histoloogilisi kahjustusi, siis loetakse, et kemikaal kilpnääret ei mõjuta. Sellise otsuse aluseks on asjaolu, et kilpnääre on teda stimuleeriva hormooni (*thyroid stimulating hormone*, TSH) mõju all ja iga kemikaal, mis muudab veres olevat kilpnäärmehormooni taset piisavalt, et muutuks TSH sekretsioon, põhjustab kilpnäärmes histopatoloogilisi muutusi. Kilpnäärmehormooni tase veres võib muutuda mitmesugusel viisil ja mitmesuguse toimemehhanismi kaudu. Seega, kilpnäärmehormooni tase veres küll näitab, et on olemas kilpnäärmega seotud mõju, kuid ei ole piisav selleks, et teha kindlaks, millise toimemehhanismi kaudu mõju avaldub.
60. Kuna seda näitajat ei saa peamiste statistiliste lähenemisviiside alusel uurida, tehakse kemikaaliga kokkupuute poolt põhjustatud mõju kindlaks patoloogi eksperdiarvamuse abil.

*Aeglustunud areng (tehakse kindlaks arengustaadiumi, tagajäseme pikkuse, kehamassi ja ninamiku-päraku vahemaa abil)*

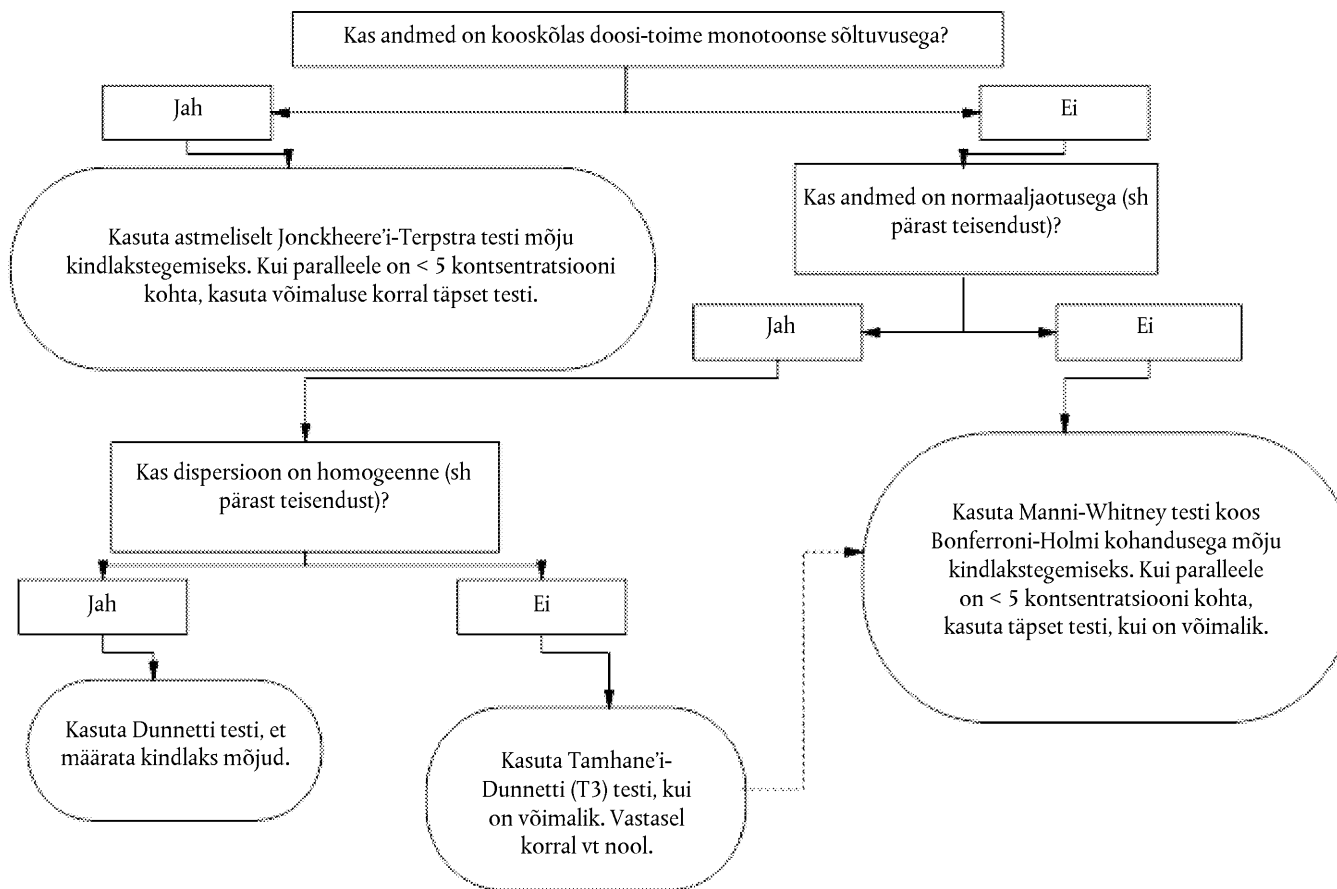
61. Arengu aeglustumist võivad põhjustada kilpnäärmevastased mehhanismid ja ka kaudne mürgisus. Kerged arengupeetuse tunnused koos selge mürgisuse nähtudega näitavad, et tegemist on tõenäoliselt mittespetsiifilise mürgise toimega. Muu kui kilpnäärmega seotud mürgisuse hindamine on uuringu oluline osa, kuna sellega vähendatakse valepositiivsete tulemuste tõenäosust. Ülemäärane suremus näitab selgelt, et olulised on muud mürgisuse mehhanismid. Samuti tähendab kasvu kerge vähenemine, mis tehakse kindlaks märgkaalu ja/või ninamiku-päraku vahemaa kaudu, et tegemist on muu kui kilpnäärmele suunatud mürgisusega. Kasvu ilmset suurenemist täheldatakse sageli kemikaalide puhul, mis mõjutavad normaalset arengut negatiivselt. Järelikult ei tähenda suuremad loomad tingimata, et tegemist on muu kui kilpnäärmele suunatud mürgisusega. Kilpnäärmele suunatud mürgisuse määramisel ei tohiks kunagi toetuda üksnes kasvule. Kilpnäärmele suunatud mürgisuse määramisel tuleks pigem kasutada kasvu koos arengustaadiumi ja kilpnäärme histopatoloogiaga. Ilmse mürgisuse kindlakstegemisel tuleks kaaluda ka muid näitajaid nagu turse, hemorraagilised haavandid, letargia, vähenenud söödatarbimine, korrapäratu/muutunud ujumisviis jne. Kui kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel avalduvad selge mürgisuse nähud, tuleks kemikaali uurida madalama kontsentratsiooni juures, et teha järeldus selle kohta, kas kemikaal võib mõjuda kilpnäärmele või mitte.
62. Statistiliselt oluline arengu pidurdumine muude selge mürgisuse nähtude puudumise korral näitab, et kemikaal mõjutab kilpnääret (on kilpnäärme antagonist). Tugevate statistiliste muutuste puudumise korral võivad seda järeldust toetada kilpnäärme histopatoloogia tulemused.

▼ **M6****Statistilised analüüsid**

63. Andmete statistiline analüüs peaks eelistatavalt toimuma vastavalt korrale, mida on kirjeldatud dokumendis „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*” (Ökotoxilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsed meetodid. Rakendamisujuhend) (11). Kõikide pidevate kvantitatiivsete näitajate (tagajäseme pikkus, ninamiku-päraku vahemaa, märgkaal) puhul, kus doosi-toime sõltuvus on monotoonne, tuleks kemikaali olulise toime kindlakstegemiseks astmeliselt kohaldada Jonckheere'i-Terpstra testi.
64. Pidevate näitajate puhul, kus doosi-toime sõltuvus ei ole monotoonne, tuleks andmeid hinnata normaaljaotuse seisukohast (soovitavalt Shapiro-Wilki või Anderson-Darlingi testiga) ja dispersiooni homogeensuse seisukohast (soovitavalt Levene'i testiga). Mõlemad testid tehakse ANOVA analüüsi jääkidega. Normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse formaalsete testide asemel võib kasutada ka eksperthinnangut, kuid formaalseid teste tuleb eelistada. Kui selgub, et tegemist ei ole normaaljaotusega või dispersioon on heterogeenne, tuleks otsida normaliseeriv, dispersiooni stabiliseeriv teisendus. Kui andmed (võib-olla pärast teisendust) on normaaljaotusega ja dispersioon on homogeenne, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Dunnetti testiga. Kui andmed (võib-olla pärast teisendust) on normaaljaotusega, kuid dispersioon on heterogeenne, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Tamhane'i-Dunnetti või T3-testiga või Mann-Whitney-Wilcoxon'i U-testiga. Kui ei õnnestu leida normaliseerivat teisendust, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Mann-Whitney-Wilcoxon'i U-testiga, kasutades p-väärtuste kohandamist Bonferroni-Holmi järgi. Dunnetti testi kasutatakse sõltumatult ANOVA F-testist ja Mann-Whitney testi kasutatakse sõltumatult Kruskal-Wallis testist.
65. Olulist suuremust ei eeldata, kuid seda tuleks hinnata astmelise Cochran-Armitage'i testiga, kui andmed on kooskõlas doosi-toime vahelise monotoonse sõltuvusega; vastupidisel juhul tuleks teha Fisher'i täpne test Bonferroni-Holmi kohandusega.
66. Seda, kas kemikaaliga kokkupuute avaldab olulist mõju arengustaadiumile, kontrollitakse Jonckheere'i-Terpstra testi astmelise rakendamisega paralleelkatsete mediaanidele. Teise võimalusena ja eelistatavalt tuleks mõju kindlakstegemiseks kasutada multikvantaalset Jonckheere'i testi 20. kuni 80. protsentiilini, kuna selles võetakse arvesse jaotusprofiili muutusi.
67. Sobiv analüüsiüksus on paralleelkatse, nii et andmed kujutavad endast paralleelkatsete mediaane, kui kasutatakse Jonckheere'i-Terpstra või Mann-Whitney U-testi või paralleelkatsete keskvaartusi, kui kasutatakse Dunnetti testi. Doosi-toime monotoonsust võib hinnata visuaalselt kokkupuute- ja paralleelrühmade keskvaartuste või mediaanide põhjal või formaalsete testidega, nagu on kirjeldatud eespool (11). Vähem kui viie paralleelkatse puhul ühe kokkupuutetaseme või kontrolli kohta tuleks kasutada Jonckheere'i-Terpstra ja Mann-Whitney testide täpse permutatsiooni versioone, kui need on kättesaadavad. Kõikide osutatud testide statistilist olulisust hinnatakse olulisusnivoo 0,05 juures.
68. Joonisel 4 on esitatud pideva toime andmete statistiliste testide tegemise otsustamisskeem.

Pidevale toimele osutavate andmete statistiliste töötluste otsustamiskeem.

Otsustuskeem pideva toime puhul





▼ **M6****Konkreetsed kaalutlused andmete analüüsi puhul***Ebaõnnestunud kokkupuutetasemekatsete kasutamine*

69. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelkatse või terve kokkupuutetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Selge mürgisus on määratletud rohkem kui kahe surmajuhtumiga ühes paralleelkatsetes, mida saab panna üksnes mürgisuse arvele ja mis ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Muud selge mürgisuse nähud on järgmised: veritsemine, ebatavaline käitumine, ebatavaline ujumisviis, isutus ja muud kliinilised haigustunnused. Subletaalse mürgisuse puhul võib olla vajalik kvalitatiivne hindamine; selle tegemisel peaks alati olema aluseks võrdlemine puhta vee kontrollrühmaga.

*Lahusti kontrollkatsed*

70. Lahusti kasutamist tuleks kaaluda ainult viimase abinõuna, kui kõik muud kemikaali lisamise võimalused on läbi vaadatud. Kui kasutatakse lahustit, tuleb samal ajal teha kontrollkatse puhta veega. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti võimalikku mõju. Seda tehakse lahusti kontrollrühma ja puhta vee kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõige asjakohasemad näitajad, mida tuleks sellise analüüsi juures arvesse võtta, on arengustaadium, ninamiku-päraku vahekaugus ja märgkaal, kuna neid võib mõjutada muu kui kilpnäärme seotud mürgisus. Kui nende näitajate vahel tuvastatakse statistiliselt olulisi erinevusi vee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel, määratakse uuringu eesmärgiks olevad näitajad mõõdetud toime võrdlusest puhta vee kontrollrühmaga. Kui mõõdetud muutujate puhul puudub statistiliselt oluline erinevus puhta vee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel, määratakse uuringu eesmärgiks olevad näitajad mõõdetud toime võrdlusest lahjendusvee ja lahusti kontrollrühmade ühendatud tulemustega.

*Kokkupuude kemikaaliga rühmade puhul, kes jõuavad 60. või kõrgema arengustaadiumini*

71. Pärast 60. arengustaadiumi hakkab kulleste suurus ja mass vähenema kudede resorptsiooni ja absoluutse veesisalduse vähenemise tõttu. Märgkaalu ja ninamiku-päraku vahemaa mõõtmisi ei sobi seetõttu enam kasutada kasvukiiruste statistilises analüüsis. Seepärast tuleks märgkaalu ja pikkuse andmed selliste loomade puhul, kes jõuavad Nieuwkoop ja Faberi arengustaadiumi üle 60, jätta välja; neid ei tohiks kasutada paralleelkatsete keskvaartuste või mediaanide analüüsis. Selliste kasvuga seotud näitajate analüüsil võib kasutada kahte erinevat lähenemisviisi.
72. Üks lähenemisviis on võtta märgkaalu ja ninamiku-päraku vahemaa statistilistes analüüsidest arvesse vaid kulleseid arengustaadiumiga kuni 60. Arvatakse, et see lähenemisviis annab piisavalt usaldusväärseid andmeid võimaliku mõju kohta kasvule, kui analüüsist jäetakse välja üksnes väike osa ( $\leq 20\%$ ) katseloomadest. Kui rohkem kulleseid ( $\geq 20\%$ ) on ühel või mitmel nimikonsentratsioonil jõudnud arengus 60. staadiumist kaugemale, tuleks kõikide kulleste puhul kasutada kahefaktorilist ANOVAd, millesse on pesastatud dispersioonistruktuur, et hinnata kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõju kasvule, võttes arvesse hiliste arengustaadiumide mõju kasvule. 3. liites on esitatud suunised massi ja pikkuse andmete kahefaktorilise ANOVA analüüsi tegemiseks.

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase I – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

**▼ M6**

- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
- (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98
- (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551
- (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
- (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
- (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
- (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
- (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

## ▼ M6

1. liide

Tabel 1.

## Kahepaiksete metamorfoosi 21-päevase katse tingimused

Katseloomad	<i>Xenopus laevis</i> 'e vastsed (kulleled)	
Vastsete arengustaadium katse alguses	51. arengustaadium Nieuwkoop ja Faberi järgi	
Kokkupuuteaeg	21 päeva	
Kulleste valiku kriteeriumid	Arengustaadium ja kogupikkus (valikuline)	
Katses kasutatavad kontsentratsioonid	Vähemalt 3 kontsentratsiooni ligikaudu ühe suurusjärgu vahemikus	
Kokkupuuterežiim	Läbivooluga (eelistatud) ja/või staatiline uuendussüsteem	
Voolukiirus katsesüsteemis	25 ml/min (täielik koguse asendamine ligikaudu iga 2,7 tunni jooksul)	
Peamised määratavad näitajad / määramise päev	Suremus	Iga päev
	Arengustaadium	7. ja 21. päev
	Tagajäseme pikkus	7. ja 21. päev
	Vahemaa ninamikust kuni pärakuavani	7. ja 21. päev
	Keha märgmass	7. ja 21. päev
	Kilpnäärme histoloogia	21. päev
Lahjendamiseks kasutatav vesi / laboratoorne kontroll	Aktiivsõel filtrimisega kloorist puhastatud kraanivesi või muu samaväärne laboris kasutatav vesi	
Kulleste tihedus	20 kullest katsenõus (5 kullest liitri kohta)	
Uuritav lahus / katsenõu	4–10 l nõu (veekiht vähemalt 10–15 cm) / klaasist või roostevabast terasest nõu (nt 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Paralleelkatsed	4 paralleelkatsetega katsenõu uuritava kontsentratsiooni ja kontrolli kohta	
Lubatav suremuse määr kontrollrühmades	≤ 10 % igas paralleelkatsenõus	
Kilpnäärme fikseerimine	Fikseeritavate kilpnäärmete arv	Kõik kulleled (algselt hinnatakse 5 kullest paralleelkatse kohta)
	Piirkond	Pea või kogu keha
	Fikseerimisvedelik	Davidsoni fikseerimislahus
Söötmine	Sööt	Sera Micron® või samaväärne
	Kogus / sagedus	Vt tabel 1, kui kasutatakse sööta Sera Micron®
Valgustus	Valgustusperiood	12 tundi valgust – 12 tundi pimedust

**▼ M6**

	Valgustuse intensiivsus	600 kuni 2 000 luks (mõõdetuna vee pinnal)
Vee temperatuur		22 ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Lahustunud hapniku sisaldus (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % õhu küllastuskontsentratsioonist)
Analüütilise keemia proovide võtmise ajakava		Üks kord nädalas (4 proovivõtmist katse kohta)

▼ **M6**

## 2. liide

## Tabelid lähteandmete ja koondandmete esitamiseks

Tabel 1.

## Üldine teave uuritava kemikaali kohta

Keemilised andmed			
Sisestage uuritav kemikaal, kontsentratsiooni ühikud ja kokkupuutekontsentratsioonid			
Uuritav kemikaal:			
Kontsentratsiooni ühik:			
Kokkupuutekontsentratsioon 1			
Kokkupuutekontsentratsioon 2			
Kokkupuutekontsentratsioon 3			
Kokkupuutekontsentratsioon 4			
Kuupäev (0-päev):			Märkida kuupäev (pp/kk/aa)
Kuupäev (7. päev):			Märkida kuupäev (pp/kk/aa)
Kuupäev (21. päev):			Märkida kuupäev (pp/kk/aa)

Tabel 2.

## Tabelid lähteandmete kogumiseks 7. ja 21. päeval

**PÄEV X**  
**KUUPÄEV 00/00/00**

	Kontsentratsioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustadium	Ninamikupärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼ M6

	Kontsentrat-sioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustaadium	Ninamiku-pärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organi määrgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							
33	0,00	2							

▼ M6

	Kontsentrat-sioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustadium	Ninamiku-päakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organiismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

▼ M6

	Kontsentrat-sioon	Kokkupuuterühma number	Paralleelkatse number	Isendi number	Isendi tunnus	Arengustadium	Ninamiku-pärakuava vahemaa (mm)	Tagajäseme pikkus (mm)	Kogu organi määrgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
59	0,00	3							
60	0,00	3							
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							





▼ **M6**

Katsepäev	Kuupäev	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!																
Arv paralleelkatses		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arv kokkupuutetase kohta		0				0				0				0			

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 1 sisestatud andmetega.

Tabel 5.

### Vee kvaliteedi kriteeriumid

Kokkupuutesüsteem (läbivooluga / staatiline uuendatav):

Temperatuur:

Valguse intensiivsus:

Valguse-pimeduse tsükkel:

Sööt:

Söötmissäär:

Vee pH

Joodi kontsentratsioon katsevees:

▼ **M6**

Tabel 6.

**Keemiaandmete koondtabel**

Kemikaali nimetus:																							
CASi nr:																							
Katsepä- ev	Kuupäev	1	2	3	4	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!																						

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 1 sisestatud andmetega.



▼ **M6**

Tabel 8.

**Täiendavad histopatoloogilised kriteeriumid**

Kuupäev:

Keemiline aine:

Patoloog:

Kontroll-loom ID – paralleelkatse 2	Kontroll-loom ID – paralleelkatse 1	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	
Kokku:			

Doosilooma ID – paralleelkatse 2	Doosilooma ID – paralleelkatse 1	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	
Kokku:			

▼ M6

Tabel 9.

**Histopatoloogiliste leidude jutustavad kirjeldused**

Kuupäev:

Keemiline aine:

Patoloog:

Jutustav kirjeldus

Kontroll-looma ID – paralleelkatse 1		
Kontroll-looma ID – paralleelkatse 2		
Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		

▼ M6

Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		
Doosilooma ID – paralleelkatse 1		
Doosilooma ID – paralleelkatse 2		

Tabel 10.

## Kahepaiksete metamorfoosi katse protokoll koondtabeli vorm päeva X jaoks (7. või 21. päev).

## KV – mõõdetud kontsentratsiooni varieerumine

Näitaja	Paralleelkatse	Kontroll				Doos 1					Doos 2					Doos 3				
		Keskmine	St-hälve	KV	N	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus	Keskmine	St-hälve	KV	N	p-väärtus
Tagajäseme pikkus (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			
Ninamiku-päakuava vahemaa (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			
Märgmass (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			



Tabel 11.

## Kahepaiksete metamorfoosi katse protokollis arengustaadiumi andmete koondtabeli vorm päeva X jaoks (7. või 21. päev)

	Paralleelkatse	Kontroll				Doos 1					Doos 2					Doos 3				
		Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	p-väärtus	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	N	p-väärtus	Mediaan	Minimaalne	Maksimaalne	Mediaan	p-väärtus
<b>Arengustaadium</b>	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskmine:																			

▼ **M6**

## 3. liide

**Massi ja pikkuse alternatiivne analüüs, kui hilisesse arengustaadiumi jõuab ühel või mitmel kontsentratsioonil üle 20 % kullestest**

Kui paljud kullestest ( $\geq 20\%$ ) on ühel või mitmel nominaalsel kontsentratsioonil jõudnud arengus kaugemale kui 60. staadiumini, tuleks kõikide kullestest puhul kasutada kahetegurilist ANOVAd, millesse on pesastatud dispersioonistruktuur, et hinnata kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõjusid kasvule, võttes arvesse hiliste arengustaadiumide mõju kasvule.

Ettepanek on kasutada kõiki andmeid, kuid võtta arvesse hiliste arengustaadiumide mõju. Seda saab teha kahetegurilise pesastatud dispersioonistruktuuriga ANOVA abil. Muutuja LateStage väärtuseks võetakse JAH looma puhul, kelle arengustaadium on 61 või hilisem. Vastasel juhul võetakse LateStage väärtuseks EI. Seejärel saab teha kahetegurilise ANOVA, mille tegurid on kontsentratsioon ja LateStage ja nende vastastikune toime, milles Rep(Conc) on üks juhuslik tegur ja Kull(Rep) on teine juhuslik mõju. Sellega käsitletakse paralleelkatset (Rep) analüüsi üksusena ja see annab sisuliselt sama tulemuse kui REP\*latestage keskvväärtuste kaalutud analüüs, milles kaaludena on kasutatud loomade arvu iga keskvväärtuse kohta. Kui andmed on vastuolus ANOVA normaaljaotuse või dispersiooni homogeensuse nõuetega, võib teha normeeritud astakteisenduse selle takistuse kõrvaldamiseks.

Lisaks standardsele ANOVA F-testile kontsentratsiooni, LateStage'i ja nende vastastikuse toime mõju selgitamiseks, võib vastastikuse toime F-testi jagada kaheks täiendavaks ANOVA F-testiks, ühe võib teha toime keskvväärtustega kõigi kontsentratsioonide puhul, kus LateStage = EI ja teise toime keskvväärtustega kõigi kontsentratsioonide puhul, kus LateStage = JAH. Edasised kontsentratsioonirühmade keskmiste võrdlused kontrollrühmade keskmistega tehakse iga LateStage arengustaadiumi jaoks. Võib teha trendi leidmise tüüpi analüüsi, kasutades sobivaid kontraste, või lihtsalt paariviisi võrrelda, kui on tõendeid, et LateStage'i muutuja tasandil võib esineda mitte-monotoonne doosi-toime sõltuvus. p-väärtuste kohandus Bonferroni-Holmi järgi tehakse ainult siis, kui vastav F-testi osa ei ole oluline. Seda saab teha statistikaprogrammi SAS ja tõenäoliselt ka muude tarkvarapakettide abil. Probleemid võivad tekkida siis, kui teatavate kontsentratsioonide puhul ei ole hilises arengujärgus loomi, kuid selliseid olukordi on lihtne lahendada.

▼ **M6**

*4. liide*

**Mõisted**

**Kemikaal** – aine või segu.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M6

C.39. HOOGHÄNNALISTE MULLAS PALJUNEMISE KATSE

▼ M9

Selle katsemeetodi täielik kirjeldus on välja jäetud. Sellega samaväärne rahvusvaheline katsemeetod on esitatud 0. osa tabelis 3.

▼ **M6****C.40. SURUSÄÄSKLASTE (CHIRONOMIDAE) ELUTSÜKLI MÜRGISUSKATSE SÜSTEEMIS, MIS KOOSNEB RIKASTATUD SETTEST JA VEEST VÕI SETTEST JA RIKASTATUD VEEST****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 233 (2010). Katsejuhend on ette nähtud selleks, et hinnata kemikaaliga eluaegse kokkupuute mõju magevee kahetiivaliste liigile *Chironomus* sp.; katse hõlmab 1. põlvkonna (P-põlvkonna) kogu eluea ja 2. põlvkonna (F1-põlvkonna) elu varased järgud. Meetod täiendab olemasolevaid katsemeetodeid C.28 (1) ja C.27 (15); selles kasutatakse kas rikastatud (spaiGITUD) veega kokkupuudet või rikastatud settega kokkupuudet. Selles võetakse arvesse *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus dilutus*'e (varasem nimetus *C. tentans* (2)) kohta olemasolevaid mürgisuse määramise katse-eeskirju, mis on koostatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) ning millele hiljem on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 7, 10, 11, 12). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (13, 14). Täielik kokkupuute kestus on umbes 44 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui*' puhul ning umbes 100 päeva *C. dilutus*'e puhul.
2. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud nii vee kaudu kui ka sette kaudu toimuvat kokkupuudet. Sobiva kokkupuutestenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Vee kaudu kokkupuute stsenaarium, milles rikastatakse veesammast, peaks modelleerima pihustatud pestitsiidi triivimist ja hõlmab ka esialgset maksimaalset kontsentratsiooni pinnavees. Vee rikastamine on kasulik ka muud tüüpi kokkupuute (sh kemikaalilekke) modelleerimisel, kuid ei võimalda modelleerida katseperioodist pikemat kemikaali kogunemist settesse. Sel juhul ja samuti ka siis, kui sademevee äravool on pestitsiidi jaoks peamine veekogusse sattumise tee, võib rikastatud sete olla asjakohasem. Kui huvi pakuvad muud kokkupuuteviisid, võib katseplaani kergesti kohandada. Näiteks, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja settekähi vahel ei paku huvi ning adsorptsioon settele tuleks minimeerida, siis võib kaaluda kunstliku asendussette (nt kvartslüüva) kasutamist.
3. Kemikaalid, mille mõju põhjasetetes elavatele organismidele on vaja katsetada, võivad settes püsida pikka aega. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga kokku puutuda mitmel viisil. Iga kokkupuutetee suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutetee puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub kõnealuse kemikaali füüsikaliskemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide või settega kovalentseid sidemeid moodustavate kemikaalide puhul võib tähtis kokkupuutetee olla saastunud sööda allaneelamine. Väga lipofiilsete kemikaalide mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava kemikaali kasutamist (vt punkt 31). Seega on võimalik hõlmata kõik kokkupuuteviisid ja kõikidel eluetappidel.
4. Mõõdetavad näitajad on järgmised: väljaarenenud täiskasvanute arv (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), arengu kiirus (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), täielikult arenenud ja elusate täiskasvanute sooline jaotumine (nii 1. kui ka 2. põlvkonna puhul), munanõõride arv emassääse kohta (ainult 1. põlvkond) ja munanõõride viljakus (ainult 1. põlvkond).
5. Tungivalt soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:

▼ **M6**

- väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriksi ja kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhta setteallika leidmiseks;
- katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks;
- vähenevad kulud, võrreldes korrapärase töö jaoks vajalike piisavate settekoguste hankimisega välitingimustes;
- spetsiaalselt koostatud sete võimaldab võrrelda erinevaid mürgisuse uuringuid ja järjestada kemikaale mürgisuse järgi (3).

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava kemikaaliga. Katse alguses pannakse esimese kasvujärgu vastsed (1. põlvkond) katsenõudesse, mis sisaldavad rikastatud setet või teise võimalusena rikastatakse uuritava kemikaaliga vett pärast vastsete lisamist. Hinnatakse surusääskede väljaarenemist, selleni kuluvat aega ning täielikult arenenud ja elusate sääskede soolist jaotumist. Väljaarenenud valmikud viiakse üle paljunduspuuridesse, et võimaldada neil parve koguneda, pairituda ja muned. Hinnatakse munetud munanõõride arvu ja nende viljakust. Kõnealustest munanõõridest saadakse 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsed. Need vastsed pannakse värskest ettevalmistatud katsenõudesse (rikastamine kemikaaliga nagu 1. põlvkonna puhul) et määrata 2. põlvkonna elujõulisus, mille jaoks hinnatakse nende väljaarenemist, selleni kuluvat aega ja täielikult arenenude ja elusate täiskasvanute soolist jaotumist (elutsükli katse skeem on esitatud 5. liites). Kõiki andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab asjakohase näitaja vähenemise X %, või kasutatakse hüpoteesi testimist, et määrata täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC). Selleks on vaja statistiliste testide abil võrrelda tulemusi, mis saadi uuritava kemikaaliga kokkupuutesse viimisel, tulemustega, mis saadi sobivate võrdluskemikaalidega kokkupuutesse viimisel. Tuleks märkida, et rikastatud veega kokkupuute stsenaariumis võivad kiiresti laguneva kemikaali puhul iga põlvkonna hilisemad arenguetapid (nt nukustaadium) puutuda kokku kemikaali oluliselt madalama kontsentratsiooniga vees kui 1. järgu vastsed. Kui see tekitab probleeme ja igal elutsükli etapil peaks olema enam-vähem ühesugune kokkupuude kemikaaliga, võib kaaluda katsemetodis järgmistest muudatustest tegemist:

- paralleelkatsete puhul rikastatakse vett elutsükli eri etappidel, või
- katse mõlemas faasis (1. ja 2. põlvkond) kasutatakse katsesüsteemi korduvat rikastamist (või katva veekihi uuendamist), kusjuures rikastamise (uuendamise) aegade valimisel arvestatakse uuritava kemikaali lagunemise kiirust.

Selliseid muudatusi saab teha üksnes vee rikastamise, kuid mitte sette rikastamise puhul.

## ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava kemikaali lahustuvus vees, aururõhk ja log  $K_{ow}$ , mõõdetud või arvatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Uuritava kemikaali kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihis, poorivees ja settes peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava

▼ **M6**

kemikaali struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava kemikaali käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju uurimiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud väljaandes (16).

**VÕRDLUSKEMIKAALID**

9. Võrdluskemikaale võib katsetada regulaarselt, et veenduda selles, et laboris kasvatatava populatsiooni tundlikkus ei ole muutunud. Nagu vesikirpudegi puhul, piisab sellest, kui teha 48-tunnine ägeda mürgisuse katse (17). Ent kuni ägeda mürgisuse testimise valideeritud katse-eeskiri muutub kättesaadavaks, võib kaaluda kroonilise mürgisuse katse tegemist vastavalt käesoleva lisa peatükile C.28. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks: lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 3, 6, 7, 18).

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

10. Katse nõuetekohasuse tõendamisel arvestatakse järgmist:
- kontrollnõus peab katse lõpuks keskmiselt välja arenema vähemalt 70 % putukaid mõlema põlvkonna puhul (1, 7);
  - *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul peaks 85 % täiskasvanud mõlema põlvkonna sääskedest välja arenema kontrollnõus 12–23 päeva jooksul pärast esimese kasvujärgu vastsete viimist nõudesse; *C. dilutus*'e puhul on vastuvõetav vahemik 20–65 päeva;
  - täielikult arenenud ja elusate sääskede hulgas peaks sooline jaotumine (emas- ja isassääskede suhtarv) kontrollnõus olema vähemalt 0,4, kuid mitte üle 0,6;
  - igas paljunduspuuris peaks 1. põlvkonna kontrollkatses olema vähemalt 0,6 munanööri iga sellesse puuri viidud emassääse kohta;
  - viljakate munanööri osakaal kontrollrühma 1. põlvkonna igas paljunduspuuris peaks olema vähemalt 0,6;
  - kokkupuuteaja lõpus tuleks mõlema põlvkonna puhul mõõta igas nõus pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest (ASV<sup>(1)</sup>) ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;
  - vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui  $\pm 1,0$  °C võrra.

**MEETODI KIRJELDUS****Katsenõud ja paljunduspuurid**

11. Vastsed viiakse kemikaaliga kokkupuutesse 600 ml keeduklaasides läbimõõduga umbes 8,5 cm (vt 5. liide). Muud nõud on ka sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada 2–3 cm<sup>2</sup> pinda iga vastse kohta. Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema ligikaudu 1:4. Paljundamispuurid (suurusega vähemalt 30 cm kõik kolm mõõdet) on pealt ja vähemalt ühelt küljelt kaetud marliga (võrgusilma suurus on ligikaudu 1 mm) (vt 5. liide). Igasse puuri pannakse munemise jaoks 2-liitrise mahutavusega kristallisaator, mis sisaldab katses kasutatavat vett ja setet. Ka kristallisaatoris peaks settekihi paksuse ja seda katva veekihi paksuse suhe

<sup>(1)</sup> Temperatuuril 20 °C on standardse atmosfäärirõhu puhul magevee ASV 9,1 mg/l (60 % sellest on 5,46 mg/l).

▼ **M6**

olema ligikaudu 1:4. Pärast munanööride kristallisaatorist eemaldamist pannakse need 12 süvendiga mikrotiiterplaadile (üks nõör igasse mikrotiiterplaadi süvendisse, mis sisaldab vähemalt 2,5 ml kristallisaatorist võetud rikastatud vett), seejärel plaat kaetakse kaanega, et vältida olulist aurumist. Munanööride hoidmiseks võib kasutada ka muid sobivaid nõusid. Peale mikrotiiterplaatide peaksid kõik katsenõud ja muud katsesüsteemiga kokku puutuvad seadmed olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks polütetrafluoroetüleenist).

**Liigi valimine**

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. Võib kasutada ka *C. yoshimatsui*'d. Sobib ka *C. dilutus*, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. 2. liites on esitatud andmed *C. riparius*'e kasvatamise meetodite kohta. Teave kasvatamistingimuste kohta on kättesaadav ka kirjandusest: *C. dilutus* (5) ja *C. yoshimatsui* (14). Enne katset tuleks kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisesest kultuurist.

**Sete**

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja osakeste suurus) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklaste vastsetega konkureerida või neid süüa. Samuti soovitatakse lasta settel enne katse tegemist seitse päeva katsetingimustes tasakaalustuda. Soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet (1, 20, 21):
- 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;
  - 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliiniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
  - 75–76 % (kuivmass) kvartslüüva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm);
  - lisatakse deioniseeritud vett, et lõplikus segus oleks niiskusesisaldus 30–50 %;
  - sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (CaCO<sub>3</sub>);
  - lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (± 0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.
14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade



**▼ M6**

koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

**Vesi**

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekllooritud kraanivett, kui sursääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l CaCO<sub>3</sub>-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elandti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

**Põhilahused. Rikastatud vesi**

16. a. Uuritava aine kontsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada uuritav kemikaal katsevees. Mõnel juhul võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla vajalik lahusti või dispergendi kasutamine. Sobivad lahustid on atsetoon, etüleenglükoolmonoetüleeter, etüleenglükooldimetüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergendid on Cremophor RH40, Tween 80, metüülselluloos (0,01 %) ja HCO-40. Solubiliseeriva aine kontsentratsioon lõplikus katse kasvukeskkonnas peaks olema minimaalne (s.o  $\leq 0,1$  ml/l) ja see peaks olema sama kõigi kokkupuutekontsentratsioonide puhul. Kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, ei tohiks see oluliselt mõjutada suremust, mida kontrollitakse lahusti kontrollkatse võrdlemisel negatiivse (vee) kontrollkatsega. Siiski tuleks teha kõik, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

**Põhilahused. Rikastatud sete**

16. b. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga rikastatud setted uuritava kemikaali lahuse otse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava kemikaali põhilahus segatakse spetsiaalselt koostatud settega valtsmasina või söödasegaja abil või käsitsi. Veest halvasti lahustuva uuritava kemikaali võib lahustada võimalikult väikses sobiva orgaanilise lahusti (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform) koguses. See lahus segatakse seejärel 10 g peene kvartslüüvaga iga katsenõu jaoks. Lahustil lastakse auruda ja see tuleks liivast täielikult kõrvaldada; seejärel segatakse liiv sobiva koguse settega. Uuritava aine solubiliseerimiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lenduvaid kemikaale. Tuleks meeles pidada, et sette valmistamisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali ja liiva segust pärit liiva (s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud

▼ **M6**

uuritav kemikaal oleks settes põhjalikult ja tühtlaselt jaotatud. Vajaduse korral võib homogeensuse taseme määramiseks analüüsida alamproove.

**KATSE KAVANDAMINE**

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist, samuti kristallisaatorite ja paljunduspuuride arvu valimist. Allpool on kirjeldatud katsete kavandamine  $EC_x$  ja NOEC määramiseks, samuti piirsalduskatse kavandamine.

**Katse kavandamine regressioonanalüüsi tegemiseks**

18. Toimet avaldav kontsentratsioon ( $EC_x$ ) ja kontsentratsioonivahemik, mis pakub huvi uuritava kemikaali mõju uurimisel, tuleks hõlmata katse kasutatavate kontsentratsioonidega, nii et otsitavat näitajat ei tuleks leida ekstrapoleerimisega väljapoole mõõdetud andmete vahemikku. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole madalaimat kontsentratsiooni või ülespoole kõrgeimat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse katsemeetodi C.27 või C.28. järgi võib aidata valida sobivat uuritavate kontsentratsioonide vahemikku.
19.  $EC_x$  lähenemisviisi korral tuleks teha katsed vähemalt viie kontsentratsiooniga ja kaheksa paralleelkatsega igal kontsentratsioonil. Iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada kahte paljunduspuuri (A ja B). Kaheksa paralleelkatset jagatakse kahte rühma, kummaski neli paralleelkatset, millest valmikud kogutakse kumbagi paljunduspuuri. Selline paralleelkatsete koondamine on vajalik selleks, et saada paljunduspuuri piisav arv valmikuid paljunemise usaldusväärseks hindamiseks. Siiski tehakse ka 2. põlvkonnaga kaheksa paralleelkatset, mida alustatakse kemikaaliga kokku puutunud populatsioonidest paljunduspuurides. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu, võib iga doosi paralleelkatsete arvu vähendada kuuele (kolm kumbagi paljunduspuuri). Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku  $EC_x$  ümber.

**Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamise kavandamine**

20. NOEC lähenemisviisi puhul tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt kaheksa paralleelkatsega (neli kumbagi paljunduspuuri A ja B) ja nende kontsentratsioonide erinevuse kordaja ei tohiks olla suurem kui kaks. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $\alpha = 0,05$ ). Arengu kiiruse, viljakuse ja sigivuse puhul on tavaliselt kohane kasutada dispersioonanalüüsi (ANOVA), millele järgneb Dunnetti või Williamsi test (22–25). Väljaarenemise suhte ja soolise jaotumise suhtarvu puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Mantel-Haentzali testi.

**Piirsalduskatse**

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes kuni maksimaalse kontsentratsioonini mõju ei leitud, võib teha piirsalduskatse (üks uuritava aine kontsentratsioon ja kontrollkatse(d)). Piirsalduskatse eesmärk on näidata, et uuritava kemikaali mürgine toime avaldub kontsentratsioonil,

▼ **M6**

mis on katses kasutatud piirkontsentratsioonist kõrgem. Vee puhul soovitatakse kontsentratsiooni 100 mg/l ja sette puhul 1 000 mg/kg (kuivmass). Enamasti tuleb nii kemikaaliga kokkupuutuvate rühmadega kui ka kontrollrühmadega teha vähemalt kaheksa paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ( $\alpha = 0,05$ ). Mõõdetavate suuruste (nt arengu kiirus) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on statistilise meetodina asjakohane kasutada t-testi. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-testi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxon-Mann-Whitney testi. Valmikute väljaareneamise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

**MÄÄRAMISE KÄIK****Kokkupuutetingimused**

*Vee-sette süsteemi valmistamine (kui rikastatakse vesi)*

22. a. Spetsiaalselt koostatud sete (vt punktid 13–14 ja 3. liide) lisatakse igasse katsenõusse ja kristallisaatorisse, et see moodustaks kihi paksusega vähemalt 1,5 cm (kristallisaatoris võib olla natuke õhem), kuid mitte üle 3 cm. Lisatakse vesi (vt punkt 15), nii et settekihi paksuse ja veekihi sügavuse suhe ei oleks suurem kui 1:4. Pärast katsenõu ettevalmistamist tuleks sette-vee süsteem jätta kerge aeratsiooniga seisma ligikaudu seitsmeks päevaks enne 1. või 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist (vt punkt 14 ja 3. liide). Kristallisaatori sette-vee süsteemi ei aereerita katse ajal, kuna nendes ei ole vaja tagada vastsete ellujäämist (munanõõrid kogutakse juba enne koorumist). Sette koostisosade eraldumise ja veesambas katsevee lisamise ajal peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta plastikkettaga ja valada vett kettale. Ketas eemaldatakse kohe pärast valamist. Võib kasutada ka muid võtteid.

*Vee-sette süsteemi valmistamine (kui rikastatakse sete)*

22. b. Rikastatud setted valmistatakse vastavalt punktile 16b, pannakse nõudesse ja kristallisaatoritesse ning neile lisatakse kattev veekiht, et saada sette-vee ruumala suhe 1:4. Settekihi paksus peaks olema 1,5–3 cm (kristallisaatoris võib see olla mõnevõrra õhem). Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajaks plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid. Kui rikastatud sete koos katva veekihiaga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritava kemikaalil jaotuda settefaasist vee faasi (4, 5, 7, 18). Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja kemikaalidest ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel kuni viis nädalat. Kuna paljud kemikaalid võivad sellise aja jooksul laguneda, ei oodata tasakaaluoleku teket, vaid soovitatakse 48-tunnist tasakaalustamise ajavahemikku. Kui aga kemikaali lagunemise poolestusaeg settes on pikk (vt punkt 8), võib tasakaalustumisaega pikendada. Kõnealuse täiendava tasakaalustamise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava kemikaali kontsentratsioon katvas veekihis, poorivees ja settes vähemalt suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil (vt punkt 38). Need uuritava kemikaali analüütilised määramised võimaldavad arvutada massitasakaalu ja väljendada tulemusi mõõdetud kontsentratsioonide alusel.
23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett. Kristallisaatoreid paljunduspuurides ei

▼ **M6**

kaeta ja nende puhul võib (aga ei tarvitse) olla vajalik veekao kompenseerimine katse ajal, sest munanöörid puutuvad veega kokku ainult ligikaudu ühe päeva ja kristallisaatoreid kasutatakse ainult ühe lühikese katsetapi jooksul.

*Katseorganismide lisamine*

24. Neli kuni viis päeva enne 1. põlvkonna katseorganismide esimese kasvujärgu vastsete lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuurist munamassid ja panna need väikestesse nõudesse, milles on kultuuri kasvukeskkond. Võib kasutada põhikultuuri vana kasvukeskkonda või värskest valmistatud kasvukeskkonda. Igal juhul tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskest munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *C. riparius*'e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *C. dilutus*'e puhul temperatuuril 23 °C ja *C. yoshimatoi* puhul temperatuuril 25 °C) ning vastsete kasv toimub neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (kuni 48 tundi pärast koorumist). Vastsete kasvujärku on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (7).
25. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 1. põlvkonna esimese kasvujärgu vastset juhulikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad sette ja vee süsteemi. Vee aereerimine peatatakse vastsete katsenõudesse lisamise ajaks ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punkt 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatavate vastsete arv iga kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni ( $EC_{\chi}$ ) hindamise korral vähemalt 120 (6 paralleelkatset igal kontsentratsioonil) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramise korral 160 (8 paralleelkatset igal kontsentratsioonil). Kui rikastatud on sete, algab kokkupuude vastsete lisamisega.

*Katva veekihi rikastamine*

26. Kaksikümmend neli tundi pärast 1. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist lisatakse uuritav kemikaal katva veekihi sambasse ja alustatakse uuesti kerget aereerimist (uuringu kava võimalike muudatuste kohta vt punkt 7). Uuritava kemikaali põhilahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Rikastatud vee stsenariumi korral algab kokkupuude veesamba rikastamisega (st üks päev pärast vastsete lisamist).

*Väljaarenenud valmikute kogumine*

27. Sääskede 1. põlvkonna väljaarenenud valmikud kogutakse katsenõust vähemalt üks kord, soovitatavalt aga kaks korda päevas (vt punkt 36), kasutades aspiraatorit, imurit või samalaadset seadet (vaata 5. liide). Tuleb olla eriti hoolikas, et valmikuid mitte kahjustada. Ühe kemikaalikonstsentratsiooni neljast katseanumast kogutud sääsed lastakse nende jaoks eelnevalt ettenähtud paljunduspuuri. Sel päeval, kui areneb välja esimene (isas-)sääsk, rikastatakse kristallisaatorid kemikaaliga, milleks lisatakse pipetiga väike kogus uuritava kemikaali põhilahust (rikastatud veega tehtav katse). Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Uuritava kemikaali kontsentratsioon kristallisaatoris on nominaalselt sama kui vastava kontsentratsiooniga katsenõus, millest sääsed viiakse üle asjaomasesse paljunduspuuri. Rikastatud settega katses valmistatakse kristallisaatorid ette ligikaudu 11. päeval pärast kokkupuute

▼ **M6**

algust (s.o pärast 1. põlvkonna vastsete lisamist), et kristallisaatorid saaksid tasakaalustuda ligikaudu 48 tundi enne esimeste munanööride munemist

28. Munanöörid kogutakse paljunduspuuride kristallisaatoritest pintseti või tõmbi pipeti abil. Iga munanöör pannakse nõusse, milles on samast kristallisaatorist võetud kasvukeskkond (nt 12 süvendiga mikrotiiterplaadi süvendisse, mis sisaldab vähemalt 2,5 ml kasvukeskkonda). Nõud munanööridega kaetakse kaanega, et vältida olulist aurumist.

Munanööre jälgitakse vähemalt kuus päeva pärast munemist, nii et saaks ära määrata, kas need on viljakad või viljatud. 2. põlvkonna alustamiseks võetakse vähemalt kolm, aga eelistatavalt kuus viljakat munanööri, mis valitakse igast paljunduspuurist, lisatakse veidi sööta ja lastakse kooruda. Need munanöörid peaksid olema munetud munemise tipp-ajal, mis tavaliselt on kontrollkatsetes ligikaudu 19. päev. Ideaaljuhul tuleks kõiki 2. põlvkonna katseid eri kontsentratsioonidel alustada samal päeval, kuid kuna kemikaalid mõjutavad vastsete arengut, ei pruugi see alati olla võimalik. Sellisel juhul võib suurema kontsentratsiooniga katseid alustada hiljem kui väiksema kontsentratsiooniga ja (lahusti) kontrolli katseid.

29. a. Rikastatud veega tehtava katse puhul valmistatakse sette-vee süsteem 2. põlvkonna jaoks ette, lisades uuritava kemikaali katvasse veekihti, 1 tund enne esimese kasvujärgu vastsete katsenõudesse lisamist. Uuritava kemikaali lahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet häirimata ettevaatlikult segada. Pärast rikastamist alustatakse kergelt aereerimist.
29. b. Rikastatud settega tehtava katse puhul valmistatakse sette-vee süsteemiga katsenõud 2. põlvkonna jaoks ette samal viisil kui 1. põlvkonna jaoks.
30. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastset (kuni 48 tundi pärast koorumist) juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud sette ja vee süsteemi. Vee aereerimine tuleks esimese kasvujärgu vastsete katsenõudesse lisamise ajaks peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist. Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatavate vastsete arv iga kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni ( $EC_x$ ) hindamise korral vähemalt 120 (6 paralleelkatset igal kontsentratsioonil) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) määramise korral 160 (8 paralleelkatset igal kontsentratsioonil).

*Sööt*

31. Vastseid tuleb katsenõudes sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Noorte vastsete esimese kümne arenemispäeva jooksul on sobiv söödakogus vastse kohta päevas 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatsui* puhul) kalasööta (näiteks Tetra-Min või Tetra-Phyll, mis on kas suspendeeritud vees või jahvatatud peeneks; üksikasjad vt 2. liide). Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse jooksul. Söödakogust tuleks vähendada kõigi kokkupuute- ja kontrollkatsete puhul, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleks katset korrata.

Allaneelamise kaudu toimuv kokkupuude kemikaaliga on toksikoloogilises mõttes üldiselt asjakohasem selliste kemikaalide puhul, millel on suur afinsus orgaaniliste süsinikuühendite suhtes või mis seovad end

▼ **M6**

kovalentselt settega. Kui uuritakse niisuguste omadustega kemikaali, võib vastsete elus püsimiseks ja normaalseks kasvuks vajaliku koguse sööta lisada spetsiaalselt koostatud settele juba enne stabiliseerumisperioodi, olenevalt regulatiivsetest vajadustest. Vee kvaliteedi halvenemise vältimiseks tuleks kalasööda asemel kasutada taimset materjali; näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või  $\alpha$ -tselluloos). Orgaanilise sööda kogu vajaliku koguse lisamine settele enne rikastamist ei ole lihtne ülesanne vee kvaliteedi ja bioloogilise tulemuslikkuse seisukohast (21) ega ka standardmeetod, kuid hiljutised uuringud näitavad, et see meetod toimib (19, 26). Säasevalmikud paljunemisperioodis tavaliselt ei vaja söötmist, kuid viljakus ja sigivus on tavaliselt paremad, kui täiskasvanud sääskedele pakkuda söödaallikana küllastunud sahharosiilahusega immutatud puuvillavati tükki (34).

*Inkubeerimistingimused*

32. 24 tundi pärast mõlema põlvkonna esimese kasvujärgu vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud nii, et selle otsik on settekihist 2–3 cm kõrgusel, ja millest eraldub mõni mull sekundis. Lenduva kemikaali uurimisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist, kuid katse nõuetekohasuse kriteerium, et hapnikusisaldus vees oleks vähemalt 60 % küllastuskontsentratsioonist (punkt 10) peaks olema täidetud. Täpsemad juhendid on esitatud dokumendis (16).
33. Katse *C. riparius*'ega tehakse püsival temperatuuril 20 °C ( $\pm 2$  °C). *C. dilutus*'e ja *C. yoshimatsui* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C ( $\pm 2$  °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksi. Paljunduspuurides võib lisada veel ühetunnise hämariku ja koidu faasi.

*Kokkupuute kestus*

34. Rikastatud veega katse: 1. põlvkonna kokkupuuteperiood algab siis, kui uuritav kemikaal lisatakse katseanumas katvasse veekihti (üks päev pärast vastsete lisamist; kokkupuute võimalike muudatuste kohta vt punkt 7). 2. põlvkonna vastsete kokkupuute algab kohe, sest nemad pannakse sette-vee süsteemi, mis on juba rikastatud. 1. põlvkonna maksimaalne kokkupuute kestus on 27 päeva ja 2. põlvkonna oma 28 päeva (1. põlvkonna vastsed veedavad ühe päeva katsenõudes ilma kemikaaliga kokku puutumata) *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul. Võttes arvesse kõnealust kattumist, on kogu katse kestus on ligikaudu 44 päeva. *C. dilutus*'e puhul on kokkupuute kestused 1. ja 2. põlvkonna puhul vastavalt kuni 64 päeva ja 65 päeva. Katse kogupikkus on ligikaudu 100 päeva.

Rikastatud settega katse: kokkupuute algab vastsete lisamisega ja kestab mõlema põlvkonna puhul kuni 28 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. dilutus*'e puhul.

**Vaatlused***Väljaarenemine*

35. Kummagi põlvkonna puhul määratakse arengu kogukestus ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgajatele tundlatele ja kõhnema keha hoiakule kergesti äratuntavad.

▼ **M6**

36. Kummagi põlvkonna katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga vastsete ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Väljaarenemise ajal, mis algab ligikaudu 12 päeva pärast vastsete sisestamist *C. riparius*'e ja *C. yoshimatoi* puhul (pärast 20 päeva *C. dilutus*'e puhul), loetakse väljaarenenud sääsed üle ja määratakse nende sugu vähemalt üks, kuid eelistatavalt kaks korda päevas (hommikul ja hilisel pärastlõunal). Pärast soo määramist eemaldatakse 1. põlvkonna sääsed ettevaatlikult katsenõust ja viiakse üle paljunduspuuri. 2. põlvkonna sääsed kõrvaldatakse ja surmataakse pärast soo määramist. Kõik munanõõrid, mis on munetud 1. põlvkonna katsenõudesse, tuleks üksikult koguda ja viia koos vähemalt 2,5 ml veega samast nõust 12 süvendiga mikrotiiterplaatidele (või muusse sobivasse nõusse), mis kaetakse olulise aurumise vältimiseks kaanega. Samuti registreeritakse kõigi surnud vastsete ja selliste nähtavate nukkude arv, millest sääske välja ei arenenud. Paljunduspuuri, katsenõu ja imuri näidised on esitatud 5. liites.

*Paljunemine*

37. Mõju paljunemisele hinnatakse 1. põlvkonna sääskede munetud munanõõride arvu ja nende munanõõride fertiilsuse järgi. Üks kord päevas kogutakse munanõõrid kristallisaatorist, mis on pandud igasse paljunduspuuri. Munanõõrid tuleks koguda ja viia koos vähemalt 2,5 ml veega samast nõust 12 süvendiga mikrotiiterplaatidele (üks munanõõr igasse süvendisse) või muusse sobivasse nõusse, mis kaetakse olulise aurumise vältimiseks kaanega. Iga munanõõri kohta registreeritakse järgmised omadused: munemise päev, suurus (normaalne, st  $1,0 \pm 0,3$  cm või väike; tavaliselt  $\leq 0,5$  cm) ja struktuur (normaalne on banaanikujuline spiraalne munanõõr või ebanormaalne, nt mittespiraalne munanõõr) ja fertiilsus (fertiilne või mitte). Kuue päeva jooksul pärast munanõõri munemist hinnatakse selle fertiilsus. Munanõõr on fertiilne, kui vähemalt üks kolmandik munadest koorub. Paljunduspuuri viidud emassääskede üldarvu põhjal arvutatakse munanõõride arv emassääske kohta ja fertiilsete munanõõride arv emassääske kohta. Vajaduse korral saab munade arvu munanõõris hinnata seda lõhkumata, kasutades rõngaste lugemise meetodit (üksikasjad vt 32 ja 33).

**Analüütilised mõõtmised***Uuritava kemikaali kontsentratsioon*

38. Kokkupuute alguses (vee rikastamise korral eelistatavalt tund aega pärast uuritava kemikaali lisamist) ja lõpus tuleks analüüsida suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. See kehtib mõlema põlvkonna nõude kohta. Paljunduspuuris olevas kristallisaatoris analüüsitakse ainult katvat veekihti, kuna munanõõrid puutuvad kokku just sellega (rikastatud settega katses võib kaaluda settes oleva kontsentratsiooni määramist). Kui peetakse vajalikuks, võib katse ajal teha veel täiendavaid sette, poorivee või katva veekihi analüüse. Kõnealused uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava kemikaali käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis. Sette ja poorivee proovide võtmiseks katse alguses ja ajal (vt punkt 39) on vaja täiendavaid katsenõusid, millest tehakse analüüse. Sette mõõtmised rikastatud veega katse puhul ei tarvitse olla vajalikud, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja sette vahel on vee-sette uuringus võrreldavates

▼ **M6**

tingimustes (näiteks sette ja vee suhtarv, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) selgelt ära määratud või kui katvas veekihis mõõdetud kontsentratsioonid on vahemikus 80–120 % nimiväärtusest või alguses mõõdetud kontsentratsioonist.

39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks 7. ja/või 14. päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katse-süsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.
40. Tsentrifugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine, kuna saadav proov on liiga väike.

*Füüsikalised-keemilised parameetrid*

41. Katsevee pH-d ja lahustunud hapniku sisaldust katsenõudes ja kristallisaa-torites ning vee temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ning ühes kõrgeima kontsen-tratsiooniga katsenõus ja kristallisaatoris mõõta karedust ja ammoniaaki.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

42. Käesoleva katse eesmärk on määrata uuritava kemikaali poolt kogu elut-sükli jooksul avaldatav mõju paljunemisele ning kahe põlvkonna puhul ka arengukiirusele ning elusate ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääs-kede üldarvule. Isas- ja emassääskede väljaarenemise suhtarvu leidmiseks tuleks andmed koondada. Kui sugupoolte arengukiiruse tundlikkuses kemikaali mõju suhtes ei ole statistiliselt olulisi erinevusi, võib isaste ja emastega saadud tulemused statistilisel analüüsil koondada.
43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad kontsentratsioonidel katvas veekihis (rikastatud vesi) või settes (rikastatud sete), arvutatakse tavaliselt katse alguses mõõdetud kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38). Seepärast rikastatud vee puhul kontsentratsioonid, mis tavaliselt on mõõdetud mõlema põlvkonna katsenõude katvas veekihis kemikaaliga kokkupuute alguses ja kristallisaatoris, keskmistatakse iga kontsentratsioo-nitaseme puhul. Rikastatud sette puhul keskmistatakse kontsentratsioonid, mis tavaliselt on mõõdetud mõlema põlvkonna katsenõudes kemikaaliga kokkupuute alguses (ja soovi korral ka kristallisaatoris), iga kontsentrat-sioonitaseme puhul.
44. Selleks et arvutada punkti hinnang, näiteks  $EC_x$ , võib iga katsenõu ja paljunduspuuri statistilisi näitajaid kasutada tegelike paralleelkatsetena. Iga  $EC_x$  usaldusvahemiku arutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tule-muste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu kohta arvutatud statistilisi andmeid teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem.  $EC_x$ -väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist (31).



▼ **M6**

45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC), tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust; selline arvessevõtmine on tagatud ANOVA meetodite kasutamisel (näiteks Williamsi ja Dunnetti testid). Williamsi test on sobiv, kui doosi-toime sõltuvus peaks teooria põhjal olema monotoonne, ja Dunnetti testi tuleks kasutada siis, kui monotoonuse hüpotees ei pea paika. Teisest küljest, olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud (31), võivad paremini sobida töökindlamad testid (27).

*Väljaarenemise määr*

46. Väljaarenemise (väljalennu) määra kirjeldavad binaarsed andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochran-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisheri täpset testi või Manteli-Haenzali testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelkatsete hajuvus on suurem kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochran-Armitage'i või Fisheri täpset testi, nagu on soovitatud (27).

Määratakse elus väljaarenenud sääskede (isas- pluss emasloomad) arv nõu kohta  $n_e$ , mis jagatakse sissepandud vastsete arvuga  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kus

ER = väljaarenemise (väljalennu) määr (*emergence ratio*);

$n_e$  = väljaarenenud sääskede arv nõu kohta

$n_a$  = sissepandud vastsete arv nõu kohta (tavaliselt 20)

Kui  $n_e$  on suurem kui  $n_a$  (see tähendab, et katsendusse pandi kogemata rohkem vastseid, kui oli kavas), võetakse  $n_a$  võrdseks  $n_e$ -ga.

47. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiivne lähenemisviis käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid, mis on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelkatse (nõu) kohta.
48. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinuse-ruutjuure-teisenduse või Tukey-Freemani teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Mantel-Haenzali testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinuse-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu ( $\sin^{-1}$ ).
49. Väljaarenemismäärade puhul arvutatakse  $EC_x$  väärtused regressioonanalüüsiga (näiteks probit-, logit- või Weibulli mudel (28)). Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), võib kasutada muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisevat keskmist või lihtsat interpolatsiooni.

*Arengu kiirus*

50. Keskmise arengu aeg väljendab keskmist ajavahemikku vastsete lisamise (katsepäev 0) ja sääskede katsekohordi väljaarenemise vahel (tegeliku

▼ **M6**

arenguaja arvutamisel tuleb arvesse võtta vastsete vanust katsesse sisseviimise ajal). Arengu kiirus (ühik: 1/päev) on pöörvõrdeline arengu ajaga ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle hajuvus on väiksem ja homogensem ning normaaljaotusele lähedasem kui arenguaja puhul. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevamaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab  $EC_x$  väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 29, 30). Arengu kiiruse keskväärtusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga. Kuna isassääsed arenevad välja emassääskedest varem (st nende arengu kiirus on suurem), on mõttekas arvutada arengu kiirus eraldi kummastki soost sääskede jaoks, lisaks üldisele sääskede arengu kiirusele.

51. Statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval  $x$  täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva  $x$  ja päeva  $x - 1$  vahel ( $l$  = kontrollimiste vahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmise arengu kiirus nõu kohta ( $\bar{x}$ ) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

kus

$\bar{x}$  – keskmine arengu kiirus nõu  $i$  kohta

$i$  – kontrollidevahemiku indeks;

$m$  – kontrollivahemike maksimaalne arv

$f_i$  – kontrollivahemikul  $i$  väljaarenenud sääskede arv

$n_e$  – eksperimendi lõpuks väljaarenenud sääskede koguarv ( $\Sigma f_i$ )

$x_i$  – ajavahemikul  $i$  väljaarenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1/\text{päev}_i - \frac{l_i}{2}$$

kus:

$\text{päev}_i$  – kontrolli päev (päevade arv pärast vastsete sisestamist katsesse)

$l_i$  – kontrollivahemiku  $i$  pikkus (päevades, tavaliselt 1 päev).

*Sooline jaotumine*

52. Soolist jaotumist kirjeldavad binaarsed-andmed ja seepärast tuleks seda hinnata Fisher'i täpse testi või muude sobivate meetoditega. *C. riparius*'e looduslik sugude suhtarv on 1, st isas- ja emasloomade arv on võrdne. Mõlemas põlvkonnas tuleks soolise jaotumise andmeid töödelda ühte moodi. Kuna sääskede maksimaalne arv nõus (st 20) on korraliku statistilise analüüsi jaoks liiga väike, leitakse kõikidest ühe kontsentratsiooni

▼ **M6**

paralleelkatsetest väljaarenenud elusate isas- ja emassääskede summaarsed arvud. Neid teisendamata andmeid võrreldakse (lahusti) kontrolli või koondatud kontrolli andmetega  $2 \times 2$  kooslustabelis.

*Paljunemine*

53. Paljunemist hinnatakse sigivuse kaudu, mida iseloomustatakse munanõõride arvuga emassääse kohta. Täpsemalt, paljunduspuuris munetud munanõõride arv jagatakse elusate ja kahjustamata emassääskede arvuga, kes viidi sellesse puuri. Sigivusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga.
54. Munanõõride fertiilsust kasutatakse selleks, et määrata viljakate munade arv ühe emassääse kohta. Paljunduspuuris munetud fertiilsete munanõõride arv jagatakse elusate ja kahjustamata emassääskede arvuga, kes viidi sellesse puuri. Viljakusele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) võib määrata ANOVA meetoditega, nt Dunnetti või Williamsi testiga.

**Katseprotokoll**

55. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

*Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline olek ja füüsikalised-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk,  $\log K_{ow}$ , jaotuskoefitsient mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees ja settes jne);
- kemikaali identifitseerimisandmed (tavanimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava kemikaali kvantitatiivse määramise meetod.

*Katseliik:*

- kasutatud katseorganismid: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- teave selle kohta, kuidas munamasse ja vastseid käideldi;
- teave 1. põlvkonna väljaarenenud valmikute käitlemise kohta (imuri vms abil) (vt 5. liide);
- katseorganismide vanus 1. ja 2. põlvkonna katsenõudesse viimise ajal.

*Katsetingimused:*

- kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud (kunstlik) sete;
- looduslik sete: setteproovide võtmise koha asukoht ja kirjeldus, kaasa arvatud saastelugu (võimaluse korral); sette omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);
- spetsiaalselt koostatud sete: sette valmistamine, koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne, mis määrati katse alguses);
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, karedus jne, mis määrati katse alguses);

**▼ M6**

- settekihi paksus ja seda katva veekihi paksus katsenõudes ja kristallisaatoris;
- katva veekihi ja poorivee ruumala; märja settekihi mass koos pooriveega ja ilma pooriveeta katsenõudes ja kristallisaatoris;
- katsenõud (materjal ja suurus);
- kristallisaatorid (materjal ja suurus);
- paljunduspuurid (materjal ja suurus);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuritud kontsentratsioonide saamine katsenõudes ja kristallisaatorites;
- uuritava kemikaali viimine katsenõudesse ja kristallisaatoritesse: kasutatud kontsentratsioonid, paralleelkatsete arv ja lahusti, vajaduse korral;
- katsenõude inkubatsiooni tingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (mulle sekundis);
- inkubatsioonitingimused paljunduspuurides ja kristallisaatorites: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus;
- munanõõride inkubeerimise tingimused mikrotiiterplaatidel (vm nõudes): temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

*Tulemused:*

- uuritava aine nimikontsentratsioonid, mõõdetud kontsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, millega määrati uuritava kemikaali kontsentratsiooni katsenõus ja kristallisaatoris;
- vee kvaliteet katsenõus ja kristallisaatoris, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;
- aurustunud katsevee asendamine katsenõus, kui seda tehti;
- väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga 1. ja 2. põlvkonna nõu ja iga päeva kohta;
- elusate ja väljaarenenud sääskede sooline jaotumine igal katses kasutatud kontsentratsioonil 1. ja 2. põlvkonnas;
- iga 1. ja 2. põlvkonna nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;
- 1. ja 2. põlvkonnas väljaarenemise protsent/osakaal iga paralleelkatse ja kontsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);
- 1. ja 2. põlvkonnas elusate ja väljaarenenud sääskede keskmine arengukiirus igas paralleelkatses ja igal kontsentratsioonil (isas- ja emassääsed eraldi ja ka koos);
- kristallisaatorisse munetud munanõõride arv paljunduspuuri ja iga päeva kohta;

▼ **M6**

- iga munanööri kirjeldus (suurus, kuju ja viljakus);
- sigivus – munanööride üldarv paljunduspuuridesse pandud emassääskede üldarvu kohta;
- viljakus – viljakate munanööride üldarv paljunduspuuridesse pandud emassääskede üldarvu kohta;
- mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC<sub>x</sub> (ja selle usaldusvahemik), täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) ja selle määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast metoodikast kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

## KIRJANDUS

- (1) Käesoleva lisa peatükk C.28 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud vee kasutamisega”.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.

▼ M6

- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Käesoleva lisa peatükk C.27 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamisega”.
- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The anti-epileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.

**▼ M6**

- (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼ **M6**

*1. liide*

**Mõisted**

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

**Kemikaal** – aine või segu.

**Spetsiaalselt koostatud sette** *ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sette* – selline materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks.

**Kattev veekiht** – vesi, mis on pandud katsenõus sette peale.

**Poorivesi** – vesi, mis asub sette- ja pinnaseosakeste vahelises ruumis.

**Rikastatud vesi** – katses kasutatav vesi, millele on lisatud uuritav kemikaal.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.



▼ **M6**

## 2. liide

***Chironomus riparius*'e kasvatamist käsitlevad soovitused**

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartslüüa kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida sobivas puuris, mis takistab väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).
2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja 8 tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

**Lahjendusvesi**

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, dekllooritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleks enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

**Vastsete söötmine**

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (Tetra Min®, Tetra Phyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (loksutage enne kasutamist). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.
5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleks hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.
6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseadmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

**Väljaarenenud valmikute söötmine**

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼ **M6****Väljaarenemine**

8. Temperatuuril  $20 \pm 2$  °C hakkavad ligikaudu 13–15 päeva möödumisel vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele ja kõhnemale kehale kergesti äratuntavad.

**Munamassid**

9. Kui valmikud on paljunduspuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 munamassi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

**Uute kasvunõude ülesseadmine**

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

**Katselahuste M4 ja M7 valmistamine**

12. Elenđt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda madalam. Katselahust ei tohiks koostada Elenđti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ja  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kontsentratsioon sobiv.

**Kasvukeskkonna M7 valmistamine**

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitainete põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2, ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena. Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

Tabel 1.

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need deioniseeritud veega 1 liitri		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
$\text{LiCl}$ (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

## ▼ M6

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need deioniseeritud veega 1 liitrini		Lõppkontsentratsioonid katse- lahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
RbCl <sup>(1)</sup>	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1) (2)</sup>	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O <sup>(1) (2)</sup>	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

<sup>(1)</sup> Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.

<sup>(2)</sup> Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavatakse viivitamata.

Tabel 2.

## Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katse- lahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	293 800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

▼ **M6**

Tabel 3.

**Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus**

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

## KIRJANDUS

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Strelke and H. Köpp. Berlin.

ElenDt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

ElenDt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

▼ **M6**

## 3. liide

**Spetsiaalselt koostatud sette valmistamine****SETTE KOOSTIS**

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus $\leq 1$ mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartslüiv	Tera suurus: $> 50$ % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 $\mu\text{m}$	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus $\geq 30$ %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 ( $\pm 0,5$ )
Kaltsiumkarbonaat	$\text{CaCO}_3$ , pulbriline, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30–50

**VALMISTAMINE**

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $5,5 \pm 0,5$ . Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril  $20 \pm 2$  °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent. pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema  $6,0 \pm 0,5$ . Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

**SÄILITAMINE**

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

**KIRJANDUS**

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

▼ **M6**

## 4. liide

**Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused**

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOONID
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO <sub>3</sub> -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

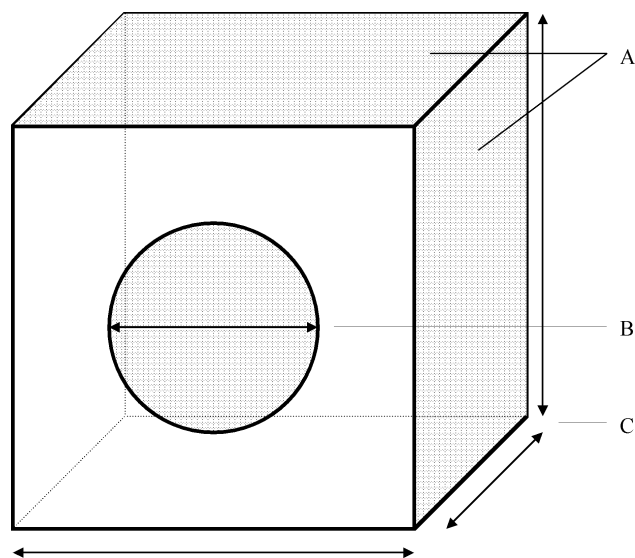
(\*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼ **M6**

## 5. liide

**Juhised katse tegemiseks**

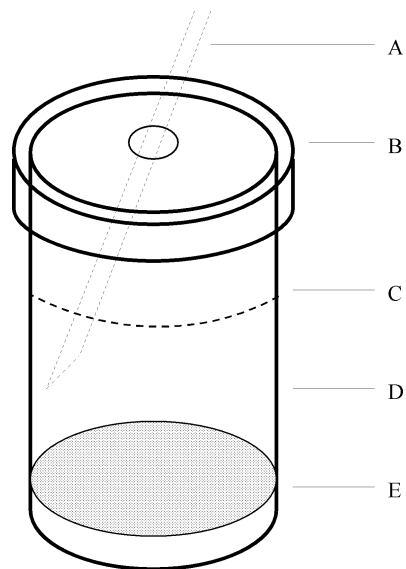
Paljunduspuuri näide:



- A: ažuurne riie puuri peal ja vähemalt ühel küljel (võrgusilma suurus ca 1 mm)
- B: ava väljaarenenud valmikute puuri panemiseks ja munetud munanõõride väljavõtmiseks kristallisaatorist (ei ole näidatud sellel pildil).
- C: paljunduspuuri mõõtmed on vähemalt  $30 \times 30 \times 30$  cm (pikkus  $\times$  laius  $\times$  kõrgus).

**▼ M6**

Katsenõu näide:

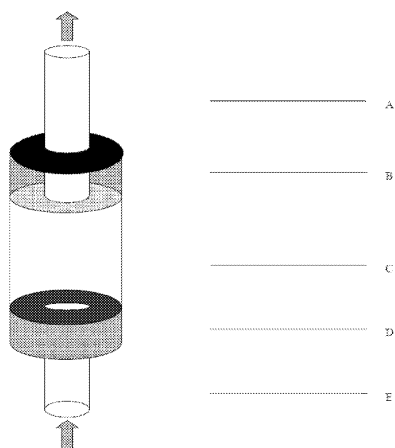


- A: Pasteuri pipett katva veekihi aereerimiseks
- B: klaaskaas, et hoida ära väljaarenenud sääskede väljapääsemine
- C: vee pinnakiht
- D: katsenõu (vähemalt 600 ml keeduklaas)
- E: settekiht



▼ **M6**

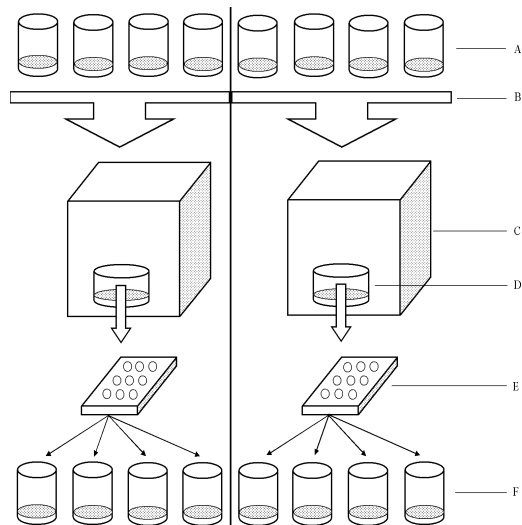
Imur sääsevalmikute püüdmiseks (nooled näitavad õhuvoolu suunda):



- A: klaastoru (sisediameter ligikaudu 5 mm), mis on ühendatud ise-eeltäituva imipumbaga
- B: vulkaniseeritud kummist kork, läbi mille läheb klaastoru A. Seestpoolt on klaastoru A avaus kaetud vati ja marliga (võrgusilma suurus ligikaudu 1 mm<sup>2</sup>), et vältida sääskede kahjustamist imurisse tõmbamisel.
- C: läbipaistev nõu (plastikust või klaasist, pikkus ligikaudu 15 cm) kogutud sääskede jaoks.
- D: vulkaniseeritud kummist kork, läbi mille läheb toru E. Sääskede lahtilaskmiseks paljunduspuuri võetakse nõult C ära kork D.
- E: plastikust või klaasist toru (sisediameter ligikaudu 8 mm) valmikute kogumiseks katsenõust.

▼ **M6**

Elutsükliit hõlmava katse skeem:



- A: 1. põlvkond – katsenõud, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, 8 paralleelkatset, 20 esimese kasvujärgu vastset igasse nõusse
- B: neli katsenõud paljunduspuuri kohta, A ja B
- C: paljunduspuurid (A ja B) valmikute parvedesse kogunemiseks, paaritumiseks ja munemiseks
- D: kristallisaatorid munanööride paigutamiseks
- E: mikrotiiterplaat, üks süvend iga munanööri jaoks
- F: 2. põlvkond – katsenõud, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, 8 paralleelkatset, 20 esimese kasvujärgu vastset igasse nõusse.

## ▼M6

## C.41. KALADE SUGULISE ARENGU KATSE

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 234 (2011). See põhineb ühel 1998. aasta otsusel töötada välja uued või ajakohastada olemasolevad katsemeetodid, millega saaks välja sõeluda võimalikke endokriinsüsteemi kahjustajaid. Kalade sugulise arengu katse (*Fish Sexual Development Test*, FSDT) tunnistati paljulubavaks katsemeetodiks, millega on hõlmatud nii östrogeeni- kui ka androgeenisarnaste kemikaalide toime suhtes tundlikud kalade arengu eluetapid. Katsemeetod läbis laboritevahelise valideerimise ajavahemikul 2006-2010, mille käigus valideeriti jaapani riisikala (*Oryzias latipes*), võõtdaanio (*Danio rerio*) ja ogalik (*Gasterosteus aculeatus*) ning osaliselt valideeriti tüse tõmpnina (*Pimephales promelas*) (41, 42, 43). Käesolevas katsejuhendis on käsitletud jaapani riisikala, ogaliku ja võõtdaanio. Käesoleva katse-eeskirjaga põhimõtteliselt laiendatakse OECD katsejuhendit 210 (Mürgisuse katse varases elujärgus kaladega) (1), mille puhul jätkatakse kalade kokkupuudet kemikaaliga kuni nende seksuaalse diferentseerumiseni, s.t ligikaudu 60. päevani pärast koorumist (*days post-hatch*, dph) jaapani riisikala, ogaliku ja võõtdaanio puhul (muude, edaspidi valideeritavate liikide puhul võib kokkupuuteaeg olla lühem või pikem), ning lisatakse sisesekreetsiooni suhtes tundlikke näitajaid. Kalade sugulise arengu katsega hinnatakse oletatavate endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide (nt östrogeenid, androgeenid ja steroidogeneesi inhibiitorid) mõju ja võimalikke kahjulikke tagajärgi kalade sugulisele arengule varasel eluetapil. Kahe tähtsaima endokriinsüsteemi näitaja, vitellogeniini kontsentratsiooni ja fenotüübi soolise jaotumise suhtarvu määramise kombinatsioon võimaldab selle katsega määrata uuritava kemikaali toimemehhanismi. Tänu fenotüübilise soolise jaotumise populatsioonist sõltuvale muutumisele saab kalade sugulise arengu katset kasutada ohtude ja riskide hindamiseks. Siiski, kui katse tehakse ohu või riski hindamiseks, ei tohiks valida ogaliku, kuna senised valideerimisandmed on näidanud, et selle liigi korral on fenotüübilise soolise jaotumise muutused uuritavate kemikaalide toimel olnud ebatavalised.
  
2. Katse-eeskiri põhineb kalade vee kaudu kokkupuutesse viimisel uuritavate kemikaalidega sugulise arengu labiilse perioodi jooksul, kus kala peaks olema kõige tundlikum seksuaalset arengut häirivate ja endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide mõju suhtes. Mõõdetakse endokriinsüsteemist tingitud arenguhäirete kaht peamist näitajat – vitellogeniini kontsentratsiooni ja sugunäärmete histoloogia põhjal soolise jaotumise suhtarvu. Sugunäärmete histopatoloogia (munarakkude ja spermatogeneesi määravate rakkude hindamine ja etappidesse jaotamine) on valikuline. Lisaks määratakse geneetiline sugu kui võimalik (nt Jaapani riisikala ja ogaliku puhul). Geneetiliste soomarkerite olemasolu on suur eelis, kuna see suurendab soolise jaotumise statistika võimsust ja võimaldab kindlaks teha individuaalset fenotüübilist soo arengu pöördumist. Muud apikaalsed näitajad, mis tuleks mõõta, on koorumise kiirus, elulemus, pikkus ja kehamass. Meetodit võib kohandada muudele liikidele kui eespool nimetatud, tingimusel et muu liik on läbinud valideerimise, mis on võrdne jaapani riisikala, ogaliku ja võõtdaanio puhul tehtuga, et kontrollrühma kalad on katse lõpuks sooliselt diferentseerunud, et vitellogeniini tase on piisavalt kõrge, et uuritava kemikaali põhjustatud muutused oleksid avastamiseks piisavalt suured, ja et katsesüsteemi tundlikkus on kontrollitud endokriinsüsteemi mõjutavate võrdluskemikaalidega ((anti-)östrogeenid, (anti-)androgeenid, aromataasi inhibiitorid jne). Lisaks sellele peaksid kõik muu liigiga tehtud kalade sugulise arengu katse valideerimisaruanded olema OECD poolt läbi vaadatud ja valideerimise tulemus tunnustatud rahuldavaks.

▼ **M6****Lähtekaalutlused ja piirangud**

3. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt munevate selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile (2). See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub ta verega munasarjadesse, kus see seotakse ja seda modifitseeritakse munade arengu käigus. Vitellogeniini süntees on väga piiratud (kuigi siiski avastatav) ebaküpssetes kalades ja isaskalades, kuna nende vereringes ei ole piisavalt östrogeeni. Kuid maks on võimeline seda sünteesima ja verre eritama vastuseks eksogeense östrogeeniga stimuleerimisele (3, 4, 5).
4. Vitellogeniini mõõtmist kasutatakse östrogeensete, antiöstrogeensete, androgeense toimemehhanismiga ja steroidogeneesi segavate uuritavate kemikaalide, näiteks aromataasi inhibiitorite avastamiseks. Östrogeensete kemikaalide avastamine on võimalik vitellogeniini indutseerimise mõõtmisega isaskalades ja see on teaduslikes eelretsenseeritud ajakirjades hästi tõendatud. Vitellogeniini induktsioon on tõendatud pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (6, 7). Kui emasloomade veres vähendatakse östrogeeni taset, näiteks sellega, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks 17 $\beta$ -östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise, mida kasutatakse selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis inhibeerivad aromataasi või laiemalt üldse steroidogeneesi (33). Pärast kokkupuudet östrogeeniga või aromataasi inhibiitoriga vitellogeniini tasemes ilmneva muutuse bioloogiline olulisus on hästi tõendatud (8, 9). Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus.
5. Välja on töötatud mitmed mõõtmismeetodid, mis on standarditud igapäevaseks kasutamiseks vitellogeniini taseme mõõtmisel üksikult kalalt võetud vere-, maksa-, kogu keha või pea/saba homogenaadi proovides. See kehtib võõtdaanio, ogaliku ja jaapani riisikala puhul, samuti osaliselt valideeritud tüseda tõmpnina puhul; vitellogeniini immunokeemiliseks mõõtmiseks on kättesaadavad liigispetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid (5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Jaapani riisikala ja võõtdaanio puhul on hea korrelatsioon vereplasma-, maksa- ja homogenaadiproovides mõõdetud vitellogeniinisalduse vahel, kuigi homogenaadis kipub sisaldus olema mõnevõrra väiksem kui plasmas (17, 18, 19). 5. liites on esitatud soovitatavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks.
6. Fenotüübikohase soolise jaotumise (sugudevahelise suhte) muutus on näitaja, mis iseloomustab soo arengu pöördumist. Põhimõtteliselt võivad arenevate kalade sugu mõjutada östrogeeni, antiöstrogeeni, androgeeni, antiandrogeeni või steroidogeneesi inhibiitori omadustega kemikaalid (20). On näidatud, et soo arengu pöördumine on võõtdaanio korral osaliselt pöörduv (21) pärast kokkupuudet östrogeenisarnase kemikaaliga, samas kui soo arengu pöördumine pärast kokkupuudet androgeenisarnase kemikaaliga on püsiv (30). Sugu on määratletud järgmiselt: emane, isane, vahesugu (interseksuaal; ühes sugunäärmes on nii ovotsüüte kui ka spermatoogeneesi rakke) või diferentseerumata, mis määratakse kala sugunäärmete individuaalse histoloogilise uuringuga. Juhendid on esitatud 7. liites ja OECD juhenddokumendis „Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (Juhenddokument kalade endokriinsüsteemiga seotud sugunäärmete histopatoloogia diagnoosimiseks) (22).
7. Geneetilist sugu uuritakse geneetiliste markerite kaudu, kui need on kõnealusel kalaliigil olemas. Jaapani riisikala emase XX- või isase XY-geene saab määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil või Y-kromosoomiga

▼ **M6**

seotud DM-domeeni geeni määramisega (DMY-negatiivne või -positiivne), nagu on kirjeldatud töödes (23, 24). Ogaliku puhul on olemas samaväärne PCR-meetod geneetilise soo määramiseks, mida on kirjeldatud 10. liites. Kui geneetiliselt sugu saab individuaalselt siduda fenotüübikohase sooga, suureneb testi tõhusus, ja seepärast tuleks geneetilist sugu määrata liikidel, kelle jaoks on dokumenteeritud geneetilise soo markerid.

8. Kaks peamist endokriinsüsteemi iseloomustavat näitajat, vitellogeniin ja sooline jaotumine), võimaldavad koos kindlaks määrata kemikaali endokriinse toimemehhanismi (tabel 1). Sooline jaotumine on populatsiooni asjakohane biomarker (25, 26) ja teatavate hästi uuritud toimemehhanismide puhul saab kalade sugulise arengu katse tulemusi kasutada ohtude ja riskide hindamiseks, kui reguleeriv asutus peab seda vajalikuks. Need toimemehhanismid on praeguse seisuga östrogeenid, androgeenid ja steroidogeneesi inhibiitorid.

Tabel 1.

**Endokriinsete näitajate muutumine mitmesuguse toimemehhanismiga kemikaalide mõjul:**

VTG – vitellogeniin, ↑ – suureneb, ↓ – väheneb, „—” – ei ole uuritud

Toimemehhanism	VTG ♂	VTG ♀	Sooline jaotumine	Viited
Nõrk östrogeeni agonist	↑	↑	↑♀ või ↑dif-mata	(27, 40)
Tugev östrogeeni agonist	↑	↑	↑♀ või ↑dif-mata, mitte ♂	(28, 40)
Östrogeeni antagonist	—	—	↑♀, ↑dif-mata	(29)
Androgeeni agonist	↓ või —	↓ või —	↑♂, mitte ♀	(28, 30)
Androgeeni antagonist	—	—	↑♀ ↑vahesugu	(31)
Aromataasi inhibiitor	↓	↓	↓♀	(33)

9. Kalade sugulise arengu katse ei hõlma kalade paljunemise eluperioodi, seepärast tuleks kemikaali, mis võib mõjutada viljakust madalamal kontsentratsioonil, kui kasutatakse seksuaalse arengu katses, uurida katses, mis hõlmab paljunemist.
10. Käesolevas katsemetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.
11. Kalade sugulise arengu *in vivo* katse eesmärk on teha kindlaks androgeensete või östrogeensete ning samuti antiandrogeensete, antiöstrogeensete ja steroidogeneesi inhibeerivate omadustega kemikaale. Kalade sugulise arengu katse valideerimise faasid (1 ja 2) hõlmasid östrogeenseid, androgeenseid ja steroidogeneesi pärssivaid kemikaale. Östrogeeni ja androgeeni antagonistide mõju kalade sugulise arengu katsele võib näha tabelist 1, kuid nende toimemehhanisme on senini vähem uuritud.

## KATSE PÕHIMÕTE

12. Katses viiakse kalaimud, alates äsja viljastatud marjateradest kuni sugulise diferentseerumise lõpuni, kokkupuutesse vees lahustatud uuritava kemikaali vähemalt kolme kontsentratsiooniga. Tuleks kasutada läbivooluga katset, välja arvatud juhtudel, kus see ei ole võimalik kemikaali kättesaadavuse või omaduste, nt piiratud lahustuvuse tõttu. Katse algab värskest viljastatud marjaterade (enne looteketta jagunemist) panemisega katsekambritesse. Kambrite täitmist iga kalaliigi puhul on kirjeldatud punktis 27. Valideeritud kalaliikide (jaapani riisikala, ogalik ja vöötdaanio)

▼ **M6**

puhul lõpetatakse katse 60. päeval pärast koorumist. Katse lõpus surmatakse kõik kalad humaansel viisil. Igast kalast võetakse bioloogiline proov (vereplasma, maksa või pea/saba homogenaat) vitellogeniini määramiseks ja ülejäänud osa fikseeritakse sugunäärmete histoloogiliseks hindamiseks, et määrata fenotüübikohane sugu; soovi korral võib teha histopatoloogia uuringu (nt sugunäärmete arenguetapi määramine, vahesugulisuse raskusaste). Bioloogiline proov (pärakuuim või seljauim) geneetilise soo määramiseks võetakse liikide puhul, kellel on sobivad sellekohased markerid (9. ja 10. liide).

13. Ülevaade asjakohastest liigispetsiifilistest katsetingimustest iga valideeritud liigi (jaapani riisikala, ogalik ja võõtdaanio) jaoks on esitatud 2. liites.

**ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

14. Kätesaadavad peaksid olema ägeda mürgisuse katse või muu lühiajalise mürgisuskatse tulemused [nt katsemeetod C.14 (34) ja OECD katsejuhend nr 210 (1)], eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud käesoleva katse jaoks. See eeldab, et on teada uuritava kemikaali lahustuvus vees ja aururõhk ning on olemas usaldusväärne analüütiline meetod kemikaali kvantitatiivseks mõõtmiseks katsekambrites teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega ning avastamispiiriga.
15. Lisaks on kasulik teada järgmist: struktuurvalem, kemikaali puhtus, püsivus vees ja valguse käes, pKa, P<sub>OW</sub> ja kiire biolagundatavuse katse tulemused (vt katsemeetod C.4) (35).

**Katse nõuetekohasuse tingimused**

16. Katse nõuetekohasuse tõendamisel arvestatakse järgmist:
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastumisel saadavast väärtusest (*air saturation value*, ASV) kogu katse jooksul;
  - vee temperatuur ei tohi kemikaaliga kokkupuute ajal eri katsekambrites kunagi erineda rohkem kui  $\pm 1,5$  °C ja tuleks hoida katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (2. liide);
  - Uuritava kemikaali määramiseks peaks olema valideeritud meetod, mille määramispiir on oluliselt allpool nominaalset kontsentratsiooni, ja tuleks koguda tõendeid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20$  % mõõdetud keskmisest väärtusest;
  - viljastatud marjaterade üldine ellujäämine kontrollkatsetes ja, kus see on oluline, ka ainult lahustit sisaldavates kontrollkatsetes ei tohiks olla väiksem kui 2. liites määratletud piirid;
  - vastuvõetavuse kriteeriumid, mis on seotud kasvuga ja soolise jagunemisega katse lõpetamisel, põhinevad kontrollrühmade andmetel (ühendatud lahusti kontrollrühmad ja vee kontrollrühmad, välja arvatud juhud, kui need erinevad oluliselt – siis ainult lahusti kontrollrühmad):

▼ **M6**

		Jaapani riisikala	Vöötdaanio	Ogalik
Kasv	Kuivaks pühitud kala märgmass	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Pikkus (standardpikkus)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Kui kasutatakse lahustit, ei tohiks sellel olla statistiliselt olulist mõju kalade ellujäämisele ja see ei tohiks mõjutada endokriinsüsteemi ega avaldada muud negatiivset mõju varajastele eluetappidele, mida kontrollitakse lahusti kontrollrühmaga.

Kui katse nõuetekohasuse kriteeriumidest leitakse kõrvalekaldumisi, tuleks kaaluda nende mõju katseandmete usaldusväärsusele ja need kaalutlused tuleks esitada katseprotokollis.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Katsekambrid**

17. Kasutada võib igasuguseid klaasist, roostevabast terasest või muust keemiliselt inertest materjalist katsekambreid. Kambrite mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et oleksid täidetud laadimisnormi kriteeriumid (vt allpool). Katsekambrid soovitatakse paigutada katse läbiviimise piirkonnas juhuslikult. Eelistatav on selline plokkide randomiseeritud paigutus, kus igas plokis on esindatud iga kontsentratsioon; see on parem kui täielikult randomiseeritud paigutus. Katsekambrid tuleks varjestada soovimatute häirimiste eest.

**Liigi valimine**

18. Soovitavad kalaliigid on esitatud 2. liites. Uue liigi lisamise kord on esitatud punktis 2.

**Sugukalade pidamine**

19. Sugukalade rahuldavate pidamistingimuste üksikasjad on esitatud OECD katsejuhendis nr 210 (1). Sugukaladele tuleks üks või kaks korda päevas anda sobivat sööta.

**Embrüote ja vastsete käitlemine**

20. Algul võivad embrüod ja vastsed kemikaaliga kokku puutuda suurde nõusse paigutatud väiksemates klaasist või roostevabast terasest kambrites, millel on võrkküljed, mis võimaldavad uuritava kemikaali lahuse voolamist läbi kambri. Keeristeta voolu läbi nende väikeste kambrite võib tekitada nii, et kambrid on riputatud kangi külge, mis liigutab neid üles ja alla, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses.
21. Kui peamises katsenõus on marjaterade hoidmiseks kasutatud marjaterade konteinereid, reste või võrke, tuleks pärast vastsete koorumist need tõkked eemaldada, välja arvatud sellised võrgud, mis tuleb säilitada kalade põgenemise vältimiseks. Kui vastseid on vaja ümber paigutada, ei tohiks nad õhuga kokku puutuda ning kalade väljatõstmiseks marjaterade konteinerist ei tohiks kasutada võrke. Selle ümberpaigutamise ajastamine erineb liigiti ja ümberpaigutamine ei pea alati olema vajalik.

▼ **M6****Vesi**

22. Kasutada võib igasugust vett, milles katsealuse liigi kontrollrühma isendid püsivad elusana vähemalt sama hästi kui 3. liites kirjeldatud vees. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Selle tagamiseks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katse tulemusi (näiteks uuritava kemikaaliga reageerimise kaudu) ega mõjutaks negatiivselt sugukarja võimet, tuleb veest perioodiliselt võtta proove analüüsimiseks. Kui lahjendamiseks kasutatav vesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks selles näiteks iga kolme kuu järel mõõta orgaanilise süsiniku üldsisaldust, elektrijuhtivust, pH-d ja hõljuvainete sisaldust. Raskmetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ja pestitsiidide sisaldust tuleks mõõta siis, kui vee kvaliteedi suhtes on kahtlusi. Keemilist analüüsi ja vee võtmist on kirjeldatud punktis 34.

**Katselahused**

23. Kui see on praktiliselt võimalik, tuleks kasutada läbivooluga süsteemi. Läbivooluga katsete puhul on vaja kasutada süsteemi, mis pidevalt lisab ja lahjendab uuritava kemikaali põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaalse lahjendamise seade ja küllastamissüsteem), et tekitada eri katsekambrites rida erinevaid kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolamise kiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel ja see ei tohiks kogu uuringu jooksul varieeruda rohkem kui 10 %. Sobivaks peetakse voolukiirust, mis vastab vähemalt katsekambri viiekordsele ruumalale 24 tunni jooksul (1). Tuleks vältida plastiktorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale või adsorbida uuritavat kemikaali.
24. Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada ilma lahusteid kasutamata, lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamise lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, võib kasutada meetodeid, mida on kirjeldatud OECD juhenddokumendis veekeskkonda ohustava mürgisuse katsetamiseks raskesti lahustuvate ainete ja segude puhul (36). Lahusti kasutamist tuleks vältida, kuid mõnel juhul võib see olla vajalik sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Sobivad lahustid on esitatud publikatsioonis (36).
25. Poolstaatilisi katsetingimusi tuleks vältida, välja arvatud juhul, kui nende kasutamiseks esitatakse kaalukad põhjused, mis on seotud uuritava kemikaaliga (nt stabiilsus, piiratud kättesaadavus, suured kulud või ohud). Poolstaatilise meetodi korral võib järgida kahte erinevat uuendamise menetlust. Puhastesse kambritesse võib valmistada uued katselahused ning elus olevad marjaterad ja vastsed kanda ettevaatlikult üle uutesse kambritesse; teise võimalusena võib katseorganisme hoida samades katsekambrites ja uuendatakse osa katseveest (vähemalt kaks kolmandikku) iga päev.

**KATSE KÄIK****Kokkupuutetingimused***Marjaterade kogumine ja kestus*

26. Geneetilise hälbe vältimiseks kogutakse marjaterad vähemalt kolmelt kalade paarilt või rühmalt, segatakse ja valitakse katse alustamiseks välja juhuvalikuga. Kunstlikku viljastamist ogaliku puhul on kirjeldatud 11. liites. Katse peaks algama niipea kui võimalik pärast marjaterade viljastamist, embrüod oleks soovitatav viia katselahusesse enne looteetta jagunemise algust või



▼ **M6**

võimalikult kiiresti pärast seda ning mitte hiljem kui 12 tundi pärast viljastamist. Katse peaks jätkuma seni, kuni suguline diferentseerumine kontrollrühmas on lõppenud (jaapani riisikala, ogaliku ja võotdaanio korral 60 päeva pärast koorumist).

*Marjaterade panemine katsesse*

27. Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks iga kontsentratsiooni kohta olema vähemalt 120, mis jagatakse vähemalt 4 paralleelkatse vahel (kontrolliks on lubatud võtta ruutjuur marjaterade arvust katses). Marjaterad tuleks jaotada kontsentratsioonitasemetel juhulvaliku alusel (kasutades statistilisi randomiseerimistabeleid). Laadimisnorm (vt mõisted, 1. liide) peaks olema piisavalt madal, et kambrites oleks ilma otsese aereerimiseta võimalik hoida lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Läbivooluga katsetes soovitatakse laadimisnormi, mis ei ületa 0,5 g/l 24 tunni kohta ega 5 g/l lahust mis tahes ajal. Hiljemalt 28 päeva pärast viljastamist tuleks kalade arv paralleelkatsetes ümber jaotada, nii et igas proovis oleks võimalikult ühesugune arv kalu. Kui kokkupuude kemikaaliga põhjustab suremust, tuleks paralleelkatsete arvu vähendada nii, et kalade asustustihedus eri kontsentratsioonidel hoitaks võimalikult ühesugune.

*Valgus ja temperatuur*

28. Valgustuse kestus ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt kalade sugulise arengu katses kasutatavad katsetingimused, 2. liide).

*Söötmine*

29. Sööt ja söötmine on otsustava tähtsusega ning on oluline, et igal arenguetapil antaks õiget sööta õigete ajavahemike tagant ja normaalse kasvu jaoks vajalikul tasemel. Söötmine peaks olema *ad libitum*, kuid ülejääk tuleks viia miinimumini. Piisava kasvukiiruse saavutamiseks tuleks kalu sööta vähemalt kaks korda päevas (nädalavahetusel on lubatud üks kord päevas); söötmine vaheaeg peaks olema vähemalt kolm tundi. Sööda ülejäägid ja väljaheidet tuleks vajaduse korral eemaldada, et vältida jäätmekogunemist. Vastavalt kogemuste omandamisele täiustatakse pidevalt söötmissüsteemi, et vähendada suremust ja optimeerida kasvu. Kavandatud režiim tuleks lasta kinnitada tunnustatud eksperdil. Enne katse lõpetamist ei tohiks kalu 24 tundi sööta. Sobiva sööda näited on loetletud 2. liites (vt ka kaladega tehtavate katsete OECD raamistik (39)).

**Uuritava kemikaali kontsentratsioonid**

30. Uuritava kemikaali kontsentratsioonid tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud 4. liites. Tuleks kasutada vähemalt kolme kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega. Uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valikul tuleks arvesse võtta ägeda mürgisuse uuringus leitud LC<sub>50</sub> ja kokkupuuteperioodi vahelist sõltuvust. Riskide hindamiseks sobivate andmete saamiseks on soovitatav kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni.
31. Kemikaali kontsentratsioon, mis on suurem kui 10 % täiskasvanud isendi jaoks ägeda mürgisuse LC<sub>50</sub> või 10 mg/l, milline neist on madalam, ei ole vaja uurida. Suurim katses kasutatav kontsentratsioon peaks olema 10 % LC<sub>50</sub>-st vastse- või noorjargustaadiumi jaoks.

**▼ M6****Kontrollkatsed**

32. Lisaks uuritava aine kontsentratsioonidele tuleks teha üks lahjendusvee kontrollkatse ( $\geq 4$  paralleelkatset) ja, kui see on asjakohane, lahusti kontrollkatse ( $\geq 4$  paralleelkatset). Katses tuleks kasutada üksnes lahustit, mida on uuritud ja mille kohta on näidatud, et sellel ei ole statistiliselt olulist mõju katses määratavatele näitajatele.
33. Kui kasutatakse lahustit, ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l (36) ja see peaks olema ühesugune kõikides katsekambrites, välja arvatud lahjendusvee kontrollkatse. Siiski tuleks teha kõik, et vältida sellise lahusti kasutamist või hoida selle kontsentratsioon võimalikult madal.

**Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

34. Enne katse alustamist tuleks teha uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramine, et kontrollida kõigi katse vastuvõetavuse kriteeriumide täitmist. Iga paralleelkatset tuleks eraldi analüüsida katse alguses ja lõpus. Iga uuritava kontsentratsiooni üht paralleelkatset tuleks katse ajal analüüsida vähemalt kord nädalas, vahetades süstemaatiliselt uuritavat paralleelkatset (1,2,3,4,1,2 ...). Kui proove säilitatakse hilisemaks analüüsiks, peaks proovide säilitamise meetod olema eelnevalt valideeritud. Selleks, et olla kindel, et analüüsitakse uuritava kemikaali tõelist lahust, tuleks proovid filtrida (nt läbi filtri, mille poori suurus on 0,45  $\mu\text{m}$ ) või tsentrifuugida.
35. Katse ajal mõõdetakse kõikides katsekambrites lahustunud hapnikku, pH-d, üldkaredust, elektrijuhtivust, soolsust (kui see on asjakohane) ja temperatuuri. Iga nädal tuleks määrata vähemalt lahustunud hapniku kontsentratsiooni, soolsust (kui see on oluline) ja temperatuuri ning katse alguses ja lõpus tuleks mõõta pH-d, elektrijuhtivust ja karedust. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsekambris.
36. Tulemused peaksid põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20\%$  kontsentratsiooni nimiväärtusest kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimiväärtustel või mõõdetud väärtustel.

**Vaatlused ja mõõtmised***Embrüonaalse arengu staadium*

37. Kokkupuudet tuleks alustada võimalikult kohe pärast viljastamist ning enne looteketta jagunemist ja hiljemalt 12 tundi pärast viljastumist, et tagada kokkupuude varase embrüonaalse arengu jooksul.

*Koorumine ja ellujäämine*

38. Koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja vastavad arvud tuleks protokollida. Surnud embrüod, vastsed ja noorkalad tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda ning teised kalad võivad need tükkideks lõhkuda. Surnud isendite eemaldamisel tuleks olla eriti hoolikas, et mitte häirida või füüsiliselt kahjustada kõrvalolevaid marjaterasid/vastseid, kuna need on äärmiselt õrnad ja tundlikud. Surma kriteeriumid sõltuvad eluetapist:

— marjaterade puhul: eriti varastes etappides, oluline läbipaistvuse kadumine ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkainete koaguleerumise ja/või sadestumisest, mille tulemusel välimus muutub valgeks ja läbipaistmatuks;

▼ **M6**

— vastsete ja noorkalade puhul: liikumatus ja/või hingamisliigutuste puudumine ja/või südamelõökide puudumine ja/või kesknärvisüsteemi värvumine valgeks ja läbipaistmatuks ja/või reaktsiooni puudumine mehaanilisele ärritajale.

*Kõrvalekalded välimuses*

39. Tuleks registreerida selliste vastsete või kalade arv, kelle kehal esineb nähtavaid kõrvalekaldeid normist, ning kirjeldada kõrvalekalde välist pilti ja laadi. Tuleks märkida, et loomuliku arengu käigus esineb embrüote ja vastsete kõrvalekaldeid ning nende osakaal võib teatud liikidel olla kontrollkatse(te)s mitmeid protsente. Kõrvalekaldega loom tuleb katsekambrist alles siis eemaldada, kui ta sureb. Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiivile 2010/63/EL (teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta) tuleb sellised loomad, kellele kõrvalekalded tekitavad valu, kannatusi, stressi või püsivaid kahjustusi ja usaldusväärset on võimalik prognoosida surmlõpet, siiski uimastada ja valutult surmata, nagu on kirjeldatud punktis 44, ning võtta neid arvesse suremuse andmete analüüsil.

*Kõrvalekalded käitumises*

40. Kui märgatakse kõrvalekaldeid käitumises, nt hingeldamist, rikutud koordinatsiooni ujumisel, ebatüüpilist loidust ja ebatüüpilist toitumiskäitumist, tuleb see registreerida protokollis.

*Kehamass*

41. Katse lõpus tuleks kõik ellujäänud kalad surmata (tuimastada, kui tuleks võtta vereproovid) ja määrata iga kala märgmass (pärast kala kuivaks pühkimist).

*Pikkus*

42. Katse lõpus tuleks mõõta iga kala pikkus (standardpikkus).
43. Nendest vaatlustest saadakse järgmised andmed, mis esitatakse katseprotokollis:

— kumulatiivne suremus;

— tervete kalade arv katse lõpus;

— aeg koorumise alguse ja lõpuni;

— ellujäänud loomade pikkus ja mass;

— deformeerunud vastsete arv;

— ebatavalise käitumisega kalade arv.

**Proovide võtmine kaladest**

44. Proovid võetakse kaladest katse lõpus. Prooviks võetud kalad surmatakse valutult näiteks MS-222 abil (100–500 mg/l, puhverdatud NaHCO<sub>3</sub> abil, mida lisatakse 200 mg/l) või FA-100 abil (4-allüül-2-metoksüfenool ehk eugenool) ning mõõdetakse eraldi ja kaalutakse märjalt (kuivaks pühituna) või kui neist tuleks võtta vereproov, siis tuimastatakse (vt punkt 49).

**Proovide võtmine vitellogeniini määramiseks ja soo määramiseks histoloogilise hindamisega**

45. Kõik kalad tuleb võtta prooviks ja valmistada need ette soo ja vitellogeniini määramiseks. Kõiki kalu tuleks analüüsida histoloogiliselt soo määramiseks.

▼ **M6**

Vitellogeniini mõõtmiseks võib igast paralleelkatsest võtta osaproovina vähemalt 16 kala. Kui osaproovi tulemus on ebaselge, tuleks vitellogeniini suhtes analüüsida rohkem kalu.

46. Vitellogeniini ja soo määramiseks proovide võtmise kord oleneb vitellogeniini määramise meetodist:

*Pea/saba homogenaadi meetod vitellogeniini määramiseks*

47. Kala surmatakse valutult. Iga kala pea ja saba eraldatakse skalpellilõige-tega kala kehast; lõiked tehakse otse rinnauime ja otse seljauime tagant (vt joonis 1). Iga kala pea- ja sabaosad ühendatakse, kaalutakse, nummerdatakse eraldi, külmutatakse vedelas lämmastikus ja säilitatakse – 70° juures või madalamal temperatuuril vitellogeniini määramiseks. Iga kala kehaosa nummerdatakse ja fikseeritakse sobiva fikseeriva lahusega histoloogiliseks hindamiseks (22). Selle meetodi kasutamisel hinnatakse vitellogeniini ja histopatoloogia iga üksiku kala puhul eraldi ja vitellogeniini sisalduse võimaliku muutuse võib siduda kala fenotüübikohase või geneetilise sooga (jaapani riisikala ja ogalik). Täiendava teabe saamiseks vt homogeennimise juhised (5. liide) ja vitellogeniini kvantitatiivse määramise juhend (6. liide).

*Maksa homogenaadi meetod vitellogeniini määramiseks*

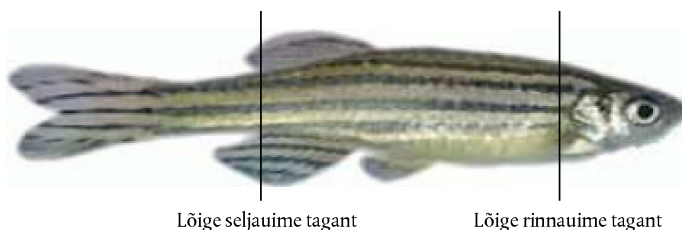
48. Kala surmatakse valutult. Maks lõigatakse välja ja säilitatakse – 70 °C juures või madalamal temperatuuril. Maksa eemaldamiseks ja eeltötluseks soovitatud meetodid on esitatud OECD katsejuhendis nr 229 (37) või käesoleva lisa peatükis C.37 (38). Iga kala maks seejärel homogeenitakse eraldi, nagu on kirjeldatud OECD katsejuhendis nr 229 ja käesoleva lisa peatükis C.37. Supernatant kogutakse vitellogeniini mõõtmiseks homoloogse ELISA meetodiga (vt vitellogeniini kvantitatiivne mõõtmine võõrdaanio puhul, 6. liide, või jaapani riisikala puhul, OECD katsejuhend nr 229 (37)). Sellise lähenemisviisi kasutamisel saab iga kala jaoks määrata vitellogeniini ja sugunäärmete histoloogia.

*Vereplasma meetod vitellogeniini määramiseks*

49. Veri, mis on kogutud tuimastatud kalast südamepunktsiooniga, sabaveenist või sabalõike abil, tsentrifuugitakse 4 C juures plasma kogumiseks. Plasma säilitatakse – 70 C või madalama temperatuuri juures kuni kasutamiseni. Terve kala surmatakse valutult ja fikseeritakse histoloogia uurimiseks. Nii plasmaproovid kui ka kalad nummerdatakse ükshaaval, et vitellogeniini sisalduse saaks siduda kala sooga.

*Joonis 1.*

**Kala lõikamine vitellogeniini mõõtmiseks pea/saba homogenaadist ja keskmise osa histoloogiliseks hindamiseks.**



▼ **M6***Geneetilise soo määramine*

50. Bioloogiline proov geneetilise soo määramiseks võetakse üksikkaladelt, kes kuuluvad liikidesse, mille isenditel on soomarkerid. Jaapani riisikala puhul võetakse pärakuuim või seljauim. 9. liites on esitatud üksikasjalik kirjeldus, sealhulgas koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga soo määramise kohta. 10. liites on esitatud koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga soo määramise kirjeldus ogaliku puhul.

**Vitellogeniini määramine**

51. Vitellogeniin tuleks määrata kvantitatiivse ja analüütiliselt valideeritud meetodiga. Laboris kasutatava meetodi puhul peaks olema teada selle tulemuste katsetevaheline ja laboritevaheline varieeruvus. Laborisiseste ja laboritevaheliste varieeruvuse põhjuseks on (kõige tõenäolisemalt) kalapopulatsioonide erinev arenguaste. Võttes arvesse vitellogeniini määramise varieeruvust, tuleb üksnes selle alusel leitud täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) väärtusesse suhtuda suure ettevaatusega. Vitellogeniini sünteesi hindamiseks käesolevas katses kasutatud kalaliikide puhul on mitmesuguseid meetodeid. Küllaltki tundlik ja spetsiifiline meetod on selle valgu kontsentratsioonide mõõtmine ensüümimmunosorptsioonanalüüsiga (ELISA). Tuleks kasutada sama liigi vitellogeniini suhtes saadud (homoloogseid) antikehasid ja kõige olulisemaid homoloogseid standardeid.

**Soo määramine**

52. Sõltuvalt vitellogeniini määramiseks proovi võtmise meetodist pannakse kas terve kala või iga kala allesjäänud keskmine osa eelnevalt märgistatud töötlemiskassetti ja fikseeritakse fikseeriva lahusega, mis sobib kala soo histoloogiliseks määramiseks (ja soovi korral ka sugunäärmete arengustadiumi hindamiseks). Fikseerimise ja parafiini sisse valamise juhendid on esitatud 7. liites ja OECD juhenddokumendis „Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (Juhenddokument kalade endokriinsüsteemiga seotud sugunäärmete histopatoloogia diagnoosimiseks) (22). Pärast töötlemist valatakse kalad parafiinplokkidesse. Üksikud kalad tuleks parafiinplokki paigutada pikisuunas. Igast kalast tehakse vähemalt kuus pikisuunalist frontaaltsandi lõiget (paksusega 3–5 µm), milles on näha mõlema sugunäärme koed. Nende lõigete vahekaugus peaks olema ligikaudu 50 µm isas- ja 250 µm emasloomade puhul. Kuna aga igas parafiinplokis on sageli nii isas- kui ka emasloomi (kui plokis on rohkem kui üks kala), peaks plokkidest tehtavate lõigete vahekaugus olema ligikaudu 50 µm, kuni iga isase sugunäärmetest on saadud vähemalt kuus lõiget. Seejärel võib suurendada lõigete vahekauguse kuni ligikaudu 250 µm-ni emaskalade puhul. Lõiked värvitakse hematokstiiliini ja eosiini abil, ning uuritakse valgusmikroskoobiga soo määramiseks (isane, emane, vahesugu või diferentseerumata). Vahesugu on määratletud rohkem kui ühe munaraku leidumisega niisas kuue analüüsitud lõike kohta või spermatogeneesirakkude leidumisega (jah/ei) munasarjades. Munasarjade ja munandite histopatoloogia ja arengustadiumi määramine on vabatahtlik, kuid kui seda tehakse, tuleks andmeid statistiliselt analüüsida ja need esitada. Tuleks märkida, et mõnel kalaliigil (nt jaapani riisikalal ja mõnikord võõtdaaniol) ei ole looduslikult täielikult väljaarenenud sugunäärmete paari, ja siis võib kalal olla ainult üks sugunäärre. Kõik niisugused tähelepanekud tuleks registreerida.
53. Geneetilise soo määramine üksikul jaapani riisikalal põhineb isast määrava geeni DMY olemasolu või puudumise määramisel; DMY asub Y-kromosoomis. Riisikala genotüübilise soo võib teha kindlaks näiteks päraku- või seljauimetüki DNA-st eraldatud DMY-geeni sekveneerimisega.

**▼ M6**

DMY olemasolu näitab, et tegemist on XY-kromosoomipaariga (isaskala), olenemata kala fenotüübist, samas kui DMY puudumine osutab XX-paarile (emaskala), olenemata fenotüübist (23). Koepreparaatide valmistamise ja PCR-meetodi kasutamise juhendid on esitatud 9. liites. Ka üksiku ogaliku geneetiline sugu määratakse PCR-meetodiga, mida on kirjeldatud 10. liites.

54. Vahesoo (vt mõisted, 1. liide) esinemine tuleks märkida katseprotokollis.

**Teised sootunnused**

55. Sellistel liikidel nagu jaapani riisikala on teised sootunnused endokriinsüsteemi kontrolli all; seepärast tuleks kemikaaliga kokkupuute lõpus teha võimaluse korral kala füüsilise välimuse vaatlus. Jaapani riisikala puhul on nn papillaari moodustumine pärakuuime tagaosas emaskaladel androgeeni-sõltuv. Käesoleva lisa peatükis C.37 (38) on esitatud asjakohased fotod isaskalade ja androgeeniga mõjutatud emaskalade teiseste sootunnuste kohta.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

56. On oluline, et uuritav näitaja määrataks kõige usaldusväärsema statistilise testiga. Eksperimentaalne ühik on paralleelkatse, kuid paralleelkatsete vaheline hajuvus peaks olema statistilises analüüsis arvesse võetud. 8. liites on esitatud otsustamisskeem; see peaks aitama kasutada kõige kohasemat statistilist testi, millega võetaks arvesse katsega saadud andmete omadusi. Statistilise olulisuse tase on 0,05 kõigi määratavate näitajate puhul.

**Sooline jaotumine ja geneetiline sugu**

57. Soolises jaotumises tuleks analüüsiga otsida olulist mõju (NOEC/LOEC lähenemisviis), mida on avaldanud kokkupuude kemikaaliga; kui doosi-toime sõltuvus on monotoonne, siis sobib Jonckheere'i-Terpstra (trendi-)test. Mittermonotoonse mõju puhul tuleb rakendada paariviisi võrdlemist: kui saadakse normaaljaotus ja homogeenne dispersioon, tuleb kasutada Dunnetti testi. Heterogeense dispersiooni puhul kasutatakse Tamhane-Dunnetti testi. Muudel juhtudel kasutatakse Mann-Whitney täpset testi koos Bonferroni-Holmi kohandusega. 8. liites on esitatud soolise jaotumise andmete statistilise töötlemise otsustamisskeem. Soolise jaotumise andmed tuleks esitada tabelis: isaste, emaste, vahesoo ja diferentseerumata suguelunditega isendite osakaal igal uuritava kemikaali kontsentratsioonil  $\pm$  standardhälve. Esile tuleks tõsta statistiline olulisus. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandes (42) on esitatud sellekohased näited. Geneetiline sugu tuleks esitada protsendina fenotüübi poolest isaste, emaste, vahesoost või sootunnuste osas diferentseerumata kalade hulgas.

**Vitellogeniini kontsentratsioonid**

58. Vitellogeniini kontsentratsioon tuleks analüüsiga otsida olulist mõju (NOEC/LOEC lähenemisviis), mida on avaldanud kokkupuude kemikaaliga. Parem on kasutada Dunnetti testi kui t-testi koos Bonferroni parandusega. Kui kasutatakse Bonferroni parandust, siis on eelistatav Bonferroni-Holmi parandus. Vitellogeniini kontsentratsiooni tuleks vaadelda logaritmilisel kujul, et saavutada normaaljaotus ja dispersiooni homogeenus. Seejärel, kui kontsentratsiooni-toime sõltuvus on monotoonne, tuleks kõikidest eespool kirjeldatutest eelistada Jonckheere'i-Terpstra testi. Kui kasutatakse t-teste või Dunnetti testi, ei ole jätkamiseks vaja ANOVA

**▼ M6**

olulise F-testi. Üksikasjad on esitatud 8. liites otsustusskeemis. Tulemused tuleks esitada tabelis: isaskalade, emaskalade, vahesoost kalade ja diferentseerumata suguelunditega kalade puhul mõõdetud keskmine kontsentratsioon  $\pm$  standardhälve. Esile tuleks tuua statistiline olulisus fenotüübiliste emaste ja fenotüübiliste isaste puhul. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandes (42) on esitatud sellekohased näited.

**Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid**

59. Uuritava kemikaali tegelikke kontsentratsioone katsekambrites tuleks analüüsida sellise sagedusega, nagu on öeldud punktis 34. Tulemused tuleks esitada tabelites: keskmine kontsentratsioon  $\pm$  standardhälve paralleelkatsete põhjal, samuti kontsentratsiooni põhjal; lisada teave proovide arvu kohta ja tõsta esile suured,  $\pm 20\%$  kõrvalekalded keskmisest uuritava kemikaali kontsentratsioonist. Kalade sugulise arengu katse valideerimise 2. etapi aruandest (42) võib leida sellekohased näited.

**Tulemuste tõlgendamine**

60. Katse tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioonid on analüütilise meetodi määramispiiri lähedal.

**Katseprotokoll**

61. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav kemikaal*

- asjakohased füüsikalised-keemilised omadused, kemikaali identifitseerimisandmed, sh andmed uuritava kemikaali puhtuse kohta ja kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks kasutatud analüütilise meetodi kohta.

*Katsetingimused*

- Kasutatud katsemeetod (läbivoolukatse või poolstaatiline uuendamisega katse); katse kava, sealhulgas uuritava kemikaali kontsentratsioonid, põhilahuse valmistamise meetod (lisas), uuendamise sagedus (kui kasutatakse lahustit, siis selle nimetus ja kontsentratsioon);
- uuritava kemikaali nominaalsed kontsentratsioonid, katsekambrites mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning nende mõõtmismeetod (kasutatud analüüsimeetod tuleb esitada lisas); tõendid selle kohta, et mõõdeti uuritava kemikaali kontsentratsiooni tegelikus lahuses;
- vee kvaliteet katsekambrites: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda (söötade) tüüp, päritolu, antud kogus ja söötmise sagedus ning saasteainete analüüs (nt polüklorobifenüülid, polüaromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid), kui see on asjakohane.

*Tulemused*

- Tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid nõuetekohase kriteeriumidele: koorumismäär käsitlevad andmed tuleks esitada tabelites protsendina iga paralleelkatse ja uuritava kontsentratsiooni kohta. Võõrväärtused, mis ei vasta heakskiitmise kriteeriumidele (kontrollides), tuleks esile tõsta. Ellujäämismäär tuleks esitada tabelites protsendina iga paralleelkatse ja uuritava kontsentratsiooni kohta. Võõrväärtused, mis ei vasta katse nõuetekohase kriteeriumidele (kontrollides), tuleks esile tõsta.
- Selgelt tuleb esitada otsitavate näitajate jaoks saadud tulemused: embrüote ellujäämine ja koorumise õnnestumine; välised anomaaliad; pikkus ja mass; vitellogeniini mõõtmised (ng homogenaadi g kohta, ng plasma kohta või ng maksa mg kohta); sugunäärmete histoloogia,

▼ M6

sooline jaotumine, geneetilise soo andmed; kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad muutused, mida on põhjustanud uuritav kemikaal.

62. Tulemused tuleks esitada kujul: keskvärtus ± standardhälve (SD) või standardviga (SE). Statistika tuleks käsitleda vähemalt LOEC ja NOEC väärtuste ja usaldusvahemike esitamise juures. Järgida tuleks statistiliste töötluste skeemi (8. liide).

## KIRJANDUS

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment”, *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbeck, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors”, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbeck, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone”, *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.
- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney



## ▼ M6

- hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka”, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*”, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development*” 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*”, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.
- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations”, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.

▼ **M6**

- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)”, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations”, *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)”, *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Käesoleva lisa peatükk C.14. Noorkalade kasvukatse.
- (35) Käesoleva lisa peatükk C.4. Kohese biolagunduvuse määramine.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Käesoleva lisa peatükk C.37. 21-päevane katse kaladega – lühiajaline söelkatse östrogeense ja androgeense toime ning aromataasi inhibeerimise kontrollimiseks.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*” *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta. ELT L 276, 20.10.2010, lk 33.

**▼ M6***1. liide***Lühendid ja mõisted**

- Apikaalne näitaja** – näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil
- ASV** – õhuga küllastamise väärtus (*air saturation value*)
- Biomarker** – näitaja, mis iseloomustab mõju üksikisendi tasandil
- Kemikaal** – aine või segu
- DPH** – päevad pärast koorumist (*Days post hatch*)
- DMY** – Y-spetsiifiline DM-domeeni geen, mis määrab jaapani riisikala arenemise isaskalaks
- ELISA** – ensüümimmunosorptsioonanalüüs (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- Kala mass** – kuivaks pühitud kala märgmass
- FSDT** – kalade seksuaalse arengu katse
- HAS-telg** – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg
- Vahesoost kala** – kala, kellel on enam kui üks munarakk niisas kuue analüüsitud lõike kohta või spermatogeneesi rakud munasarjades (jah/ei)
- Laadimisnorm** – kalade märgmass vee ruumala kohta
- MOA** – toimemehhanism (*mode of action*)
- RT-PCR** – pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon
- Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil
- Diferentseerumata kala** – kala, kelle sugunäärmetes ei ole võimalik eristada sugurakke.
- VTG** – vitellogeniin

## ▼ M6

## 2. liide

## Kalade sugulise arengu katse tingimused (mageveekalade liigid)

1. Soovitav liik	Jaapani riisikala ( <i>Oryzias latipes</i> )	Vöötdaanio ( <i>Danio rerio</i> )	Harilik ogalik ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )
2. Analüüsi tüüp	Läbivooluga või poolstaatiline	Läbivooluga või poolstaatiline	Läbivooluga või poolstaatiline
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valguse intensiivsus	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood	12–16 tundi valgust, 8–12 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 8–12 tundi pimedust	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust
7. Minimaalne kambri suurus	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett	Iga üksikkamber peaks sisaldama vähemalt 7 l vett
8. Uuritava lahuse kogu ruumala asendamine	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
9. Katseorganismide vanus kemikaaliga kokkupuute alguses	Värskelt viljastatud marjaterad (varane blastula staadium)	Värskelt viljastatud marjaterad (varane blastula staadium)	Värskelt viljastatud marjaterad
10. Marjaterade arv ühe kemikaalkontsentratsiooni kohta	Vähemalt 120	Vähemalt 120	Vähemalt 120
11. Kontsentratsioonide arv	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)	Vähemalt 3 (pluss vajalikud kontrollkatsed)
12. Paralleelkatsete arv ühe kemikaalkontsentratsiooni kohta	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)	Vähemalt 4 (välja arvatud ruutjuurjaotustega kontrollkatsete puhul)
13. Söötmissrežiim	Elus <i>Artemia</i> , külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.	Spetsiaalne kalamaimude kuivtoit, elus <i>Artemia</i> , külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.	Elus <i>Artemia</i> , külmutatud täiskasvanud soolase vee hall krevett, helvessööt jne. Soovitatakse sööta kaks korda päevas.
14. Õhustus	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Ei ole vajalik, välja arvatud juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla 70 % küllastuskontsentratsioonist

## ▼M6

15. Lahjendusvesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi	Puhas pinna-, kaevu- või taastatud vesi
16. Uuritava keemikaaliga kokkupuute kestus	60 päeva pärast koorumist	60 päeva pärast koorumist	60 päeva pärast koorumist
17. Bioloogilised näitajad	Koorumise edukus, ellujäämine, üldine morfoloogia, vitellogeniinsugunäärmete histoloogia, geneetiline sugu sooline jaotumine	Koorumise edukus, ellujäämine üldine morfoloogia, vitellogeniin sugunäärmete histoloogia, sooline jaotumine Koorumise edukus, ellujäämine	üldine morfoloogia, vitellogeniin sugunäärmete histoloogia, sooline jaotumine
18. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid kontrollrühmade koondatud paralleelkatsete puhul	Koorumise edukus > 80 %	Koorumise edukus > 80 %	Koorumise edukus > 80 %
	Ellujäämine pärast koorumist $\geq$ 70 %	Ellujäämine pärast koorumist $\geq$ 70 %	Ellujäämine pärast koorumist $\geq$ 70 %
	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 150 mg	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 75 mg	Kasv (kuivaks pühitud kala märgmass) > 120 mg
	Pikkus (standardpikkus) > 20 mm	Pikkus (standardpikkus > 14 mm)	Pikkus (standardpikkus) > 20 mm
	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %	Sooline jaotumine (isasloomade või emasloomade %) 30 % – 70 %

▼ **M6**

## 3. liide

**Kasutuskõblliku lahjendusvee keemilised omadused**

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOON
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼ **M6**

## 4. liide

**Tabel katsemeetodist c.14: juhend uuritavate kontsentratsioonide valimiseks**

Veerg (kontsentratsioonide arv 100 ja 10 või 10 ja 1 vahel) (*)						
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

(\*) Veerust võib valida kolmest (või enamast) järjestikusest kontsentratsioonist koosneva jada. Kontsentratsioonidevahelised keskpunktid veerus (x) leitakse veerus  $(2x + 1)$ . Loetletud väärtused võivad esindada kontsentratsioone, mida väljendatakse protsendina mahu või massi kohta (mg/l või µg/l). Väärtusi võib vajaduse korral korrutada või jagada 10 mis tahes astmega. 1. veergu võiks kasutada juhul, kui määramatus mürgisuse taseme kohta on suur.

▼ **M6**

## 5. liide

**Juhend noore vöötdaanio, tüseda tõmpnina, hariliku ogaliku ja jaapani riisikala pea/saba homogenaadi valmistamiseks**

Käesoleva osa eesmärk on kirjeldada vitellogeniini kontsentratsiooni määramise ettevalmistavaid etappe. Vitellogeniini kontsentratsiooni määramiseks võib kasutada ka muid meetodeid, mis annavad sellega võrreldavaid tulemusi. Vitellogeniini kontsentratsiooni võib pea/saba homogenaadi asemel määrata ka vereplasmast või maksast.

**Töö käik**

1. Kalad tuimastatakse ja surmatakse humaansel viisil kooskõlas katse kirjeldusega.
2. Kala pea ja saba lõigatakse ära kooskõlas katse kooskõlas. **Oluline märkus:** kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga) enne iga üksiku kala lõikamist, et hoida ära indutseerimata isaskalade saastamist emaskalade ja indutseeritud isaskalade vitellogeniiniga.
3. Iga kala pea ja saba summaarne mass mõõdetakse milligrammi täpsusega.
4. Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse nõusse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja külmutatakse – 80 °C juures kuni homogeenimiseni või homogeenitakse kohe jää peal kahe plastikvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeenimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) **Oluline märkus:** *Viaalid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on kokkuviidavad vastava kehatiikiga, mida kasutatakse sugunäärmete histoloogia uurimiseks.*
5. Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koemassiga võrreldes 4–10-kordne kogus jääkülma **homogeenimispuhverit** (\*) (märkige üles lahjendusaste). Töötage varrastega edasi, kuni segu on homogeenne. **Oluline märkus:** *Iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.*
6. Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni 4 °C ja 50 000 g juures 30 minuti jooksul.
7. Pipetiga võetakse 20–50 µl (märkige üles kogus) supernatanti ja pannakse vähemalt kahte viaali; pipeti ots viiakse pinnal olevat rasvakihi alla ja tõmmatakse supernatanti sisse nii, et rasva- ja põhjas oleva sademe fraktsioon kaasa ei tuleks.
8. Viaale säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni kasutamiseni.

(\*) *Homogeenimispuhver:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaasiinhibiitorite segu (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasiinhibiitorite segu (või samaväärset proteaasiinhibiitorite segu).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaasiinhibiitorite segu: Sigmalt (imetajate kudede jaoks), tootenumbr **P 8340**.

**Märkus.** Homogeenimispuhver peaks olema valmistatud kasutamise päeval. Asetage kasutamise ajaks jääle.



▼ **M6**

## 6. liide

**Juhend vitellogeniini mõõtmiseks võõtdaanio (*Danio rerio*) pea/saba homogenaadist (muudetud holbech et al., 2001). võib kasutada muid meetodeid, milles kasutatakse homoloogseid antikehi ja standardeid**

1. Mikrotiiterplaadid (sertifitseeritud Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Taani), mis on eelnevalt kaetud võõtdaanio lipovitelliini vastase IgG-ga kontsentratsioonis 5 µg/ml, sulatatakse ja pestakse kolm korda pesemispuhvriga (\*).
2. Võõtdaanio puhastatud vitellogeniini standardit <sup>(1)</sup> lahjendatakse seeriana kontsentratsioonideni 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ng 1 ml lahjenduspuhvri (\*\*)<sup>2</sup> kohta ja proove lahjendatakse vähemalt 200 korda (maatriksiefekti vältimiseks) lahjenduspuhvris ja kantakse plaatidele. Kontrollkatse tehakse kahe paralleelkatseana. Mikrotiiterplaadi igasse süvendisse kantakse 150 µl. Standardainega tehakse kaks paralleelmääramist ja proovidega kolm. Inkubeeritakse 4 °C juures üle öö loksutil.
3. Plaat pestakse 5 korda pesemispuhvriga (\*).
4. Dekstraaniahelale (nt AMDEX A/S, Taani) seotud mädarõika peroksidaas ja konjugeeritud antikehad lahjendatakse pesemispuhvrisk; kasutatav lahjendus sõltub partiist ja vanusest. Igasse süvendisse pannakse 150 µl ja plaate inkubeeritakse loksutil 1 tund toatemperatuuril.
5. Plaat pestakse viis korda pesemispuhvriga (\*) ja süvendite põhjad puhastatakse hoolikalt etanooliga.
6. Mikrotiiterplaadi igasse süvendisse kantakse 150 µl lahust TMB plus (\*\*\*)<sup>3</sup>. Plaat varjatakse valguse eest fooliumiga ja jälgitakse värvuse ilmutumist loksutil.
7. Kui standardkõver on täielikult ilmutatud, pidurdatakse ensüümi aktiivsus 150 µl 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lahuse lisamisega igasse süvendisse.
8. Neeldumine mõõdetakse lainepikkusel 450 nm (nt Molecular Devices Thermomax'i plaadilugejaga). Andmeid analüüsitakse asjakohase programmiga (nt Softmax).

(\*) Pesemispuhver:

PBS-põhilahust (****)	500,0	ml
Veise seerumialbumiini BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

*pH viiakse 7,3 peale ja täidetakse 5 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse temperatuuril 4 °C.*

(\*\*) Lahjenduspuhver:

PBS-põhilahus (****)	100,0	ml
Veise seerumialbumiini (BSA)	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

*pH viiakse 7,3 peale ja täidetakse 1 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse temperatuuril 4 °C*

(\*\*\*) TMB plus on kasutusvalmis substraat, mida toodab KemEnTec (Taani). See on tundlik valguse suhtes. Säilitatakse temperatuuril 4 °C.

<sup>(1)</sup> Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), mis on puhastatud, nagu on kirjeldatud töös 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.

**▼ M6**

(\*\*\*\*) PBS-põhilahust

NaCl	160,0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	26,6	g
KCl	4,0	g

*pH viiakse 6,8 peale ja täidetakse 2 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse toatemperatuuril.*

▼ **M6**

## 7. liide

**Juhend koelõikude ettevalmistamiseks soo ja sugunäärmete arengustaadiumi määramiseks**

Käesoleva osa eesmärk on kirjeldada koelõikude ettevalmistamist histoloogiliseks hindamiseks. Võib kasutada ka muid meetodeid, millega saadakse sarnased soolise jaotumise ja sugunäärmete arengustaadiumi näitajad.

Väheste eranditega on need meetodid samasugused jaapani riisikala ja vöötdaanio puhul.

**Valutu surmamine, lahkamine ja kudede fikseerimine***Eesmärgid:*

1. Tagada kalade humaanne surmamine.
2. Teha vajalikud kehamassi ja muud mõõtmised.
3. Hinnata sekundaarseid sootunnuseid.
4. Lõigata välja koed vitellogeniini määramiseks.
5. Fikseerida sugunäärmed.

*Töö käik:*

1. Kalad tuleks surmata vahetult enne lahkamist. Kui lahkajaid ei ole palju, siis ei tohiks korraga surmata paljusid kalu.
2. Väikse kahvaga võetakse kala katsekambrist ja viiakse transpordimahutis lahkamiskohta.
3. Kala pannakse valutu surmamise lahusesse. Kala võetakse lahusest välja, kui hingamisliigutused on lakanud ja kala ei reageeri välistele ärritajatele.
4. Kala kaalutakse märjalt.
5. Selleks, et valmistada koed ette vitellogeniini määramiseks, võib kala panna lahkamismikroskoobi korkkattega alusele.
  - a. Vöötdaanio puhul lõigatakse pea maha otse rinnauime tagant ja saba lõigatakse maha otse seljauime tagant.
  - b. Jaapani riisikala puhul avatakse kõht hoolika sisselõikega, mis ulatub mööda kõhu keskjoont rinnavöötmet kuni punktini, mis asub kohe päraku peapoolse otsa kõrval. Väikeste pintsettide ja väikeste kääridega eemaldatakse hoolikalt maks.
6. Proov vitellogeniini määramiseks pannakse Eppendorfi katsutisse ja külmutatakse viivitamata vedelas lämmastikus.
7. Rümp sugunäärmetega pannakse eelnevalt märgistatud plastikust koekassetti, mis paigutatakse Davidsoni või Bouini fikseerivasse lahusesse. Fikseerivat lahust peaks ruumala poolest olema vähemalt 10 korda rohkem kui on koe hinnanguline maht. Fikseeriva lahusega anumad loksutatakse ettevaatlikult viis sekundit, et kõrvaldada kassetist õhumulle.
8. a. Kõik koed jäetakse Davidsoni fikseerivasse lahusesse üheks ööks, järgmisel päeval kantakse need üle eraldi nõudesse, milles on neutraalse puhvriga 10 % formaliini lahus. Nõusid kassetidega loksutatakse ettevaatlikult 5 sekundit, et formaliin saaks vabalt tungida kassetidesse.

**▼ M6**

- b. Koed jäetakse Bouini fikseerivasse lahusesse 24 tunniks, seejärel viiakse need üle 70 % etanooli.

**Kudede töötlemine**

*Eesmärgid:*

1. Veetustada kude parafiini korraliku läbitungimise võimaldamiseks.
2. Kude immutatakse parafiiniga koe terviklikkuse säilitamiseks ja kindla pinna loomiseks, mis võimaldaks teha mikrotoomilõikeid.

*Töö käik:*

3. Märjastatud koekassetid võetakse formaliinist/etanoolist välja ja pannakse töötlemiskorvi(desse). Töötlemiskorv pannakse koeprotsessorisse.
4. Valitakse töötlemisrežiim.
5. Kui seade lõpetab töötlemistsükli, võib korvi(d) üle viia sisestamisseadmesse.

**Sisestamine**

*Eesmärk:*

Orienteerida proov tahkestatud parafiinis õigesti mikrotoomia jaoks.

*Töö käik:*

1. Korvi(id) kassetidega võetakse protsessorist välja ja sukeldatakse sisestamis-seadme termokonsooli parafiiniga täidetud eeskambrisse või viiakse kassetid üle eraldi parafiinikuumutisse.
2. Esimene sisestatav kassett võetakse välja termokonsooli eeskambrist või parafiinikuumutist. Kasseti kaas võetakse ära ja visatakse minema ning kassetil olevat märjastust võrreldakse looma kohta registreeritud andmetega, et lahendada võimalikud vastuolud enne sisestamist.
3. Valitakse sobiva suurusega sisestamisvorm.
4. Vormi hoitakse dosaatorikonsooli väljalaskeava all ja see täidetakse sula parafiiniga.
5. Proov võetakse kassetist ja pannakse vormi sulasse parafiini. Nii tehakse iga parafiinivormi puhul 4–8 prooviga. Iga üksiku kala asend märgitakse nii, et kala nr 1 on 180 kraadi all kala nr 2-4/8 suhtes.
6. Lisatakse parafiini proovi katmiseks.
7. Vorm kassetialusega pannakse krüokonsooli jahutusplaadile.
8. Pärast parafiini tahkestumist võetakse plokk (st tahkestunud parafiin, mis sisaldab kudesid ja kassetipõhjasid) vormist välja.

**Mikrotoomia**

*Eesmärk:*

lõigata ja seada histoloogilised koelõiked valmis värvimiseks.

*Töö käik:*

1. Mikrotoomia algetapil proov positsioneeritakse järgmiselt:
  - a. Parafiiniplokk pannakse mikrotoomi kelgule.
  - b. Kelku liigutatakse edasi mikrotoomi ratta abil ja parafiiniploki pinnalt lõigatakse pakse kihte, kuni nuga jõuab sisestatud kudedeni.

**▼ M6**

- c. Mikrotoomi löikepaksuseks seatakse 3–5 mikronit. Kelku lükatakse edasi ja plokist tehakse mitu lõiget, et kõrvaldada kõik artefaktid, mis võivad olla tekkinud koelõigu pinnal jämeda kärpimisega.
  - d. Ploki võib kelgult maha võtta ja panna jääle esiküljega allapoole koe niisutamiseks.
2. Mikrotoomia järgmine etapp on lõplik lõigete tegemine ja koeliistakute pane-mine objektiklaasile. See toimub järgmiselt:
- a. Kui plokk on pandud jääle, võetakse see sealt ära ja pannakse tagasi mikrotoomi kelgule.
  - b. Mikrotoomi lõigete paksuseks seatakse 3–5 mikronit, kelku liigutatakse edasi mikrotoomi ratta keeramisega. Plokist tehakse lõikeid, kuni saadakse riba, milles on vähemalt üks korralik sugunäärmeid hõlmav lõige. (Lõika-mise puhul võib olla vajalik võtta plokk kelgult, panna koe niisutamiseks jääle ja panna siis tagasi kelgule.)
  - c. Lõiked pannakse vesivanni veepinnale lapiti ujuma. Püütakse leida vähe-malt üks lõige, millel ei oleks kortse ja mille all ei oleks kinnijäänud õhumulle.
  - d. Mikroskoobi objektiklaas pannakse vette parima lõike alla ja tõstetakse see klaasi abil veest välja. See protsess on paigaldamine objektiklaasile.
  - e. Ühe kala komplekti jaoks valmistatakse kolm lõiget. Teine ja kolmas lõige tehakse pärast esimest lõiget 50 mikroniliste vahemaade järel. Kui kala ei ole sisestatud nii, et sugunäärmed oleksid ühes ja samas lõiketa-sapinnas, tuleb teha rohkem lõikeid; iga kala kohta tuleb saada vähemalt kuus sugunäärmeid hõlmavat lõiget.
  - f. Markeriga märgitakse objektiklaasile ploki number, millest saadi klaasil olev lõige.
  - g. Objektiklaas pannakse värvimisraamile.
  - h. Plokk võetakse kelgult ja pannakse hoiukohta esiküljega allapoole.

**Värvimine, kaanetamine ja preparaadi märgistamine***Eesmärgid:*

- Värvida lõiked histopatoloogiliseks uuringuks.
- Püsivalt sulgeda objektiklaasile paigutatud ja värvitud kude.
- Püsivalt märgistada värvitud lõiked nii, et oleks tagatud täielik jälgitavus.

*Töö käik:*

1. Värvimine
  - a. Objektiklaase kuivatatakse õhu käes enne värvimist üks öö.
  - b. Lõiked värvitakse hematoksüliini ja eosiiniga.
2. Kaanetamine
  - a. Kaaned võib peale panna käsitsi või automaadiga.
  - b. Objektiklaas kastetakse ksüleeni või TissueClear'i sisse ja liigne vedelik eemaldatakse klaasi ettevaatliku koputamise-ga.

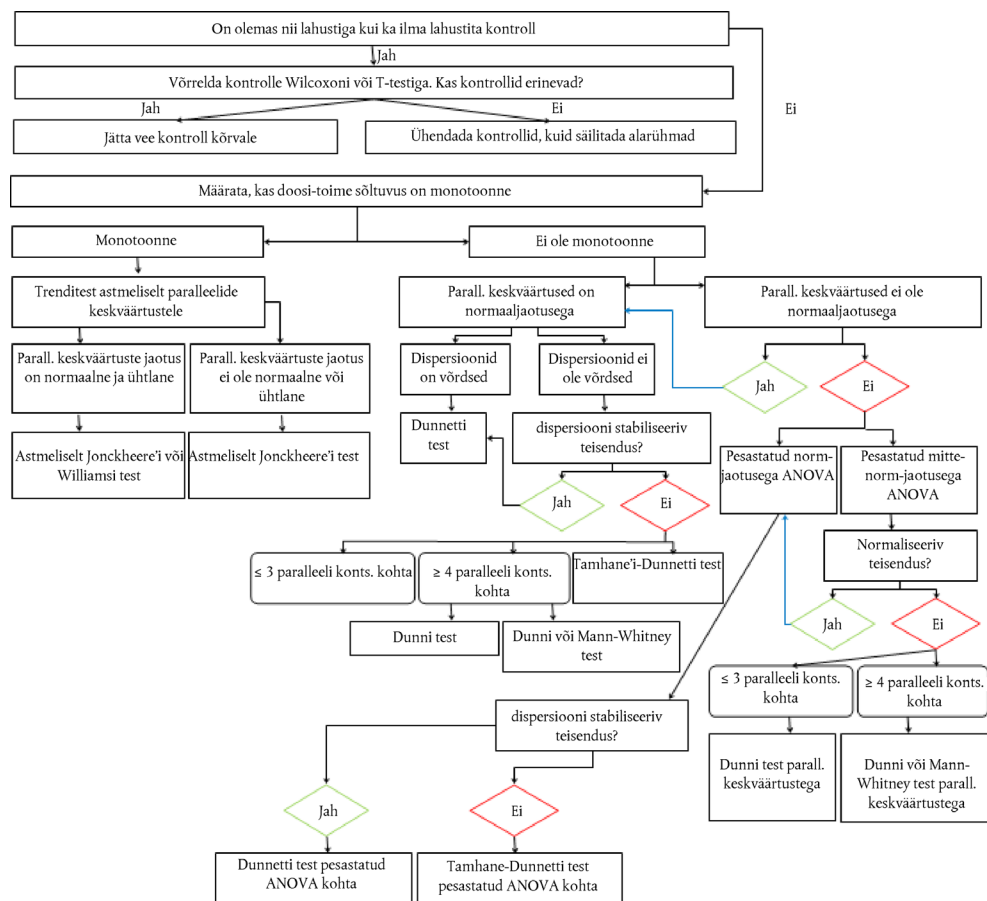
▼ **M6**

- c. Objektiklaasi selle serva lähedale, mis on mati ääre vastasküljel, või kaanele kantakse ligikaudu 0,1 ml kinnituskeskkonda.
- d. Kaant objektiklaasi suhtes väikse nurga all hoides pannakse kaas objektiklaasi peale.

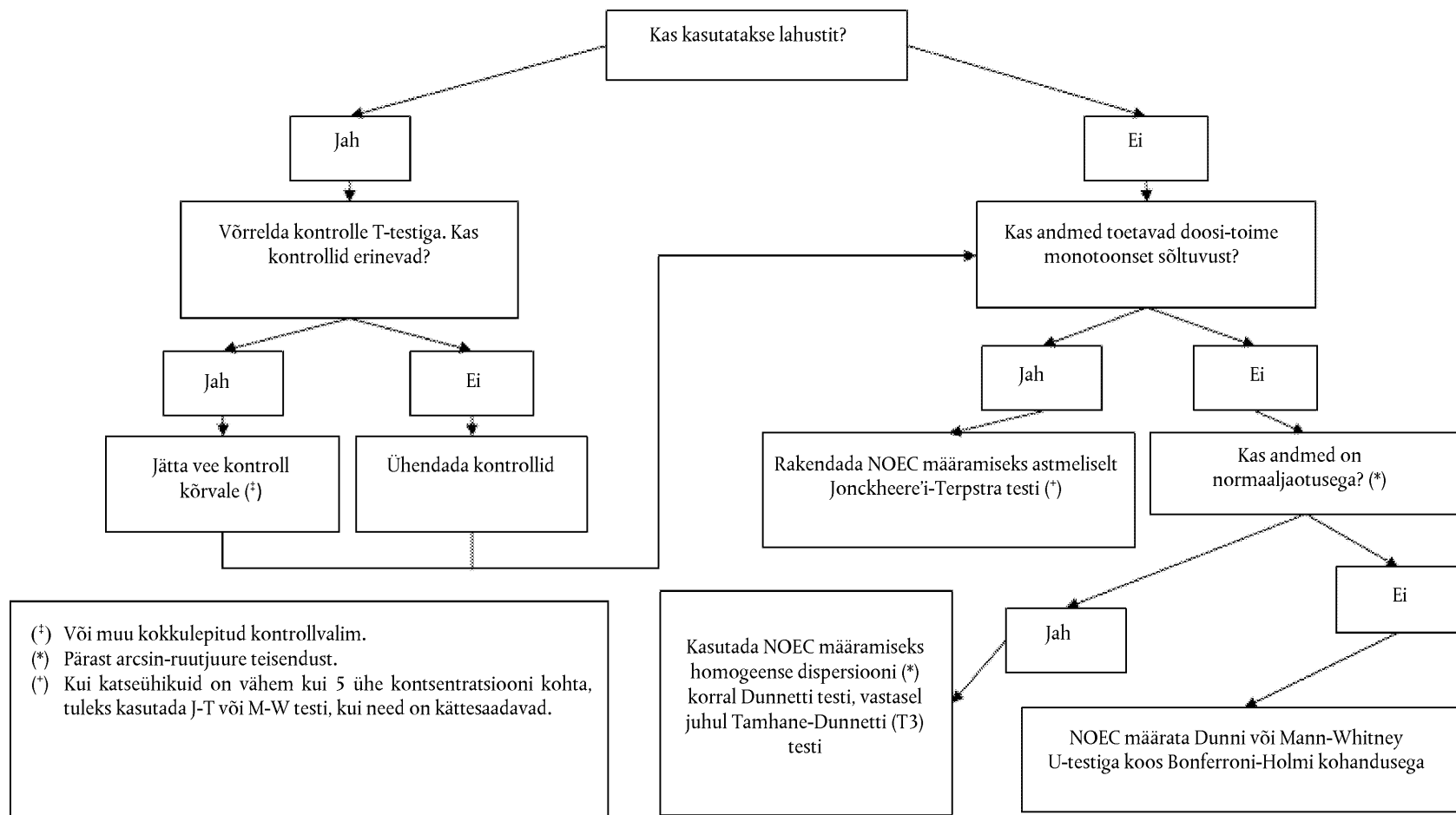
3. Märgistamine

- a. Igal objektiklaasil esitatakse järgmine teave:
  - i. Labori nimi
  - ii. Liik
  - iii. Proovi nr / preparaadi nr
  - iv. Kemikaal / kontsentratsioonirühm
  - v. Kuupäev

Vitellogeniini määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustamiskeem



Soolise jaotumise määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustuskeem





▼ **M6**

## 9. liide

**Geneetilise soo määramiseks vajalike koeproovide võtmise ja PCR-meetodiga geneetilise soo määramise juhend****Jaapani riisikala koeproovide võtmine, ettevalmistamine ja säilitamine enne geneetilise soo määramist PCR-meetodiga (koostanud Bayer CropScience AG veeorganismide labor)**

1. Iga kala pära- või seljauim lõigatakse väikeste kääridega ära ja pannakse katseklaasi, milles on 100 µl ekstraheerimispuhvrit 1 (puhvri valmistamise üksikasjad on esitatud allpool). Kääre puhastatakse pärast iga kala lõikamist destilleeritud veega täidetud keeduklaasis ja kuivatatakse pabersalvrätiga.
2. Uimekoed homogeneenitakse nüüd mikrotorus teflonvarda abil rakkude lüüsi saavutamiseks. Iga toru puhul kasutatakse uut varrast, et vältida saastamist. Vardad pannakse ööseks 0,5 M NaOH sisse, loputatakse viis minutit destilleeritud vees ja hoitakse etanoolis või steriilsena pärast autoklaavimist kuni kasutamiseni.
3. Uimekudet on võimalik hoida ilma ekstraheerimispuhvrit 1 kuival jääl ja seejärel külmkapis – 80 °C juures, et vältida DNA lagunemist. Kuid ekstraheerimine läheb paremini, kui te ekstraheerite DNA kohe samal ajal (käsitsemine vt eespool; proovid tuleks sulatada jääl pärast säilitamist – 80 °C juures, enne kui puhver viiakse torudesse).
4. Pärast homogeneenimist viiakse kõik torud vesivanni ja keedetakse 15 minutit 100 °C juures.
5. Seejärel lisatakse igasse torusse pipetiga 100 µl ekstraktsioonipuhvrit 2 (puhvri valmistamise üksikasjad vt allpool). Proove hoitakse toatemperatuuril 15 minutit ja selle aja jooksul neid aeg-ajalt loksutatakse käsitsi.
6. Seejärel pannakse kõik torud jälle vesivanni keedetakse veel 15 minutit 100 °C juures.
7. Kuni edasise analüüsini torud külmutatakse – 20 °C juures.

**Puhvrite valmistamine**

PCR-puhver 1:

500 mg N-lauroülsarkosiini (nt Merck KGaA, Darmstadt, Saksamaa)

2 ml 5 M NaCl lahust

lisada dest. vett 100 ml-ni

→ autoklaavida

PCR-puhver 2:

20 g Chelex'it (nt Biorad, München, Saksamaa)

lasta paisuda 100 ml-s dest. vees

→ autoklaavida

**Jaapani riisikala geneetilise soo määramine PCR-meetodiga (koostanud Bayer CropScience AG veeorganismide labor ja Würzburgi ülikooli biokeskus)**

Ettevalmistatud ja külmutatud torud (vt eelmine jagu) sulatatakse jää peal. Pärast seda need tsentrifuugitakse Eppendorfi tsentrifuugis (30 s maksimaalse kiirusega, toatemperatuuril). PCR-analüüsi jaoks kasutatakse sademest eraldatud selget supernatanti. Tuleb kindlalt vältida sademes oleva Chelex'i vähimategi jälgede ülekandmist PCR-reaktsiooni, kuna see segab Taq-polümeraasi aktiivsust. Supernatanti kasutatakse kas kohe või seda võib säilitada külmutatult (– 20 °C juures) ja uuesti üles sulatada (ka mitu korda), ilma et see mõjutaks DNA hilisemat analüüsi.

▼ **M6**

## 1. „Reaktsioonisegu” ettevalmistamine (25 µl ühe proovi kohta):

	Maht	Lõppkontsentratsioon
Maatriks-DNA	0,5–2 µl	
10x PCR-puhvrit MgCl <sub>2</sub> -ga	2,5 µl	1 x
Nukleotiide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, igaühete)	4 µl (5 mM)	200 µM
Päripidist praimerit (10 µM) (vt allpool 3–5)	0,5 µl	200 nM
Äraspidist praimerit (10 µM) (vt allpool 3–5)	0,5 µl	200 nM
Dimetüülsulfoksiidi (DMSO)	1,25 µl	5 %
Vett (PCR jaoks sobiva puhtusega)	kuni 25 µl-ni	
Taq E-polümeraasi	0,3 µl	1,5 U

10x PCR-puhver MgCl<sub>2</sub>-ga: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 25 °C juures), 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tween 20

Iga PCR-reaktsiooni jaoks (vt allpool 3–5) on vaja spetsiaalsed praimerid, mis on uus „reaktsioonisegu” ja matriits-DNA piisava vajaliku koguse kombinatsioon. Vastavad kogused kantakse üle uutesse torudesse pipettidega. Pärast seda kõik katseklaasid suletakse, segatakse (umbes 10 sekundit) ja tsentrifugeeritakse (10 sekundit, toatemperatuuril). Nüüd võib alustada vastavaid PCR-programme. Lisaks kasutatakse igas PCR-programmis veel üht positiivset kontrolli (näidis-DNA-proov, millel on teadaolev aktiivsus ja selged tulemused), ja üht negatiivset kontrolli (1 µl dest. H<sub>2</sub>O).

## 2. Agarosgeeli (1 %) valmistamine – PCR-programmi toimumise ajal:

- Lahustage 3 g agarossi 300 ml-s 1 × TAE-puhvris (1 % agarosgeel)
- Seda lahust tuleks keeta mikrolaineahjus (ligikaudu 2–3 minutit)
- Viige kuum lahus üle spetsiaalsesse valamiskarpi, mis asub jää peal
- Umbes 20 minuti pärast on agarosgeel valmis kasutamiseks
- Säilitage agarosgeeli 1 × TAE-puhvris kuni PCR-programmide lõpuni

## 3. Aktiin-PCR-programm:

Selle PCR-reaktsiooni eesmärk on tõendada, et proovis olev DNA ei ole kahjustatud.

- Spetsiaalne praimer:

„Mact1 (upper/forward)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact 2 (lower/reverse)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (35 korda):

Denatureerimine → 45 s 95 °C juures

Karastamine → 45 s 56 °C juures

Pikendamine → 1 minut 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

**▼ M6****4. X- ja Y-geeni PCR-programm:**

Selles PCR-programmis kasutatakse terve DNA proove selleks, et kontrollida X- ja Y-geene. Isaskala DNA peaks ilmuma kahe vöödina ja emaskala DNA üheainsa vöödina (pärast värvimist ja geel-elektroforeesi). Selle programmi tegemisel kasutatakse ühte isaskala (XY-näidis) ja üht emaskala (XX-näidis) positiivset kontrolli.

— Spetsiaalne praimer:

„PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (40 korda):

Denatureerimine → 45 s 95 °C juures

Karastamine → 45 s 55 °C juures

Pikendamine → 1 min 30 s 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

**5. Y-geeni PCR-programm „kontroll” X- ja Y-geeni PCR-programmi puhul:**

Selle PCR-programmiga kontrollitakse X- ja Y-geeni PCR-programmi tulemusi. Isaskala proovidel peaks ilmuma üks vöö ja emaskala proovidel mitte ühtegi vööti (pärast värvimist ja geel-elektroforeesi).

— Spetsiaalne praimer:

„DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programm:

5 minutit temperatuuril 95 °C

Tsükkel (40 korda):

Denatureerimine → 45 s 95 °C juures

Anniilimine → 45 s 56 °C juures

Elongatsioon → 1 minut 68 °C juures

15 minutit temperatuuril 68 °C

**6. PCR-proovide värvimine:**

Värvimislahus:

50 % glütserool

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % broomfenoolsinist

0,25 % ksüleentsüanooli

Pipetiga kantakse 1 µl värvimislahust igasse torusse

**7. Geel-elektroforeesi alustamine:**

— Ettevalmistatud 1 % agarosgeel kantakse üle geel-elektroforeesikambrisse, mis on täidetud 1 × TAE-puhvriga

— 10–15 µl igast värvitud PCR-proovist viiakse pipetiga agarosgeeli pilusse

— Eraldi pilusse kantakse ka 5–15 µl 1kb-„redelit” (Invitrogen)

— Elektroforeesi alustatakse 200 V juures

— Elektroforees peatatakse 30-45 minuti pärast

**▼ M6**

8. *Vöötide määramine:*

- Agarosgeel puhastatakse destilleeritud vees
- Seejärel kantakse agarosgeel etiidiumbromiidi sisse 15–30 minutiks
- Seejärel pildistatakse agarosgeeli UV-valguse all
- Lõpuks analüüsitakse proove ja võrreldakse neid positiivse kontrolli vöödi (või vöötidega) ja redeliga

▼ **M6**

## 10. liide

**Juhend koeproovide võtmiseks, et määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR-) meetodil ogaliku geneetilise sugu****Koeproovide võtmine ja DNA eraldamine**

DNA saab eraldada mitmesuguste müügil olevate reaktiivide abil kas käsitsi või automaatse DNA-eraldussüsteemiga. Allpool on esitatud Cefas Weymouthi laboris kasutatav eeskiri; sobival juhul on lisatud ka alternatiivseid võimalusi.

1. Väikeste kääridega lõigatakse igast kalast väike tükk kude (10–20 mg) seljakülgmisest osast (pärast pea ja saba eemaldamist vitellogeniini analüüsiks). Kude pannakse vialile ja paigutatakse kas vedelasse lämmastikku säilitamiseks temperatuuril – 80 °C või täidetakse vial 70 % etanooliga (transpordiks ja säilitamiseks temperatuuril 4 °C). Käärid puhastatakse pärast iga kala lõikamist 70 % etanooliga, seejärel destilleeritud veega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.
2. Etanool (kui see lisati) eemaldatakse aspireerimisega ja kudesid lagundatakse hommikuni proteinaas K-ga 400 µl-s ATL-puhvris (Qiagen). Lagundatud koe alikvoot (200 µl) kantakse üle 96 süvendiga S-plokile (Qiagen) ja DNA eraldatakse 96 süvendiga vormist, kasutades Qiagen'i universaalbiorobotit ja QIamp'i teadlase bioroboti komplekti. DNA-d elueeritakse 50 µl veega, milles ei tohi olla DNAase ega RNAase. Kui DNA eraldamiseks kasutatakse kõvu kudesid (nt lüüsamast või rinnauime), võib olla vajalik proovi homogeenimine lüüsi puhvris, kasutades FastPrep® koelagundajat või muud samaväärset kudede purustamise süsteemi.

## Teised võimalused

- a) Kude lagundatakse öö läbi proteinaas K-ga 400 µl-s lüüsi puhvris G2 (Qiagen) ja DNA eraldatakse 200 µl-st lüüsitud lahusest, kasutades kas EZ-1 DNA easy tissue komplekti ja biorobotit EZ-1 või DNA *easy tissue* minikomplekti. DNA elueeritakse 50 µl veega.
  - b) Kudesid töödeldakse reaktiiviga DNAzol. Lühidalt öeldes lüüsitakse koeproove 1 ml DNAzol'iga 10 minutit 1,5 ml mikrotsentrifugitopsis ja tsentrifugitakse siis kiirusega 13 000 p/min 5 minutit, et eemaldada kõik tahked osakesed. Lüüsitud proov viiakse seejärel üle uude 1,5 ml mikrotsentrifugitopsi, milles on 500 µl 100 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooli ja seejärel tsentrifugitakse kiirusega 13 000 p/min 10 minutit, et sadestada DNA. Etanool eemaldatakse ja asendatakse 400 µl 70 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooliga, tsentrifugitakse kiirusega 13 000 p/min 5 minutit ja DNAd sisaldav sade lahustatakse 50 µl vees, milles ei tohi olla DNAase ega RNAase. Jällegi, kui kasutatakse kõvu kudesid (nt rinnauime), võib olla vajalik proovi homogeenimine lüüsi puhvris, kasutades FastPrep® koelagundajat või muud samaväärset kudede purustamise süsteemi.
3. DNA säilitatakse – 20 °C juures, kuni seda läheb vaja.

Oluline märkus: töö ajal tuleb kanda kindaid.

**Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) analüüs**

Amplifitseerimine viidi läbi 2,5 µl eraldatud DNA-ga reaktsioonisegu 50 µl mahu juures, kasutades Idh-lookuse primereid (nagu on kirjeldatud Peichel *et al.*, 2004. *Current Biology* 1:1416-1424):

Päripidine primer	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Äraspidine primer	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼ **M6**

Sobivate PCR-reaktiivide pakkujaid on palju. Allpool kirjeldatud meetodid kasutatakse praegusel ajal Cefas Weymouthi laboris.

1. „Reaktsioonisegu” ettevalmistamine (50 µl ühe proovi kohta):

Põhisegu valmistatakse järgmiselt. Selle saab ette valmistada ja säilitada külmutatult – 20 °C juures, kuni seda vaja läheb. Valmistage piisav kogus põhisegu negatiivse kontrolli jaoks (molekulaarbioloogias vajaliku kvaliteediga vesi).

	Ruumala (põhilahuse konts) /proov	Lõppkontsentratsioon
5xGoTaq® reaktsioonipuhver	10 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM igaühete)	250 µM igaühete
Päripidine praimer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Äraspidine praimer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Molekulaarbioloogias vajaliku puhtusega vesi	30,75 µl	
GoTaq polümeraas	0,25 µl	1,25 Ü

- Viige 47,5 µl märgistatud õhukeseseinalisse 0,5 ml PCR-viaali.
- Lisage asjakohase märgisega viaali 2,5 µl puhastatud DNAd. Korrake sama kõikide proovide ja negatiivse kontrolli puhul.
- Lisage selle peale 2 tilka mineraalõli. Teise võimalusena võite kasutada kuumutatud kaanega termotsüklerit.
- Sulgege kaaned.
- Proovid denatureeriti Peltier PTC-225 termotsükleris 5 minutit temperatuuril 94 ± 2 °C, millele järgnes 39 tsükli temperatuuril 94 ± 2 °C 1 minut, 55 ± 2 °C 1 minut, 72 ± 2 °C 1 minut ning lõplik pikendamine temperatuuril 72 ± 2 °C 10 minutit.

2. *Agarosegeeli (2 %) ettevalmistamine:*

Tavaliselt lahutatakse PCR-reaktsiooni saadusi 20 % agarosegeeliga, mis sisaldab etiidiumbromiidi.

Samuti võib kasutada kapillaaridel põhinevat elektroforeesisüsteemi.

- Kaaluge 2 g agarose 100 ml-sse 1 × TAE-puhvrissa
- Kuumutage mikrolaineahjus (ligikaudu 2–3 min), et agaros lahustuks.
- Lisage 2 tilka etiidiumbromiidi lõpliku kontsentratsiooni 0,5 µg/ml saamiseks
- Kandke kuum lahus üle geelivalamiseseadmesse.
- Laske geelil tarduda

3. *Geel-elektroforees:*

- Viige agarosegeel üle elektroforeesiseadmesse ja katke see 1 × TAE-puhvriga
- Laadige 20 µl igast proovist eraldi süvendisse, lisage molekulmassimarker (100 aluspaari DNA-redel, Promega) kasutamata süvendisse.
- Tehke elektroforeesi 120 V juures 30–45 minutit.

▼ **M6**

4. *Amplifikatsioonisaaduste nähtavakstegemine*

Kui kasutatakse etiidumbromiidilisandiga agarosgeeli, nagu on kirjeldatud eespool, on DNA-saadused nähtavad UV-lambi all. Teise võimalusena võib agarosgeeli värvida: geel kaetakse etiidumbromiidi lahja lahusega (0,5 µg/ml vees) 30 minutiks enne tulemuste vaatlemist.

▼ **M6**

## 11. liide

**Juhend ogaliku marja kunstliku viljastamise kohta**

Käesolevas liites kirjeldatakse meetodit ogaliku viljastatud marjaterade saamiseks, et kasutada neid kalade sugulise arengu katses.

**Töö käik***Seemnevedeliku kogumine isaskaladelt*

1. Soovitud populatsioonist valitud hästi värvunud isaskala surmatakse valutult.
2. Niisk lõigatakse kala kummaltki küljelt välja. *Niisk on üldiselt tugevasti pigmenteerunud pulgakujuline elund, mis on kergesti nähtav keha küljjoonel.* Kasutatakse üht järgmistest meetoditest:
3. Väikeste kääridega tehakse üks 1–1,5 cm pikkune sisselõige alates kloaagist umbes 45° nurga all.
4. Skalpelliga tehakse väike sisselõige kala küljesse veidi tagapool kõhuuime ja kõhu pool küljeplaate.
5. Niisk eemaldatakse peente näpitsatega ja pannakse Petri tassile.
6. Kumbki niisk kaetakse 100 µl värskelt valmistatud **Hanki lõpliku lahusega** <sup>(1)</sup>.
7. Niisad lõigatakse žiletitera või skalpelliga väikesteks kuubikuteks. See vabastab seemnevedeliku, mis muudab Hanki lahuse piimjaks.
8. Seemnevedelikku sisaldav lahus viiakse üle viaali, püüdes pipeteerimisel mitte kaasa võtta koetükke.
9. Viaali lisatakse 800 µl Hanki lõplikku lahust ja segatakse hoolikalt.
10. Vajaduse korral võib isaskala säilitada; selleks fikseeritakse ta 100 % etanooli või muu soovitud fikseeriva lahusega. See on eriti oluline juhul, kui uuringuga hinnatakse järglaste vanemlikku päritolu.

**Oluline märkus:** *kuiigi enamiku vajaminevatest põhilahustest võib varem valmis teha, tuleb põhilahus 5 ja seejärel lõplik lahus valmistada värskelt kasutamise päeval.*

**Põhilahus 1**

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilleeritud vesi (DV)	100 ml

**Põhilahus 2**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (veevaba)	0,358 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60 g
DV	100 ml

**Põhilahus 3**

CaCl <sub>2</sub>	0,72 g
DV	50 ml

<sup>(1)</sup> Hanki puhverdatud soolalahus (HBSS):

HBSS on vajalik seemnevedeliku säilitamiseks, kui seda valmistatakse ette viljastamiseks.



**▼ M6****Põhilahus 4**MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,23 g

DV 50 ml

**Põhilahus 5 (värskelt valmistatud)**NaHCO<sub>3</sub> 0,35 g

DV 10 ml

*Märkus:* Kui teil on mõni eespool nimetatud sooladest juba olemas, kuid erineva veesisaldusega (nt 2H<sub>2</sub>O veevaba asemel), võite seda kasutada, olles koguse molekulmassi alusel ümber arvutanud.

Hanki lõpliku lahuse valmistamiseks võtke põhilahuseid järgmises järjekorras:

põhilahus 1 1,0 ml

põhilahus 2 0,1 ml

põhilahus 3 0,1 ml

DV 8,6 ml

põhilahus 4 0,1 ml

põhilahus 5 0,1 ml

Enne kasutamist segada korralikult.

**Viljastamine**

1. Soovitud populatsiooni hulgas tehakse kindlaks suured marja heitmiseks valmis emaskalad; emaskala on selleks valmis üksnes siis, kui marjateri võib näha kloaagist välja tungimas. Valmis emaskalad on iseloomulikus „pea ülespoole” asendis.
2. Libistage sõrme või pöidlaga ettevaatlikult mööda kala külge saba suunas, et stimuleerida marjakoti heitmist värsele Petri tassile. Korrake sama ka teise küljega ja pange kala oma nõusse tagasi.
3. Peene pintsliga võib marjaterad lükata laiali, nii et need moodustaksid ühekordse kihi. Oluline on püüda luua marjateradele võimalikult hea kokkupuude seemnevedelikuga; marjaterade pinna maksimeerimine tuleb seepärast kasuks. Oluline märkus: marjateri tuleb hoida niiskena nende ümber oleva niiske lapi abil (on oluline, et need ei puutuks otse kokku veega, kuna see põhjustaks koorioni kõvastumise, mis teeks viljastumise võimatuks). Emaskala koetavate marjaterade arv võib suuresti erineda, aga keskmiselt peaks ühelt kudemisvalmis emaskalalt saama 150 marjatera.
4. 25 µl seemnevedelikku Hanki segus määratakse pintsliga ühtlaselt laiali üle kõigi marjaterade. Marjaterad muutuvad kiiresti (ühe minutiga) kõvaks ja muudavad värvi, kui viljastumine on alanud. Kui marjateri on hinnanguliselt rohkem kui 150, tuleb seda etappi korrata. Kui munad ei kõvene ühe minuti jooksul, lisatakse veidi rohkem seemnevedelikku. Oluline märkus: seemnevedeliku koguse suurendamine ei paranda tingimata viljastumismäära.
5. Marjaterad ja seemnevedeliku lahus tuleks jätta vastastikku mõjuma vähemalt 15 minutiks ja viljastatud mari tuleks paigutada kemikaaliga kokkupuute akvaariumidesse 1,5 tunni jooksul pärast viljastamist.
6. Sama tegevust korratakse teiste emaskaladega, kuni on kogutud vajalik arv marjateri.
7. Mõned marjaterad viimasest partiist jäetakse alles ja fikseeritakse 10 % äädikhappelahuses.

**▼ M6****Marjaterade loendamine ja jaotamine katseakvaariumidesse**

1. Marjaterad tuleks kontsentratsioonitasemete vahel jaotada ühtlaselt, et vältida geneetikast tingitud kõrvalekallet. Viljastatud marjaterade iga partii tuleb jaotada võrdse suurusega rühmadesse (mille arv vastab kontsentratsioonitasemete arvule), kasutades nüri instrumenti (nagu laia otsaga entomoloogipintsetid või bakterikülvide tegemisel kasutatav silmus). Kui kavatsete iga kontsentratsiooniga teha neli paralleelkatset à 20 marjatera, tuleks teil iga kontsentratsiooni akvaariumide vahel jaotada 80 marjatera. Oluline märkus: soovitatav on lisada täiendavalt 20 % marjateri (st 96 marjatera kontsentratsioonitaseme kohta), kui te ei ole veendunud, et saavutate viljastumismäära 100 %.
2. Ogaliku marjaterad on väga tundlikud seenenakkuse suhtes väljaspool pesa, mida kaitseb isakala. Seepärast on kõigi marjaterade töötlemine metüleensinisega esimese viie päeva jooksul äärmiselt oluline. Metüleensinise põhilahus valmistatakse kontsentratsiooniga 1 mg/ml ning seda lisatakse kemikaaliga kokkupuute akvaariumidesse, kuni saavutatakse lõppkontsentratsioon 2,125 mg/l. Oluline märkus: pärast koorumist ei tohiks ogalikud metüleensinisega enam kokku puutuda, nii et süsteem peaks 6. päevaks olema metüleensinisest vaba.
3. Marjateri kontrollitakse iga päev ja kõik surnud või viljastamata marjatera leidmise juhtumid registreeritakse. Oluline märkus: marjaterad ei tohiks kuni koorumiseni isegi väga lühikest aega olla väljaspool vett.

▼ **M6****C.42. BIOLAGUNDATAVUS MEREVEES**

## ÜLDINE SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 306 (1992). Esialgsete katsemeetodite väljatöötamise ajal ei olnud teada, millises ulatuses võib kiire biolagundatavuse söelkatse tulemusi, mis on saadud magevee, reoveepuhastite väljavoolu ja aktiivmuda inokulumi abil, laiendada merekeskkonnale. Selle kohta on teatatud erinevaid tulemusi (vt näiteks (1)).
2. Paljud mitmesuguseid kemikaale sisaldavad tööstuslikud reoveed jõuavad merre kas reovee otsese keskkonda juhtimisega või suudmealade ja jõgede kaudu, milles reovesi viibib vähe aega, võrreldes nendes esinevate kemikaalide täielikuks biolagunemiseks kuluva ajaga. Kuna saab üha selgemaks, et merekeskkonda on vaja kaitsta suureneva kemikaalireostuse eest ja on vaja hinnata kemikaalide võimalikku kontsentratsiooni merevees, on välja töötatud meetodid biolagunduvuse määramiseks merevees.
3. Siin kirjeldatud meetodites on kasutatud looduslikku merevett nii veefaasina kui ka mikroorganismide allikana. Selleks et lähendada seda meetodit kiire biolagunduvuse määramise meetoditele magevee jaoks, uuriti ultrafiltritud ja tseentrifuugitud merevee kasutamist; inokulumina kasutati meresetteid. Need uuringud ei andnud tulemusi. Seepärast on katsekeskkonnaks looduslik merevesi, mida on eelnevalt töödeldud suuremate osakeste eemaldamiseks.
4. Täieliku biolagunduvuse hindamiseks tuleb loksutatava kolvi meetodi puhul kasutada uuritava aine suhteliselt suurt kontsentratsiooni, kuna lahustunud orgaanilise süsiniku määramise meetod on vähetundlik. See omakorda nõuab merevee mineraalsete toitainete (N ja P) lisamist, kuna muidu piiraks nende kontsentratsioon lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamist. Ka suletud pudeli meetodi puhul tuleb lisatava uuritava aine kontsentratsiooni tõttu lisada toitaineid.
5. Seega ei uurita kõnealuste meetoditega kiiret biolagunduvust, kuna inokulumi lisaks merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata. Samuti ei modelleerita nende katsete abil merekeskkonda, kuna lisatakse toitaineid ja uuritava aine kontsentratsioon on palju suurem, kui see oleks merevees. Seetõttu esitatakse need meetodid uues alljaotises „Biolagunduvus merevees”.

## KOHALDAMINE

6. Need katsed, mida tehakse, kuna kõnealuse kemikaali kasutamise- ja kõrvaldamisviis osutavad kemikaali sattumisele merre, annavad tulemuseks esialgse pildi biolagundatavusest merevees. Kui tulemus on positiivne (üle 70 % lahustunud orgaanilisest süsinikust kõrvaldatud; hapnikukulu üle 60 % teoreetilisest hapnikutarbest), võib teha järelduse, et biolagunduvus merekeskkonnas on võimalik. Negatiivne tulemus siiski ei välista biolagunduvuse võimalikkust, kuid näitab, et on vaja täiendavaid uuringuid, näiteks uuritava aine võimalikult madala kontsentratsiooni juures.

▼ **M6**

7. Juhul kui on vaja täpsemalt teada biolagunduvuse kiirust või määra merevees kusagil konkreetsetes kohas, tuleks kasutada keerukamaid ja täiuslikumaid ning seetõttu ka kulukamaid meetodeid. Näiteks modelleerimiskatset võib teha ka uuritava aine kontsentratsiooniga, mis on lähemal oletatavale kontsentratsioonile keskkonnas. Kasutada võib ka toitainetega rikastamata ja eelnevalt töötlemata merevett, mis on võetud huvi pakkuvast kohast ja uurida primaarset biolagunduvust spetsiifilise keemilise analüüsiga. Täieliku biolagunduvuse uurimiseks tuleks kasutada C-märgistatud ainet, nii et oleks võimalik mõõta lahustuva orgaanilise <sup>14</sup>C kadumist ja <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> tekkimist keskkonna seisukohast realistlikel kontsentratsioonidel.

## MEETODITE VALIMINE

8. Kasutatava meetodi valimine sõltub paljudest teguritest; järgmine tabel peaks hõlbustama valiku tegemist. Kuigi aineid, mille lahustuvus vees on väiksem kui 5 mg C/l vastav kontsentratsioon, ei saa uurida loksutatava kolvi meetodiga, võib vähelahustuvaid aineid siiski uurida kinnise pudeli meetodiga.

Tabel

## Loksutatava kolvi ja kinnise pudeli katse eelised ja puudused

MEETOD	EELISED	PUUDUSED
<b>LOKSUTATAV KOLB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— lihtne aparatuur, välja arvatud C analüsaator</li> <li>— kestus 60 päeva ei ole probleem</li> <li>— nitrifikatsioon ei sega uuringut</li> <li>— võib kasutada lenduvate ainete puhul</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— on vaja C analüsaatorit</li> <li>— kasutatakse kontsentratsioone 5–40 mg lah. org. C /l, mis võib olla inhibeeriva toimega</li> <li>— lah. org. süsiniku määramine madalatel kontsentratsioonidel merevees on keeruline (kloriidi mõju)</li> <li>— lah. org. süsiniku kontsentratsioon on merevees mõnikord suur</li> </ul>
<b>KINNINE PUDEL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— lihtsad seadmed</li> <li>— lihtne määramine lõpus</li> <li>— kasutatakse madalat uuritava aine kontsentratsiooni (2 mg/l), seega on vähem inhibeerimise võimalusi</li> <li>— kerge on kasutada ka lenduvate ainete puhul</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— pudelite hermeetilisuse säilitamine võib olla keeruline</li> <li>— bakterite kasv nõu seintel võib põhjustada valesid tulemusi</li> <li>— kontrollkatsetes võib O<sub>2</sub> sidumine muutuda intensiivseks eriti pärast 28 päeva; sellest võib üle saada merevee vanandamisega</li> <li>— segada võib nitrifikatsiooniga seotud O<sub>2</sub> sidumine</li> </ul>

## LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

## SISSEJUHATUS

1. Kõnealune meetod on merevee jaoks kohandatud ja muudetud OECD sõelkatse, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis C.4B (2). See on lõpuni viimistletud Euroopa Komisjoni ja Taani veekvaliteedi instituudi korraldatud laboritevahelise võrdluskatsega (3).
2. Samuti kui sellele järgneva suletud pudeli meetodi mereveevariandi puhul, ei tohiks käesoleva meetodi tulemusest teha järeldust kiire biolagunduvuse kohta; meetodiga saadakse konkreetset teavet biolagunduvuse kohta merekeskkonnas.

▼ **M6****MEETODI PÕHIMÕTE**

- Kindlaksmääratud kogus uuritavat ainet lahustatakse katsekeskkonnas, et saada kontsentratsioon vahemikus 5–40 mg lahustunud orgaanilist süsinikku liitri kohta. Kui orgaanilise süsiniku määramise analüüsi tundlikkust suurendatakse, siis võib olla eelistatud uuritava kemikaali madalama kontsentratsiooni kasutamine, eriti kui tegemist on inhibeeriva ainega. Uuritava kemikaali lahust katsekeskkonnas inkubeeritakse loksutamise ja pimedas või hajutatud valguses aeroobsetes tingimustes kindlal temperatuuril (mida hoitakse täpsusega  $\pm 2$  °C), mis on tavaliselt vahemikus 15–20 °C. Kui katse eesmärk on modelleerida keskkonnaolukordi, võib katse teha väljaspool seda normaalset temperatuurivahemikku. Katse soovitatav suurim kestus on 60 päeva. Lagunemist jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmisega (täielik lagunemine) ja mõnel juhul spetsiifilise analüüsiga (primaarne lagunemine).

**ANDMED UURITAVA AINE KOHTA**

- Selleks, et otsustada, kas katsemeetodit saab kasutada konkreetse aine puhul, peavad aine mõned omadused olema teada. Aine orgaanilise süsiniku sisaldus peab olema kindlaks määratud, aine lenduvus peab olema selline, et katse jooksul ei tekiks suuri aine kadusid ja aine lahustuvus vees peab olema suurem kui 25–40 mg süsinikku liitris. Samuti ei tohiks uuritav aine oluliselt adsorbeeruda klaasi pinnale. Teave uuritava aine puhtusastme või peamiste lisandite suhteliste koguste kohta on vajalik tulemuste tõlgendamiseks, eriti kui tulemus on biolagunduvuse kriteeriumi piiri lähedal.
- Sobivate uuritavate kontsentratsioonide valimiseks võivad vajalikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele, mis on mõõdetud näiteks lühiajalise respiratsioonikiiruse katsega (4); sellised andmed võivad olla ülivajalikud biolagunduvuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks. Selline teave ei ole siiski alati piisav biolagunduvuse katse tulemuste tõlgendamiseks ning sobivam on punktis 18 kirjeldatud meetod.

**VÕRDLUSAINED**

- Merevee proovi mikroobse aktiivsuse kontrollimiseks tuleb kasutada sobivaid võrdlusaineid. Selleks otstarbeks sobivad näiteks naatriumbensoaat, naatriumatsetaat ja aniliin. Võrdlusaine peab lagunema sobivalt lühikese ajavahemiku jooksul; vastasel korral soovitatakse katset korrata mõne muu mereveeprooviga.
- Euroopa Ühenduse võrdluskatsetes, kus merevee proovid olid võetud eri kohtadest ja eri aastaegadel (3), olid naatriumbensoaadi puhul ootefaas ( $t_L$ ) ja 50 % lagunemiseks kuluv aeg ( $t_{50}$ ) ilma ootefaasita vastavalt 1–4 päeva ja 1–7 päeva. Aniliini puhul oli  $t_L$  vahemikus 0–10 päeva ja  $t_{50}$  1–10 päeva.

**ANALÜÜSIMEETODI KORRATAVUS JA TUNDLIKKUS**

- Meetodi korratavus määrati laboritevahelise võrdluskatsega (3). Madalaim uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul kõnealust meetodit võib kasutada koos lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) sisalduse määramisega, on suuresti määratud orgaanilise süsiniku määramispiiriga (ligikaudu 0,5 mg C/l) ja DOC sisaldusega avamerevees (tavaliselt 3–5 mg/l). DOC taustkontsentratsioon ei tohiks ületada ligikaudu 20 % DOC üldkontsentratsioonist

**▼ M6**

pärast uuritava materjali lisamist. Kui see ei ole teostatav, võib DOC taustkontsentratsiooni mõnikord vähendada merevee vanandamisega enne katse tegemist. Kui seda meetodit kasutatakse ainult koos konkreetse kemikaali määramisega (sel viisil mõõdetakse primaarset lagundamist), peab uurija kirjandusest saadud lisateabe abil näitama, kas võib oletada ka lõplikku lagunduvust. Lisateave võib hõlmata muude katsete tulemusi, millega tõendatakse kiiret või iseeneslikku biolagunduvust.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

9. Tavalised laboriseadmed ja:
  - a. loksuti, millesse saab paigutada 0,5–2 liitrise mahuga Erlenmeyeri kolbe, kas temperatuuri automaatse reguleerimisega või võimalusega teha katse ruumis, mille temperatuur on konstantselt vahemikus 15–20 ( $\pm 2$ ) °C;
  - b. kitsa kaelaga 0,5–2 liitrised Erlenmeyeri kolvid;
  - c. membraanfiltrimiseseade või tsentrifuug;
  - d. membraanfiltrid 0,2–0,45  $\mu\text{m}$ ;
  - e. süsinikuanalüsaator;
  - f. varustus spetsiifiliste analüüside jaoks (ei ole kohustuslik).

**Merevesi**

10. Merevee proov võetakse hoolikalt puhastatud nõusse ja transporditakse laborisse eelistatavalt ühe või kahe päeva jooksul pärast võtmist. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur tõusta oluliselt kõrgemale katses kasutatavast temperatuurist. Registreeritakse täpne proovivõtu koht ja kirjeldatakse merevee saasteainete ja toitainete sisaldust kõnealuses kohas. Eriti ranniku-lähedaste vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammoniumi ja fosfaadi kontsentratsioon.
11. Merevee proovi enda kohta esitatakse järgmine teave:
  - võtmise kuupäev;
  - proovivõtu sügavus;
  - proovi välimus – sogane vms;
  - temperatuur proovi võtmise ajal;
  - soolsus;
  - lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus;
  - ajavahemik proovivõtust kuni katseni.
12. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus merevees on kõrge (punkt 8), soovitatakse merevett umbes üks nädal vanandada enne kasutamist. Merevett vanandatakse hoidmisega aeroobsetes tingimustes katse temperatuuril ja pimeduses või hajunud valguses. Vajaduse korral tuleb aeroobsete tingimuste säilitamiseks kergelt aereerida. Vanandamise ajal väheneb kergesti

**▼ M6**

biolagundatava orgaanilise materjali sisaldus. Laboritevahelises võrdluskatses (3) ei leitud vanandatud ja värskelt võetud mereveeproovide biolagundamise võimes mingeid erinevusi. Enne kasutamist töödeldakse mereveet suuremate osakeste eemaldamiseks näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri või jämeda paberfiltri (mitte kasutada membraan- või klaasmikrokiud- (GF/C-)filtrit) või setitamise ja dekanteerimisega. Kasutatud menetlust tuleb kirjeldada. Kui kasutatakse eeltöötlemist, tuleb see teha pärast vanandamist.

**Mineraaltoitainete põhilahused**

13. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

- |    |  |         |
|----|--|---------|
| a) | kaaliumdivesinikortofosfaat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                      | 8,50 g  |
|    | dikaaliumvesinikortofosfaat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                      | 21,75 g |
|    | dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
|    | ammooniumkloriid, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,50 g  |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| b) | kaltsiumkloriid, $\text{CaCl}_2$   | 27,50 g |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| c) | magneesiumsulfaatheptahüdraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                   | 22,50 g |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| d) | raud(III)kloriidheksahüdraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$                    | 0,25 g  |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |

Sadenemist lahuses d saab ära hoida ühe tilga kontsentreeritud soolhappe või 0,4 g etüleendiamiintetraädikhappe (EDTA dinaatriumsool) lisamisega 1 liitri lahuse kohta. Kui põhilahuses tekib sade, asendatakse see värskelt valmistatud lahusega.

**Katsekeskkonna valmistamine**

14. Eeltöödeldud merevee ühe liitri kohta lisatakse 1 ml kumbagi eespool kirjeldatud põhilahust.

**Inokulum**

15. Merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata spetsiaalset inokulumit. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamiseks mereveeagari plaadil. See on eriti soovitatav proovide puhul, mis on võetud rannikuveest või saastatud merealalt. Heterotroofsete mikroobide aktiivsust kontrollitakse nii, et katse tehakse võrdlusainega.

▼ **M6****Kolbide ettevalmistamine**

16. Kõik klaasnõud peavad olema hoolikalt puhastatud (kuigi mitte tingimata steriilsed) näiteks soolhappe alkoholilahusega, loputatud ja kuivatatud, et vältida saastavaid jääke varasematest katsetest. Puhastada tuleb ka kolvid, mida kasutatakse esimest korda.
17. Uuritavat ainet hinnatakse samaaegselt kahes paralleelkatsekolvis ja lisaks tehakse samal ajal ühes kolvis katse võrdlusainega. Analüüsi tühiproovide määramiseks tehakse tühikatse kahe paralleelkatsega, millesse ei panda ei uuritavat ainet ega võrdlusainet. Uuritav aine lahustatakse katsekeskkonnas – ainet võib mugavalt lisada kontsentreeritud põhilahusena, et saada vajalik lähtekontsentratsioon, mis tavaliselt on 5–40 mg DOC/l. Võrdlusainega tehakse tavaliselt katse lähtekontsentratsioonil, mis vastab kontsentratsioonile 20 mg DOC/l. Kui kasutatakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali põhilahuseid, tuleb tagada, et merevee soolsus katsekeskkonnas oluliselt ei muutuks.
18. Kui võib eeldada või ei saa välistada toksilist mõju, siis võib olla soovitatav lisada katse kvasse ka inhibeerimiskatse kahe paralleeliga. Ühte ja samasse nõusse lisatakse uuritavat ainet ja võrdlusainet, kusjuures võrdlemise võimaldamiseks on võrdlusaine kontsentratsioon tavaliselt sama kui kontrollkatsetes (st 20 mg DOC/l).
19. Erlenmeyeri kolbidesse pannakse vajalikud kogused uuritavat lahust (sobiv lahusekogus on ligikaudu pool kolvi mahust) ning seejärel kaetakse iga kolb vabalt lebava kattega (näiteks alumiiniumfooliumiga), mis võimaldab gaasivahetust kolvis oleva ja ümbritseva õhu vahel. (Puu villvatist korgid ei sobi lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsi puhul.) Nõud pannakse loksutile ja neid loksutatakse kogu katse jooksul pidevalt mõõduka kiirusega (nt 100 pööret minutis). Temperatuur hoitakse vahemikus 15–20 (± 2) °C ning nõusid varjatakse valguse eest, et vältida vetikate kasvu. Tagatakse, et ruumi õhus ei oleks mürgiseid aineid.

**Füüsikalised-keemilised kontrollkatsed (soovi korral)**

20. Kui kahtlustatakse abiootilist lagunemist või kadu, nt hüdrolyüsi (mis tekitab raskusi üksnes konkreetse aine määramise puhul), lendumist või adsorptsiooni, on soovitatav teha füüsikalised-keemilised kontrollkatsed. Seda võib teha elavhõbe(II)kloriidi ( $\text{HgCl}_2$ )<sup>(1)</sup> (50–100 mg/l) lisamisega uuritava aine lahusesse, et peatada mikroobide tegevus. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine kontsentratsioon füüsikalises-keemilises kontrollkatses ikkagi väheneb, osutab see abiootiliste kõrvaldamismehhanismide mõjule. (Kui kasutatakse elavhõbekloriidi, tuleks tähelepanu pöörata lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsi segamise või katalüsaatori mürgitamise võimalusele.)

**Kolbide arv**

21. Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi kolbe:

kolvid 1 ja 2	sisaldavad uuritavat ainet (uuritavat suspensiooni);
kolvid 3 ja 4	sisaldavad üksnes merevett (tühikatse);
kolb 5	sisaldab võrdlusainet (määramise õigsuse kontroll);
kolb 6	sisaldab uuritavat kemikaali ja võrdlusainet (mürgisuse kontroll – soovi korral);
kolb 7	sisaldab uuritavat kemikaali ja steriliseerivat vahendit (abiootiline steriilne kontroll – soovi korral).

<sup>(1)</sup> Elavhõbe(II)kloriid ( $\text{HgCl}_2$ ) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalikke ohutuseeskirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta kanalisatsioonüsteemi.



**▼M6****Lahustunud orgaanilise süsiniku analüüs**

22. Katse ajal võetakse sobivate ajavahemike järel (1. liide) proovid lahustunud orgaanilise süsiniku analüüsiks. Alati võetakse proovid katse alguses (0-päev) ja 60. päeval. Kokku on lagunemise ajast sõltuvuse graafiku koostamiseks vaja katse ajal võtta vähemalt viis proovi. Proovivõtu kindlat ajagraafikut ei ole võimalik ette näha, kuna biolagunemine võib toimuda mitmesuguse kiirusega. Igast proovist määratakse lahustunud orgaaniline süsinik kaks korda.

**Proovide võtmine**

23. Proovi vajalik maht sõltub spetsiifilisest analüüsimeetodist, kasutatavast süsinikuanalüsaatorist ja meetodist, mis valitakse proovi töötlemiseks enne süsiniku määramist (punktid 25 ja 26, membraanfiltrimine või tsentrifuugimine). Enne proovi võtmist tuleb katsekeskkonda hästi segada, et materjal, mis võib olla kleepunud kolvi seina külge, lahustuks või läheks üle suspensiooni.
24. Kohe pärast proovi võtmist filtritakse proov läbi membraani või tsentrifuugitakse. Vajaduse korral säilitatakse filtritud või tsentrifuugitud proove 2–4 °C juures kuni 48 tundi või allpool – 18 °C pikemat aega (kui on teada, et see ei mõjuta ainet, viiakse pH enne säilitamist 2 juurde).
25. Membraanfiltreid (0,2–0,45 µm) saab kasutada siis, kui on tõendatud, et need filtrimise ajal ei vabasta süsinikku ega adsorbeeri ainet; sobivad näiteks polükarbonaatmembraanfiltrid. Mõned membraanfiltrid on hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega ja neist võib vabaneva olulises koguses lahustunud süsinikku. Selliseid filtreid tuleb ette valmistada keetmisega deioniseeritud vees kolme järjestikuse ajavahemiku jooksul, iga kord üks tund. Pärast keetmist hoitakse filtreid deioniseeritud vees. Filtraadi esimesed 20 ml visatakse ära.
26. Membraanfiltrimise asemel võib proove tsentrifuugida. Proovi tsentrifuugitakse kiirusega 40 000 m·s<sup>-2</sup> (umbes 4 000 g) 15 minutit, eelistatavalt jahutusega tsentrifuugis.

*Märkus:* Orgaanilise süsiniku üldsisalduse (TOC) ja lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) lahutamine tsentrifuugimisega ei õnnestu väga väikese sisalduse juures, kuna sellega kas ei kõrvaldata kõiki baktereid või läheb osa bakterite rakuplasmas olevast süsinikust lahusesse. Kõrgematel kontsentratsioonidel (> 10 mg C/l) näib tsentrifuugimise viga olevat suhteliselt väike.

**Proovide võtmise sagedus**

27. Kui analüüs tehakse kohe pärast proovi võtmist, võib järgmise proovi võtmise aja hinnata analüüsi tulemuse põhjal.
28. Kui proove säilitatakse, et teha analüüs hiljem (vt punkt 24), võetakse proove rohkem kui viis minimaalselt nõutavat proovi. Tehke viimaste proovide analüüsid kõigepealt, siis võite järk-järgult valida analüüsi tegemiseks varasemaid proove niimoodi, et saada korralik biolagunemise kõver suhteliselt väikse arvu analüüside tegemisega. Kui katse lõpuks ei ole lagunemist toimunud, ei ole rohkem proove vaja analüüsida, ja sellel juhul võib analüüsiks proovide „tagurpidine” valimine aidata analüüsikulusid oluliselt vähendada.

**▼M6**

29. Kui enne 60 päeva möödumist jõuab lagunemise kõver platoole, siis lõpetatakse katse. Kui 60. päevaks on lagunemine selgelt alanud, kuid ei ole platoole jõudnud, tuleb katset pikendada.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

30. Analüüsi tulemused kantakse lisatud andmelehele (2. liide) ja nii uuritava aine kui ka võrdlusaine biolagundamise väärtused arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

kus:

$D_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku lagunemine või konkreetse aine kadumine keskkonnast protsentides ajahetkeks  $t$ ,

$C_0$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas,

$C_t$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas ajahetkeks  $t$ ,

$C_{bl(0)}$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas tühikatses,

$C_{bl(t)}$  = lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine algkontsentratsioon katsekeskkonnas tühikatses ajahetkeks  $t$ .

31. Lagunemine väljendatakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsendina (lõplik lagunemine) või konkreetse aine kõrvaldamise protsendina (primaarne lagunemine) ajahetkeks  $t$ . Lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonid arvutatakse täpsusega 0,1 mg/l ja  $D_t$  keskvaartused ümardatakse ülespoole lähima täisarvulise protsendini.
32. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt, nagu on näidatud joonisel punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”. Kui tulemusi on piisavalt, arvutatakse kõverast ootefaas ( $t_L$ ) ja aeg, mis kulub ootefaasi lõpust kuni 50 % biolagunemise saavutamiseni ( $t_{50}$ ).

**Katseprotokoll**

33. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

*Uuritav aine:*

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- identifitseerimisandmed.

*Katsetingimused:*

- proovivõtu koht ja selle kirjeldus; merevee saastatus (kolooniade arv) ja toitainete (nitraat, ammonium, fosfaat, kui see on asjakohane) sisaldus;
- proovi iseloomustavad andmed (proovivõtu kuupäev, sügavus, proovi välimus, temperatuur, soolsus, lahustunud orgaaniline süsinik (soovi korral), proovi võtmise ja katses kasutamise vaheline ajavahemik;

**▼ M6**

- meetod, mida kasutati merevee vanandamiseks (kui vanandati);
- meetod, mida kasutati merevee eeltöötamiseks (filtrimine/sedimentatsioon);
- lahustunud orgaanilise süsiniku määramise meetod;
- meetod konkreetse kemikaali määramiseks (soovi korral);
- meetod, mida kasutati merevee heterotroofide arvu määramiseks (plaadil loendamise meetod või muu meetod) (soovi korral);
- muud meetodid (soovi korral) merevee iseloomustamiseks (ATP mõõtmine jne).

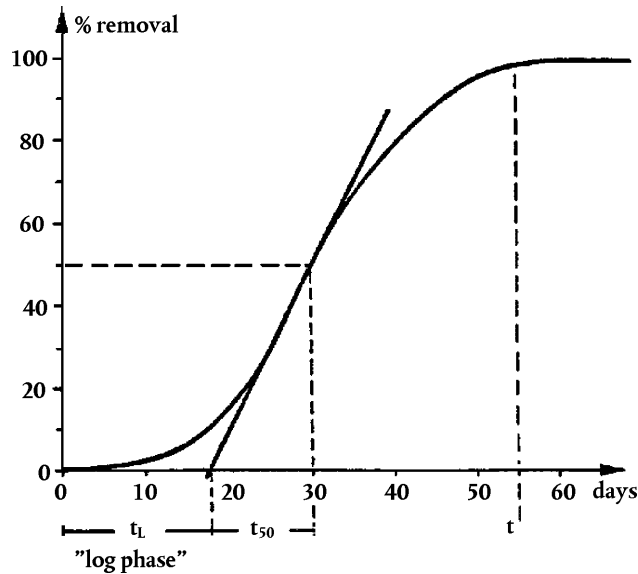
*Tulemused:*

- analüüsiandmed andmelehel (2. liide);
- lagunemise käik esitatakse graafikuna diagrammil, mis näitab ootefaasi ( $t_L$ ), tõusu ja aega (alates ootefaasi lõpust), mis kulub 50 % lagunemise saavutamiseks ( $t_{50}$ ). Ootefaasi pikkuse võib hinnata graafiliselt, nagu on näidatud joonisel punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”; mugavam on võtta ootefaasiks aeg, mis kulub 10 % lagunemiseks;
- lagunemise protsent pärast 60 päeva, või katse lõpus.

*Tulemuste arutelu.***Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine**

34. Võrdlusainetega nagu naatriumbensoaat, naatriumatsetaat ja aniliin saadud tulemused peaksid olema võrreldavad tulemustega, mis saadi laboritevahelises võrdluskatses (3) (vt punkt 7 „Võrdlusained”) Kui võrdlusainetega saadud tulemused on ebatüüpilised, tuleb katsed korrata muu mereveeprooviga. Kuigi inhibeerimiskatsete tulemusi ei saa alati üheselt tõlgendada, kuna uuritav aine annab ka ise panuse lahustunud orgaanilise süsiniku kogusesse, on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise üldkiiruse oluline vähenemine kontrolliga võrreldes selge tunnus mürgise mõju kohta.
35. Kuna katses kasutatakse suhteliselt suurt uuritava aine kontsentratsiooni võrreldes enamiku looduses esinevate kontsentratsioonidega (ja seega on uuritava aine ja muude süsinikuallikate suhtarv ebasoodne), peetakse seda meetodit eelkatseks, mis näitab, kas aine on kergesti biolagunduv või ei ole. Sellest tulenevalt ei tähenda madal katsetulemus tingimata seda, et aine ei ole merevees biolagunev; see näitab, et biolagundatavuse kindlakstelemiseks on vaja teha rohkem uuringuid.

Järgmisel joonisel on esitatud lagunemiskatse teoreetiline kõver, mis näitab, kuidas saab hinnata ootefaasi („lag phase”) pikkust  $t_L$  ja ajavahemikku  $t_{50}$ , mis algab ajahetkest  $t_L$  ja on vajalik 50 % lagunemise saavutamiseks.

▼ **M6****KINNISE PUDELI MEETOD**

## SISSEJUHATUS

1. See meetod on kinnise pudeli katse (5) mereveevariant ning see on lõpuni viimistletud Euroopa Komisjoni ja Taani veekvaliteedi instituudi korraldatud laboritevahelise võrdluskatsega (3).
2. Samuti kui loksutatava kolvi meetodi mereveevariandi puhul, ei tohiks käesoleva meetodi tulemusest teha järeldust kiire biolagunduvuse kohta; meetodiga saadakse konkreetset teavet biolagunduvuse kohta merekeskkonnas.

## MEETODI PÕHIMÕTE

3. Eelnevalt kindlaksmääratud kogus uuritavat ainet, tavaliselt 2–10 mg ühe liitri kohta, lahustatakse katsekeskkonnas (võib kasutada ühte või mitut kontsentratsiooni). Lahust hoitakse täidetud suletud pudelis pimeduses konstantsel temperatuuril vannis või termokambris temperatuuril 15–20 ( $\pm 1$ ) °C. Juhul, kui katse eesmärk on modelleerida keskkonnaolukordi, võib katse teha väljaspool seda normaalset temperatuurivahemikku, tingimusel et temperatuuri kontrollimine on vajalikul viisil seadistatud. Lagunemist jälgitakse 28 päeva jooksul hapniku analüüside abil.
4. Laboritevaheline võrdluskatse näitas, et kui katset pikendati üle 28 päeva, ei saadud enamikul juhtudel mingit kasulikku teavet, kuna tekkisid rängad segavad asjaolud. Tühikatse bioloogilise hapnikutarbe (BHT) väärtused olid väga kõrged, arvatavasti mikroorganismide kasvu tõttu pudeli seintel, kuna pudeleid ei loksutata, samuti nitrifikatsiooni tõttu. Seega on soovituslik kestus 28 päeva, kuid kui tühikatse BHT väärtus jääb 30 protsendi juurde (punktid 15 ja 40), siis võiks katset pikendada.

## ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

5. Selleks, et otsustada, kas katsemetodit saab kasutada teatava konkreetse aine puhul, peavad aine mõned omadused olema teada. Empiiriline valem on vajalik teoreetilise hapnikutarbe (THT) arutamiseks (vt 3. liide); vastasel korral tuleb määrata aine keemiline hapnikutarve (KHT), et kasutada seda võrdlusväärtusena. Keemilise hapnikutarbe kasutamine ei ole eriti hea, kuna mõnda ainet ei oksüdeerita keemilise hapnikutarbe määramise katses täielikult.

**▼M6**

6. Aine lahustuvus peaks olema vähemalt 2 mg/l, kuigi põhimõtteliselt võiks määrata ka halvemini lahustuvaid aineid (nt ultrahelitoetluse abil), samuti saab uurida lenduvaid aineid. Teave uuritava aine puhtusastme või peamiste lisandite suhteliste koguste kohta on vajalik tulemuste tõlgendamiseks, eriti kui tulemus on biolagunduvuse kriteeriumi piiri lähedane.
7. Sobivate uuritavate kontsentratsioonide valimiseks võivad väga kasulikud olla andmed uuritava aine mürgisuse kohta bakteritele, mis on mõõdetud näiteks lühiajalise respiratsioonikiiruse katsega (4); sellised andmed võivad olla ülivajalikud biolagunduvuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks. Selline teave ei ole siiski alati piisav biolagunduvuse katse tulemuste tõlgendamiseks ning sobivam on punktis 27 kirjeldatud meetod.

**VÕRDLUSAINED**

8. Merevee proovi mikroobse aktiivsuse kontrollimiseks tuleb kasutada sobivaid võrdlusaineid. Sellel eesmärgil võib kasutada (näiteks) aniliini, naatriumatsetaati või naatriumbensoaati. Võrdlusaine peab lagunema vähemalt 60 % ulatuses (aine THT järgi) mingi sobivalt lühikese ajavahemiku jooksul; vastasel korral soovitatakse katset korrata mõne muu mereveeprooviga.
9. Euroopa Ühenduse võrdluskatsetes, kus merevee proovid olid võetud eri kohtadest ja eri aastaegadel, olid naatriumbensoaadi puhul ootefaas ( $t_L$ ) ja 50 % lagunemiseks kuluv aeg ( $t_{50}$ ) ilma ootefaasita vastavalt 0–2 päeva ja 1–4 päeva. Aniliini puhul olid  $t_L$  ja  $t_{50}$  väärtused vastavalt 0–7 ja 2–12 päeva.

**KORRATAVUS**

10. Meetodite korratavus määrati ELi laboritevahelise võrdluskatsega (3).

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

11. Tavalised laboriseadmed ja:
  - a) 250–300 ml suurused klaaskorgiga bioloogilise hapnikutarbe (BHT-) pudelid või võib kasutada klaaskorgiga kitsakaelalisi 250 ml suuruseid pudelid;
  - b) mitu 2-, 3- ja 4-liitrist pudelit liitrimärkidega katse ettevalmistamiseks ja BHT-pudelite täitmiseks;
  - c) vesivann või püsiva temperatuuriga ruum pudelite hoidmiseks tühtlasel temperatuuril ( $\pm 1$  °C) pimedas;
  - d) seadmed lahustunud hapniku määramiseks;
  - e) membraanfiltrid 0,2–0,45  $\mu\text{m}$  (soovi korral);
  - f) varustus konkreetse kemikaali määramiseks (soovi korral).

**Merevesi**

12. Merevee proov võetakse hoolikalt puhastatud nõusse ja transporditakse laborisse eelistatavalt ühe või kahe päeva jooksul pärast võtmist. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur tõusta oluliselt kõrgemale katset kasutatavast temperatuurist.

**▼M6**

13. Registreeritakse täpne proovivõtu koht ja kirjeldatakse merevee saasteainete ja toitainete sisaldust kõnealuses kohas. Eriti rannikulähedaste või saastatud vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammoniumi ja fosfaadi kontsentratsioon.
14. Merevee proovi enda kohta esitatakse järgmine teave:
- võtmise kuupäev;
  - proovivõtu sügavus;
  - proovi välimus – sogane vms;
  - temperatuur proovi võtmise ajal;
  - soolsus;
  - lahustunud orgaaniline süsinik (DOC);
  - ajavahemik proovivõtust kuni katseni.
15. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus proovis on kõrge või kui arvatakse, et tühikate bioloogiline hapnikutarve (BHT) 28 päeva pärast on rohkem kui 30 protsenti võrdlusainete omast, siis soovitatakse merevett enne kasutamist umbes üks nädal vanandada.
16. Mereveeproovi vanandatakse hoides seda aeroobsetes tingimustes katse temperatuuril ja pimeduses või hajunud valguses. Vajaduse korral tuleb aeroobsete tingimuste säilitamiseks kergelt aereerida. Vanandamise ajal väheneb kergesti biolagundatava orgaanilise materjali sisaldus. Laboritevahelises võrdluskatses (3) ei leitud vanandatud ja värskest võetud mereveeproovide biolagundamise võimes mingeid erinevusi.
17. Enne kasutamist töödeldakse merevett suuremate osakeste eemaldamiseks näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri või jämeda paberfiltri (mitte kasutada membraan- või klaasmikrokiud- (GF/C-)filtrit) või setitamise ja dekanteerimisega. Katseprotokollis kirjeldatakse kasutatud meetodit. Eeltöötlemine tehakse pärast vanandamist, kui seda kasutatakse.

**Mineraaltoitainete põhilahused**

18. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.
- |    |  |         |
|----|--|---------|
| a) | kaaliumdivesinikortofosfaat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                      | 8,50 g  |
|    | dikaaliumvesinikortofosfaat, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                      | 21,75 g |
|    | dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
|    | ammooniumkloriid, $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 0,50 g  |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| b) | kaltsiumkloriid, $\text{CaCl}_2$   | 27,50 g |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| c) | magneesiumsulfaatheptahüdraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                   | 22,50 g |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |
| d) | raud(III)kloriidheksahüdraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$                    | 0,25 g  |
|    | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.                               |         |

**▼ M6**

Sadenemist lahuses d saab ära hoida ühe tilga kontsentreeritud soolhappe või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe (EDTA dinaatriumsool) lisamisega 1 liitri lahuse kohta. Kui põhilahuses tekib sade, asendatakse see värskelt valmistatud lahusega.

**Uuritava keskkonna valmistamine**

19. Eeltöödeldud merevee ühe liitri kohta lisatakse 1 ml kumbagi eespool kirjeldatud põhilahust. Katsekeskkond küllastatakse katse temperatuuril õhuga; selleks aereeritakse seda puhta suruõhuga umbes 20 minutit. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon. Lahustunud hapniku küllastuskontsentratsiooni eri temperatuuride ja soolsuse juures võib lugeda käesolevale katsemeetodile lisatud nomogrammilt (4. liide).

**Inokulum**

20. Merevees juba olemasolevatele mikroorganismidele ei lisata spetsiaalset inokulumit. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamiseega mereveeagari plaadil. See on eriti soovitatav proovide puhul, mis on võetud rannikuveest või saastatud merealalt. Heterotroofsete mikroobide aktiivsust kontrollitakse nii, et katse tehakse võrdlusainega.

**Katsepudelite ettevalmistamine**

21. Kõik merevee ettevalmistamise toimingud, sealhulgas vanandamine ja eeltöötlemine tehakse valitud temperatuuril vahemikus 15–20 °C; kõik klaasnõud peavad olema puhtad, kuid mitte steriilsed.
22. Uuritava aine ja võrdlusaine BHT uurimiseks üheaegsetes katseeriates valmistatakse ette BHT-pudelite rühmad. Kõik analüüsid (tühikatsed, võrdlusaine ja uuritav aine) tehakse kahe paralleelina, st iga määramise jaoks valmistatakse ette kaks pudelit. Analüüsid tehakse vähemalt päevadel 0, 5, 15 ja 28 (neli määramist). Hapnikuanalüüsise puhul on nelja määramise jaoks vaja kokku  $3 \times 2 \times 4 = 24$  pudelit (tühikatse, võrdlusaine ja uuritav aine), seega ligikaudu 8 liitrit katsekeskkonda (uuritava aine ühe kontsentratsiooni jaoks).
23. Valmistatakse eraldi uuritava aine ja võrdlusainete lahused suurtes piisava mahuga pudelites (punkt 11); esimesena lisatakse uuritav aine või võrdlusaine kas otse või kontsentreeritud põhilahusena suurde pudelisse, mis on osaliselt täidetud. Lisatakse muud katsekeskkonna komponendid nii, et saadakse lõplikus katsekeskkonnas vajalik kontsentratsioon. Kui kasutatakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali põhilahuseid, tuleb tagada, et merevee soolsus katsekeskkonnas oluliselt ei muutuks.
24. Uuritava aine ja võrdlusaine kontsentratsioonide valimisel võetakse arvesse järgmist:
  - a) hapniku lahustuvus merevees katse põhilise temperatuuri ja soolsuse juures (vt lisatud nomogramm, 4. liide);
  - b) mereveega tehtava tühikatse BHT; ning
  - c) uuritava aine eeldatav biolagundatavus.

**▼ M6**

25. 15 °C ja 20 °C ning ookeanivee soolsuse 32/1 000 juures on hapniku lahustuvus vees vastavalt ligikaudu 8,1 ja 7,4 mg/l. Merevee enda hapnikutarbimine (tühikate hapnikutarve) võib olla 2 mg O<sub>2</sub>/l või suurem, kui merevett ei ole vanandatud. Selleks et tagada märkimisväärne hapnikusaldus pärast uuritava aine oksüdeerimist, tuleks kasutada uuritava aine algkontsentratsiooni ligikaudu 2–3 mg/l (sõltuvalt THTst) selliste ainete puhul, mis eeldatavasti lagunevad katse tingimustes täielikult (nagu näiteks võrdlusained). Halvemini lagundatava aine puhul kasutatakse kõrgemat kontsentratsiooni, kuni ligikaudu 10 mg/l, kui ainel ei ole mürgist mõju. Kasulik võib olla teha paralleelselt katsed uuritava aine madala (ligikaudu 2 mg/l) ja kõrge (ligikaudu 10 mg/l) kontsentratsiooniga.
26. Paralleelselt tuleb teha hapniku tühikate; pudelitesse ei lisata sel juhul ei uuritavat ainet ega võrdlusainet.
27. Kui määratakse inhibeerivat toimet, valmistatakse eraldi järgmised lahused suurtes pudelites (punkt 13):
- 2 mg/l kergesti lagunevat ainet, see tähendab ühte eespool nimetatud võrdlusainetest;
  - x mg/l uuritavat ainet (tavaliselt x = 2);
  - 2 mg/l kergesti lagunevat ainet pluss x mg/l uuritavat ainet.

**Füüsikalise-keemilise kontrollkatse (soovi korral)**

28. Kui kasutatakse spetsiifiliste analüüside võimalust, võib teha füüsikalise-keemilise katse, et kontrollida uuritava aine võimalikku kõrvaldamist mõne abiootilise mehhanismi kaudu, näiteks hüdrolyüsi või adsorptsiooniga. Füüsikalise-keemilise kontrollkatse võib teha elavhõbe(II)kloriidi (HgCl<sub>2</sub>)<sup>(1)</sup> lisamisega (50–100 mg/l) uuritava aine lahusega paralleelkatsetesse, et peatada mikroobide tegevus. Kui konkreetse aine kontsentratsioon kontrollkatsetes oluliselt väheneb, osutab see abiootiliste kõrvaldamismehhanismide mõjule.

**BHT-pudelite arv tüüpilises katses**

29. Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudeleid:
- vähemalt 8 pudelit uuritava ainega;
  - vähemalt 8 pudelit, mis sisaldavad üksnes merevett, millele on lisatud toitained;
  - vähemalt 8 pudelit võrdlusainega ja vajaduse korral
  - 6 pudelit, mis sisaldavad uuritavat ainet ja võrdlusainet (mürgisuse kontrollkatse).

**KATSE KÄIK**

30. Kohe pärast lahuste valmistamist viiakse sifoon iga lahust sisaldava suure pudeli alumisse veerandisse (mitte põhja) ja täidetakse kõik vastava rühma BHT-pudelid. Viivitamata määratakse 0-kontrollis (aeg = 0) lahustunud hapnik (punkt 33) või konserveeritakse need hilisemaks keemiliseks analüüsiks MnCl<sub>2</sub> (mangaan(II)kloriidi) ja NaOH (naatriumhüdroksiidi) abil sadestamisega.

<sup>(1)</sup> Elavhõbe(II)kloriid (HgCl<sub>2</sub>) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalike ohutusekirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta otse kanalisatsioonisteedi.



**▼M6**

31. Ülejäänud BHT-pudelite paralleele inkubeeritakse katse temperatuuril (15–20 °C) pimedas ja võetakse need inkubeerimiskambrist sobivate ajavahemike järel (nt vähemalt 5, 15 ja 28 päeva pärast) ja määratakse nendes lahustunud hapnik (punkt 33).
32. Konkreetse aine määramiseks (soovi korral) filtritakse proovid läbi membraanfiltrit (0,2–0,45 µm) või tseentrifuugitakse 15 minutit. Vajaduse korral säilitatakse filtritud või tseentrifuugitud proove 2–4 °C juures kuni 48 tundi või allpool – 18 °C pikemat aega (kui on teada, et see ei mõjuta ainet, viiakse pH enne säilitamist 2 juurde).

**Lahustunud hapniku määramine**

33. Lahustunud hapniku kontsentratsioon määratakse riigi või rahvusvahelisel tasandil tunnustatud keemilise või elektrokeemilise meetodiga.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete töötlemine**

34. Analüüsi tulemused salvestatakse andmelehtedel (vt 5. liide).
35. Bioloogiline hapnikutarve (BHT) arvutatakse tühikatse hapnikukao ja uuritava aine lahuse hapnikukao vahena katse tingimustes. Netohapnikukadu jagatakse uuritava aine kontsentratsiooniga (mass/maht), et leida BHT (mg) uuritava aine mg kohta. Lagunemine avaldatakse suhtarvuna: bioloogilise hapnikutarbe suhe teoreetilise hapnikutarbesse (THT; eelistatav) või keemilise hapnikutarbesse (KHT) protsentides (vt punkt 36).
36. Arvutatakse biolagunemise väärtused igal proovide võtmise ajal nii uuritava aine kui ka võrdlusaine puhul, kasutades ühte järgmistest võrranditest:

$$\text{biolagunemise\%} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mguuritavat ainet}}{\text{mg THT} / \text{mguuritavat ainet}} \times 100$$

$$\text{biolagunemise\%} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mguuritavat ainet}}{\text{mg KHT} / \text{mguuritavat ainet}} \times 100$$

kus:

THT = teoreetiline hapnikutarve (arvutamine, vt 3. liide);

KHT = keemiline hapnikutarve, mis määratakse katseliselt.

*Märkus:* Mõnel juhul ei anna need kaks arvutamismeetodit (protsent teoreetilise või protsent keemilise hapnikutarbe järgi) sama tulemust; parem on kasutada teoreetilist hapnikutarvet, kuna keemilise hapnikutarbe määramise katses ei oksüdeerita mõnda ainet lõpuni.

37. Lagunemiskatse käik esitatakse graafiliselt (vt näide punktis „Tulemuste nõuetekohasus ja tõlgendamine”. Kui tulemusi on piisavalt, arvutatakse biolagunemise kõverast ootefaas ( $t_L$ ) ja aeg, mis kulub ootefaasi lõpust kuni 50 % biolagunemise saavutamiseni ( $t_{50}$ ).
38. Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsi (soovi korral), siis teatatakse konkreetse aine primaarse lagunemise protsent katseaja jooksul (pärast analüüsi tühikatseid arvestavate parandite tegemist).

**▼ M6****Katseprotokoll**

39. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

*Uuritav aine:*

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- identifitseerimisandmed.

*Katsetingimused:*

- proovivõtu koht ja selle kirjeldus; merevee saastatus (kolooniade arv) ja toitainete (nitraat, ammonium, fosfaat, kui see on asjakohane) sisaldus;
- proovi iseloomustavad andmed (proovivõtu kuupäev, sügavus, proovi välimus, temperatuur, soolsus, lahustunud orgaaniline süsinik (soovi korral), proovi võtmise ja katses kasutamise vaheline ajavahemik);
- meetod, mida kasutati merevee vanandamiseks (kui vanandati);
- meetod, mida kasutati merevee eeltötluseks (filtrimine/sedimentatsioon);
- KHT määramisel kasutatud meetod (kui määrati);
- hapniku mõõtmise meetod;
- dispergeerimismeetod, mida kasutati katsetingimustes halvasti lahustuva aine puhul;
- meetod, mida kasutati merevee heterotroofide arvu määramiseks (plaadil loendamise meetod või muu meetod);
- meetod, mida kasutati merevee lahustunud orgaanilise süsiniku määramiseks (soovi korral);
- spetsiifilise analüüsi meetod (soovi korral);
- muud meetodid merevee iseloomustamiseks (ATP mõõtmine jne) (soovi korral).

*Tulemused:*

- analüüsiandmed esitatuna andmelehel (vt 5. liide);
- lagunemise käik graafikuna diagrammil, mis näitab ootefaasi ( $t_L$ ), tõusu ja aega (alates ootefaasi lõpust), mis kulub uuritava aine oksüdeerumiseks kulutatud lõplikust hapnikutarbest 50 % saavutamiseks ( $t_{50}$ ). Ootefaasi pikkuse võib hinnata graafiliselt, nagu on näidatud juuresoleval joonisel; mugav on võtta ootefaasiks aeg, mis kulub 10 % lagunemiseks;
- lagunemise protsent pärast 28 päeva möödumist.

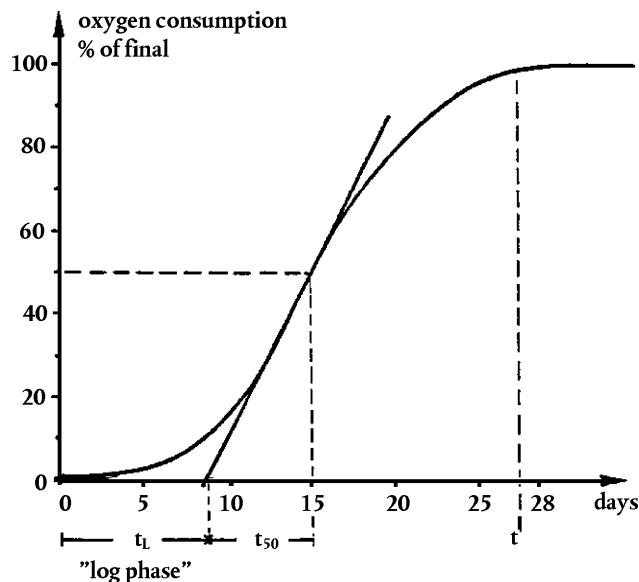
*Tulemuste arutelu.***Tulemuste arutelu ja tõlgendamine**

40. Tühikatse hingamine ei tohiks ületada 30 % katsepudelis olevast hapnikust. Kui selle kriteeriumi täitmine värske mereveeproovi puhul ei ole võimalik, peab merevesi olema enne kasutamist vanandatud (stabiliseeritud).
41. Arvesse tuleb võtta võimalust, et lämmastikku sisaldavad ained võivad mõjutada katse tulemusi.

## ▼ M6

42. Võrdlusainetega nagu naatriumbensoat ja aniliin saadud tulemused peaksid olema võrreldavad tulemustega, mis saadi laboritevahelises võrdluskatses (3) (vt punkt 9). Kui võrdlusainetega saadud tulemused on ebatüüpilised, tuleb katset korrata muu mereveeprooviga.
43. Uuritavat ainet võib pidada bakterite elutegevust katse kontsentratsioonil pärssivaks, kui võrdlusaine ja uuritava aine segu lahuse BHT on väiksem kui kummagi aine lahuse BHT väärtuste summa.
44. Kuna uuritava aine kontsentratsioon katses on suhteliselt suur võrreldes enamiku looduses esinevate kontsentratsioonidega ja seega on uuritava aine ja muude süsinikuallikate suhtarv ebasoodne, peetakse seda meetodit eelkatseks, mis näitab, kas aine on kergesti biolagunduv või mitte. Sellest tulenevalt ei tähenda madal katsetulemus tingimata seda, et aine ei ole merevees biolagunev; see näitab, et biolagundatavuse kindlakstegemiseks on vaja teha rohkem uuringuid.

Järgmisel joonisel on esitatud biolagunemiskatse teoreetiline kõver, mis näitab, kuidas saab hinnata ootefaasi (*lag phase*) pikkust  $t_L$  ja ajavahemikku  $t_{50}$ , mis algab ajahetkest  $t_L$  ja on vajalik uuritava aine 50 % oksüdeerimiseks.



## KIRJANDUS

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
- (2) Käesoleva lisa peatükk C.4-B. Kohese biolagunduvuse määramine. III osa. Muudetud OECD sõelkatse
- (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
- (4) Käesoleva lisa peatükk B.11. Biodegradatsioon. Aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse.
- (5) Käesoleva lisa peatükk C.4-E. Kohese biolagunduvuse määramine. VI osa. Kinnise pudeli katse.

▼ **M6***1. liide***Orgaanilise süsiniku määramine merevees****LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD**

Orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks veeproovis oksüdeeritakse proovi orgaanilised ühendid süsinikdioksiidiks, kasutades üldiselt ühte järgmisest kolmest meetodist:

- märgoksüdatsioon persulfaadi/UV-kiirgusega;
- märgoksüdatsioon persulfaadi/kõrge temperatuuriga (116–130 °C);
- põletamine.

Tekkiva CO<sub>2</sub> kogus mõõdetakse neeldumise järgi infrapunaspektris või titrimetriliselt. Teine võimalus on taandada CO<sub>2</sub> metaaniks, mille kogus mõõdetakse leekionisatsioonidetektoriga.

Persulfaadi/UV-meetodit kasutatakse tavaliselt puhtama vee analüüsimiseks, milles on vähe tahkeid osakesi. Viimaseid kahte meetodit võib kasutada enamiku veeproovitüüpide puhul, kusjuures persulfaadi/kõrge temperatuuri oksüdatsiooni meetod on kõige sobivam madala süsinikusisaldusega proovide puhul ja põletamismeetodit saab kasutada proovide jaoks, milles lendumatu orgaanilise süsiniku sisaldus ületab oluliselt 1 mg C/l.

**Segavad tegurid**

Kõik kolm meetodit sõltuvad proovis sisalduva anorgaanilise süsiniku kõrvaldamisest või arvessevõtmisest. CO<sub>2</sub> väljapuhumine hapestatud proovist on kõige sagedamini kasutatav meetod anorgaanilise süsiniku kõrvaldamiseks, kuigi sellega lähevad kaotsi ka lenduvad orgaanilised ühendid (1). Anorgaanilise süsiniku täielik kõrvaldamine või arvessevõtmine tuleb tagada proovi igasuguse koostise puhul ja olenevalt proovi tüübist tuleb lisaks mittelenduvatele orgaanilistele süsinikuühenditele määrata ka lenduvad orgaanilised süsinikuühendid.

Suure kloriidisisalduse puhul väheneb persulfaadi/UV-meetodiga oksüdeerimise tõhusus (2). Elavhõbe(II)nitraadiga modifitseeritud oksüdeeriva reagenti lisamisega saab selle segava toime siiski kõrvaldada. Igasuguste kloriidi sisaldavate proovide puhul soovitatakse kasutada suurimat lubatavat proovi mahtu. Põletamismeetodi kasutamisel võib proovi suur soolasisaldus põhjustada soolakihi tekkimist katalüsaatori pinnale ja põletustoru ulatuslikku korrosiooni. Vastavalt tootja juhendile tuleb sel juhul võtta vajalikud ettevaatusabinõud.

Väga häguse proovi ja tahkeid osakesi sisaldava proovi puhul võib oksüdeerimine persulfaadi/UV-meetodiga jääda ebatäielikuks.

**Näide sobiva meetodi kohta**

Lendumatud orgaanilised süsinikuühendid määratakse persulfaadi/UV-kiirgusega oksüdeerimisega ja tekkinud CO<sub>2</sub> mõõtmisega mittelahutava infrapunaspektrometria abil.

Oksüdeerimisreagenti muudetakse vastavalt ettepanekutele (2), mida on kirjeldatud tootja käsiraamatus:

- a) 8,2 g HgCl<sub>2</sub> ja 9,6 g Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O lahustatakse mitmesajast milliliitris madala süsinikusisaldusega analüütilise puhtusastmega vees;
- b) elavhõbedasoola lahuses lahustatakse 20 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>;

**▼M6**

c) segule lisatakse 5 ml kontsentreeritud HNO<sub>3</sub>;

d) reagent lahjendatakse 1 000 ml-ni.

Kloriidi segav mõju kõrvaldatakse sellega, et 10 % kloriidisisalduse puhul võetakse proovi mahuks 40 µl ja 1,9 % kloriidisisalduse puhul 200 µl. Suure kloriidisisaldusega või suure mahuga proove võib selle meetodiga analüüsida siis, kui hoitakse ära kloriidi kogunemine oksüdatsiooninõusse. Lenduva orgaanilise süsiniku määramise võib teha hiljem, kui see on kõnealuse proovitäübi puhul asjakohane.

**KIRJANDUS**

- (1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Samuti pakub huvi (seoses automatiseeritud analüüsisüsteemi kirjeldusega):

- (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.

▼ **M6**

## 2. liide

**Biologundatavus merevees**

## LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

## ANDMELEHT

1 **LABOR:**2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV:**3. **UURITAV AINE:**

Nimetus:

Põhilahuse kontsentratsioon: mg/l aigena

Algkontsentratsioon keskkonnas,  $t_0$ : mg/l aigena

mg lah. org. C/l

4. **MEREVESI:**

Allikas:

Proovivõtu kuupäev:

Proovivõtu sügavus:

Välimus proovi võtmise ajal (nt hägune jne):

Soolsus proovi võtmise ajal: ‰

Temperatuur proovi võtmise ajal: °C

Lahustunud orgaaniline süsinik x tundi pärast proovi võtmist: mg/l

Eeltöötlus enne katse tegemist (nt filtrimine, setitamine, vanandamine jne):

Mikroobikolooniate arv — originaalproovis: kolooniat/ml

— katse alguses: kolooniat/ml

Muud omadused:

5. **SÜSINIKU MÄÄRAMINE:**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolb nr		Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_x$
Katse: uuritavat ainet sisaldav lisatud toitainetega merevesi	1	$a_1$					
		$a_2$					
		keskmine, $C_{a(t)}$					
	2	$b_1$					
		$b_2$					
		keskmine, $C_{d(t)}$					

## ▼ M6

	Kolb nr		Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
Tühikate: lisatud toitainetega merevesi ilma uuritava aineta	1	c <sub>1</sub>					
		c <sub>2</sub>					
		keskmine, C <sub>d(t)</sub>					
	2	d <sub>1</sub>					
		d <sub>2</sub>					
		keskmine, C <sub>b(t)</sub>					
	keskmine C <sub>bl(t)</sub> = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

## 6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE:

Kolb nr	Tulemuste arvutamine	Lagunemisprotsent n päeva pärast				
		0	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>x</sub>
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				
Keskmine (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(\*) D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

*Märkus:* analoogseid tabeleid võib kasutada ka siis, kui lagunemist jälgitakse konkreetse aine analüüsiga, samuti võrdlusaine ja mürgisuse kontrollkatsete puhul.

## 7. ABIOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

	Aeg (päevad)	
	0	t
Lahust. org. süsiniku konts. steriilses kontrollkatses (mg/l)	C <sub>s(0)</sub>	C <sub>s(t)</sub>

$$\text{abiootilise lagunemise\%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

▼ **M6**

## 3. liide

**Teoreetilise biokeemilise hapnikutarbe arvutamine****KINNISE PUDELI MEETOD**

Aine  $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$  puhul, mille molekulmass on MW, arvutatakse THT järgmiselt:

$$THT_{NH_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Selles arvutuses on eeldatud, et C mineraliseeritakse CO<sub>2</sub>-ks, H – H<sub>2</sub>O-ks, P – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-ks ja Na – Na<sub>2</sub>O-ks. Halogeen kõrvaldatakse vesinikhaliidina ja lämmastik ammoniaagina.

Näide:

Glükoos C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, MW = 180

$$THT = \frac{16 \left( 2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2 / \text{mg glükoosi}$$

Muude kui leelismetallide soolade molekulmasside arvutamisel eeldatakse, et soolad on hüdroliisunud.

Väävli puhul eeldatakse oksüdeerumist kuni oksüdatsiooniastmeni + 6.

Näide:

Naatrium-*n*-dodetsüülbenseensulfonaat C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>SO<sub>3</sub>Na, MW = 348

$$THT = \frac{16 \left( 36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2 / \text{mg ainet}$$

Lämmastikku sisaldavate ainete puhul võib lämmastik muutuda ammoniaagiks, nitrititeks, nitraatideks; iga selline võimalus tähendab erinevat teoreetilist biokeemilist hapnikutarvet.

$$THT_{NO_2} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

$$THT_{NO_3} = \frac{16 \left[ 2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Oletame sekundaarse amiini puhul täielikku muundumist nitraadiks:

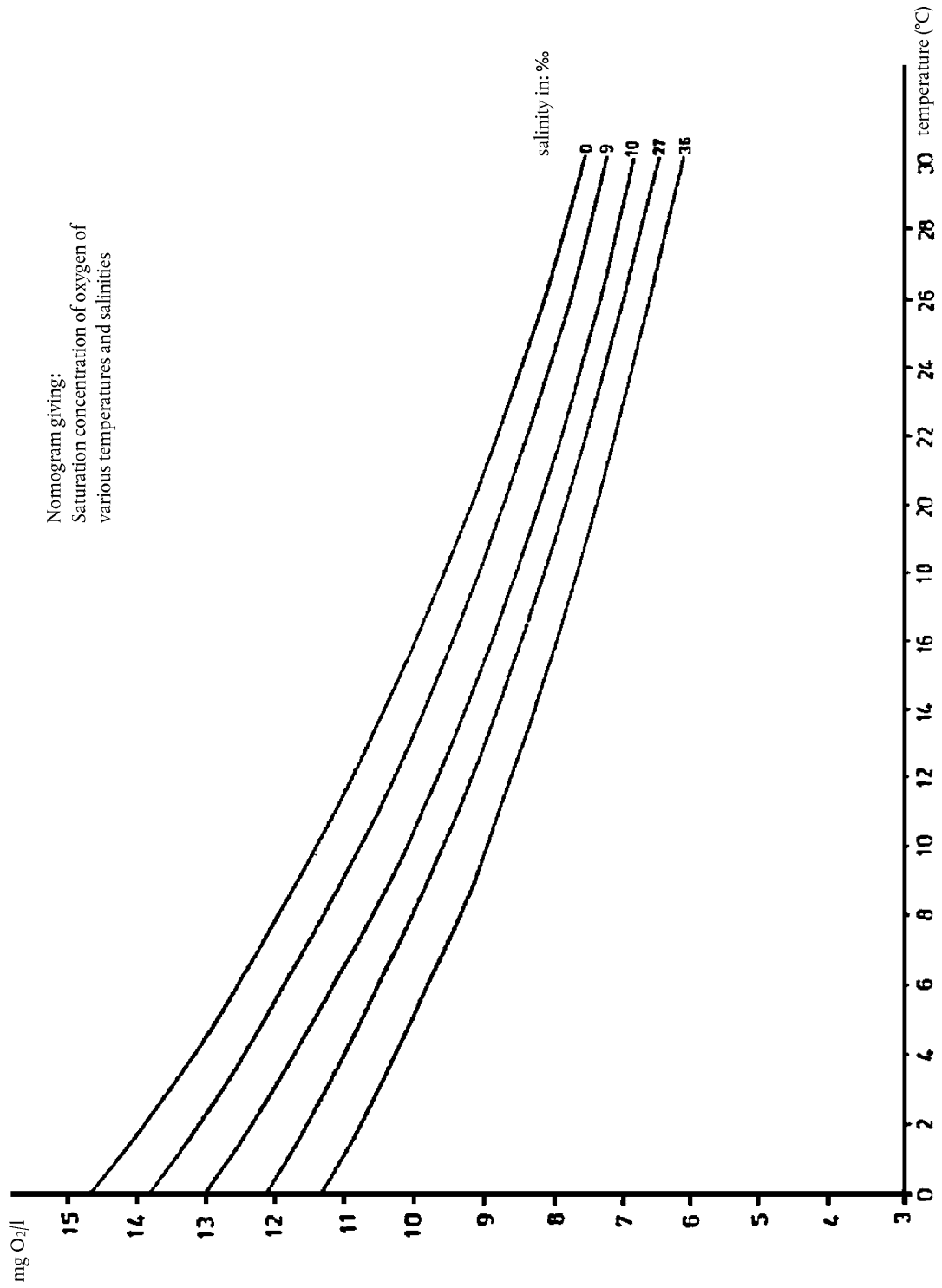
(C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>)<sub>2</sub>NH, MW = 353

$$THT_{NO_3} = \frac{16 \left( 48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2 / \text{mg ainet}$$



▼ M6

4. liide



▼ **M6**

## 5. liide

**Biologundatavus merevees**

KINNISE PUDELI MEETOD

ANDMELEHT

1. **LABOR:**
2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV:**
3. **UURITAV AINE:**

Nimetus:

Põhilahuse kontsentratsioon: mg/l  
 Lähtekontsentratsioon mereveekeskkonnas: mg/l  
 THT või KHT: mg O<sub>2</sub> uuritava aine mg kohta

4. **MEREVESI:**

Allikas:

Proovivõtu kuupäev:

Proovivõtu sügavus:

Välimus proovi võtmise ajal (nt hägune jne):

Soolsus proovi võtmise ajal: ‰  
 Temperatuur proovi võtmise ajal: °C  
 Lahust. org. süsinik x tundi pärast proovi võtmist: mg/l

Eeltöötlus enne katse tegemist (nt filtrimine, setitamine, vanandamine jne):

Mikroobikolooniate arv — originaalproovis: kolooniat/ml  
 — katse alguses: kolooniat/ml

Muud omadused:

5. **KATSEKESKKOND:**

Temperatuur pärast aereerimist: °C  
 O<sub>2</sub> kontsentratsioon pärast aereerimist ja seismist enne katse algust: mg O<sub>2</sub>/l

6. **LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE:**

Meetod: Winkler/elektrood

	Kolb nr		mg O <sub>2</sub> /l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Katse: uuritavat ainet sisaldav toitainevega merevesi	1	a <sub>1</sub>				
	2	a <sub>2</sub>				
	Katsete keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼ **M6**

	Kolb nr		mg O <sub>2</sub> /l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Tühikate: ilma uuritava aineta toitainetega merevesi	1	c <sub>1</sub>				
	2	c <sub>2</sub>				
	Tühikatsete keskmine	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

*Märkus:* Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollkatsete jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. **LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMISPROTSENT (%D)**

	Lagunemisprotsent n päeva pärast		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ <sup>(1)</sup>			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{\text{uuritav aine}(mg/l) \times THT} \times 100$			

- (1) Sellega eeldatakse, et  $m_{b(o)} = m_{t(o)}$ , kus  
 $m_{b(o)}$  = tühikate väärtus päeval 0,  
 $m_{t(o)}$  = uuritava aine väärtus päeval 0.  
 Kui  $m_{b(o)}$  ei ole võrdne  $m_{t(o)}$ -ga, siis kasutatakse  $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$ , kus  
 $m_{b(x)}$  = tühikate väärtus päeval x,  
 $m_{t(x)}$  = uuritava aine väärtus päeval x.

▼ **M6****C.43. ORGAANILISTE AINETE ANAEROOBNE BIOLAGUNEVUS  
LÄBIKÄÄRINUD MUDAS: MÖÖTMINE GAASI ERALDUMISE  
JÄRGI**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 311 (2006). Orgaaniliste ainete biolagunevuse hindamiseks aeroobsetes tingimustes on mitmeid sõelkatsemeetodeid (katsemeetodid C.4, C.9, C.10 ja C.11 (1) ning OECD katsejuhend nr 302C (2)) ja nendega saadud tulemusi on edukalt kasutatud selleks, et ennustada ainete käitumist aeroobses keskkonnas, eriti reovee aeroobse töötlemise staadiumides. Ka vees lahustumatuid aineid, samuti reovee tahketele osakestele adsorbeeruvaid aineid töödeldakse aeroobsetes tingimustes, kuna need jäävad setitunud reovette. Kuid suurem osa sellistest ainetest on seotud reovee esmase settinud mudaga, mis eraldatakse töötlemata reoveest settimistankides enne, kui setitunud reovett ehk supernatanti hakatakse töötleva aeroobsetes tingimustes. Muda, mis osakes-tevahelises vedelikus sisaldab mõnevõrra ka lahustuvaid aineid, suunatakse seejärel kuumutatavatesse kääritamisnõudesse anaeroobsele töötlemisele. Seni ei ole veel meetodeid anaeroobse biolagundatavuse hindamiseks anaeroobse kääritamise nõudes ja käesoleva katse eesmärk on täita see lünk; see meetod ei tarvitse olla kasutatav muudes hapnikuvabades keskkonnaosades.
  
2. Anaeroobse biolagunduvuse hindamiseks on edukalt kasutatud respiromeetrisi meetodeid, millega mõõdetakse vabanevate gaaside, peamiselt metaani (CH<sub>4</sub>) ja süsinikdioksiidi (CO<sub>2</sub>) koguseid. Birch *et al* (3) on need meetodid läbi vaadanud ja teinud järelduse, et sellel alal on kõige põhjalikum Sheltoni ja Tiedje (4) töö, mis põhineb varasematel töödel (5, 6, 7). Nende meetodis (4), mida hiljem arendasid edasi teised (8) ja mis on saanud Ameerika Ühendriikides standardmeetodiks (9, 10), ei lahendatud raskusi, mis on seotud CO<sub>2</sub> ja CH<sub>4</sub> erineva lahustumisega katsekeskkonnas ning uuritava aine poolt vabastatava gaaside koguse teoreetilise arvutamisega. ECETOCi aruandes (3) soovitati lahustunud anorgaanilise süsiniku täiendavat mõõtmist supernatandis, tänu millele sai meetodit laiemalt kasutada. ECETOCi meetodiga tehti rahvusvaheline laboritevaheline võrdluskatse (nn kaliibrimine) ja sellest sai ISO standard ISO 11734 (11).
  
3. Käesolevas katsemeetodis, mis põhineb standardil ISO 11734 (11), kirjeldatakse sõelkatsemeetodit, millega hinnatakse orgaaniliste ainete potentsiaalset anaeroobset biolagunevust konkreetsetes tingimustes (st anaeroobses sette kääritamistankis teatava aja jooksul ja mikroorganismide teatava kontsentratsiooni juures). Kuna kasutatakse lahjendatud reoveesetet, milles uuritava aine kontsentratsioon on suhteliselt kõrge ja katse kestab tavaliselt kauem kui reovee anaeroobne kääritamine, ei tarvitse katse tingimused tingimata olla samad kui anaeroobses kääritamistankis; samuti ei saa sellega hinnata orgaaniliste ainete biolagunevust muudes erinevates keskkonnatingimustes. Mudal lastakse uuritava ainega kokkupuutes olla kuni 60 päeva; see on pikem aeg kui tavalisel reoveemuda anaeroobsel kääritamisel (25-30 päeva), kuid mõne tehase reoveepuhastis võib muda olla ka hoopis kauem. Käesoleva katse tulemused ei võimalda teha sama põhjendatud ennustusi kui aeroobse biolagunemise katse puhul, kuna uuritavate ainete kohta „kiiretes” aeroobsetes katsetes, modelleerimiskatsetes ja aeroobses keskkonnas saadud andmed on piisavad selleks, et olla veendunud seose olemasolus; anaeroobse keskkonna kohta on sarnaseid andmeid väga vähe. Täielikku anaeroobset biolagunemist võib oletada juhul, kui eraldub 75–80 % teoreetiliselt võimalikust gaasikogusest. Uuritava aine ja biomassi

▼ **M6**

kõrge suhtarv, mida kasutati kõnealustes katsetes, tähendab seda, et katse edukalt läbinud aine tõenäoliselt laguneb anaeroobses kääritamistankis. Aine, mida ei õnnestu gaasiks muuta, ei tarvitse siiski olla püsiv keskkonna seisukohast realistlikuma aine-biomassi suhtarvu juures. Toimuvad ka muud anaeroobsed reaktsioonid, näiteks deklorimine, mille tulemusel võib aine vähemalt osaliselt laguneda, kuid käesoleva katsega selliseid reaktsioone ei tuvastata. Kui kasutada aga uuritava aine määramiseks spetsiifilisi analüüsi-meetodeid, saab aine kadumist siiski jälgida (vt punktid 6, 30, 44 ja 53).

## KATSE PÕHIMÕTE

4. Pestud läbikäärinud muda<sup>(1)</sup>, mis sisaldab madalas kontsentratsioonis (< 10 mg/l) anorgaanilist süsinikku, lahjendatakse umbes kümme korda, nii et tahke aine üldsisaldus on 1–3 g/l, ja inkubeeritakse  $35 \pm 2$  °C juures suletud anumal uuritava aine kontsentratsiooni 20–100 mg C/l juures kuni 60 päeva. Nähakse ette muda aktiivsuse mõõtmine, milleks tehakse paralleelselt tühikatse keskkonnas, millesse on viidud muda inokulum, kuid mis ei sisalda uuritavat ainet.
  
5. Mõõdetakse rõhu suurenemist anuma vabaruumis, mille põhjuseks on CO<sub>2</sub> ja metaani tekkimine. Suur osa tekkinud CO<sub>2</sub>-st jääb lahustununa vedelfaasi või muutub katse tingimustes karbonaadiks või vesinikkarbonaadiks. Katse lõpus mõõdetakse tekkinud anorgaanilise süsiniku sisaldus.
  
6. Süsiniku kogus (anorgaaniline + metaan), mis tekib uuritava aine biolagunemisel, arvutatakse gaasi vabanemisest ja anorgaanilise süsiniku kogusest vedelfaasis, millest on lahutatud tühikatse vastavad näitajad. Biolagunemise määra arvutatakse tekkinud anorgaanilise süsiniku ja metaanis oleva süsiniku protsendina uuritavas aines olnud süsiniku mõõdetud või arvatud kogusest. Biolagunemise käiku saab jälgida üksnes tekkinud gaasi vahepealsete mõõtmistega. Lisaks sellele võib primaarse biolagunemise määrata konkreetse aine määramisega katse alguses ja lõpus.

## ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

7. Tulemuste õigesti tõlgendamiseks on vaja teada uuritava aine puhtust, vees lahustuvust, lenduvus- ja adsorptsioonimadusi. Uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) peab olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava aine puhul aitab mõõdetud või arvatud Henry seaduse konstant otsustada, kas see katse on kohaldatav. Sobiva uuritava kontsentratsiooni valimiseks ning halba biolagunduvust näitavate tulemuste tõlgendamiseks on kasulik omada teavet uuritava aine mürgisuse kohta anaeroobsete bakterite suhtes. Soovitatav on moodustada katses kontrollrühm ka pärsimise kontrollimiseks, välja arvatud juhul kui on on teada, et uuritav aine ei pärsi anaeroobsete mikroobide tegevust (vt punkt 21 ja ISO 13641-1 (12)).

<sup>(1)</sup> Läbikääritatud reoveemuda on reovee ja aktiivmuda sadestunud faaside segu, mida on inkubeeritud anaeroobses kääritustankis ligikaudu 35 °C juures, et vähendada biomassi kogust ja haisuprobleeme ning parandada vee eraldatavust mudast. See koosneb anaeroobse käärimise bakteritest ja metanogeenestest bakteritest, kes toodavad süsinikdioksiidi ja metaani (11).

▼ **M6****KATSEMEETODI KASUTATAVUS**

8. Meetodit võib rakendada vees lahustuvate ainete puhul; seda võib rakendada ka halvasti lahustuvate või lahustumatute ainete korral eeldusel, et kasutatakse täpse doseerimise meetodit, näiteks vt ISO 10634 (13). Üldiselt tuleb iga lenduva aine puhul teha otsus eraldi. Võib-olla on vaja kasutada erimeetmeid, näiteks mitte lasta gaasi katse ajal välja.

**VÕRDLUSAINED**

9. Katse läbiviimise kontrollimiseks tehakse katse võrdluskemikaaliga; selleks pannakse osana tavapärasest katsest käima ka sobivad anumad võrdlusainega. Fenool, naatriumbensoaat ja polüetüleenglükool 400 on näiteks ühendid, millest teoreetilise gaaside (metaani ja anorgaanilise süsiniku) vabanemise järgi peaks 60 päevaga lagunema üle 60 % (3, 14).

**KATSETULEMUSTE KORRATAVUS**

10. Rahvusvahelises võrdluskatses (14) oli kolme paralleelkatse korratavus gaasi rõhu mõõtmiste järgi hea. Suhteline standardhälve (variatsioonikordaja, COV) oli üldiselt alla 20 %, kuigi sageli tõusis see väärtus üle 20 % mürgise aine juuresolekul või 60-päevase inkubatsiooniperioodi lõpus. Suuremaid kõrvalekaldeid esines ka nõudes, mille maht oli alla 150 ml. Katsekeskkonna pH oli katse lõpus vahemikus 6,5–7,0.
11. Laboritevahelises võrdluskatses saadi järgmised tulemused.

Uuritav aine	Andmeid kokku $n_1$	Keskmine lagunemine (kõigist andmetest) (%)	Suhteline standardhälve (kõigist andmetest) (%)	Nõuetekohaseid andmeid $n_2$	Keskmine lagunemine (nõuetekohastest andmetest) (%)	Suhteline standardhälve (nõuetekohastest andmetest) (%)	Andmeid lagunemisprotsendiga > 60 % nõuetekohastes katsetes $n_3$
Palmitiinhape	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polüetüleenglükool 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(\*) Osa  $n_2$ -st.

12. Kõigist palmitiinhappe ja polüetüleenglükool 400 tulemustest leitud keskvaartuse variatsioonikordaja oli vastavalt 45 % ( $n = 36$ ) ja 35 % ( $n = 38$ ). Kui väärtused alla 40 % ja üle 100 % jäeti välja (esimeste puhul oletati ebasoodsaid tingimusi, teiste puhul mingeid tundmatuid põhjusi), vähenesid COV väärtused vastavalt 26 % ja 23 %-ni. Selliste „nõuetekohaste” väärtuste osakaal, milles saavutati vähemalt 60 % lagunemine, oli palmitiinhappe puhul 70 % ja polüetüleenglükool 400 puhul 83 %. Biolagunemise protsendi osa, mis määrati lahustunud anorgaanilise süsiniku mõõtmistest, oli suhteliselt madal, kuid muutuv. Palmitiinhappe puhul oli see vahemikus 0–35 %, keskmine 12 % ja COV 92 % ning polüetüleenglükool 4 000 puhul 0–40 %, keskmine 24 % ja COV oli 54 %.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

13. Tavalised laboriseadmed ja järgmised seadmed:

a. sädemekindel inkubaator, mis hoiab temperatuuri  $35 \pm 2$  °C;

▼ **M6**

- b. sobiva nominaalmahuga <sup>(1)</sup> ja rõhule vastupidavad klaasist katsenõud, millest igaüks on varustatud gaasi mitte läbilaskva membraaniga, mis talub survet ligikaudu 2 baari. Vabaruum peaks olema ligikaudu 10–30 % koguruumalast. Kui biogaasi vabaneb pidevalt, piisab vabaruumist 10 %, kuid kui gaas vabaneb alles katse lõpus, on vajalik vabaruum 30 %. Kui igal proovivõtuajal lastakse rõhul langeda, soovitatakse kasutada klaasist seerumipudeleid nominaalmahuga 125 ml ja üldmahuga ligikaudu 160 ml, mis on suletud seerumimembraaniga <sup>(2)</sup> ja sellele valtsitud alumiiniumrõngaga;
- c. rõhumõõtmisseade, <sup>(3)</sup> mis sobib tekkiva gaasi mõõtmiseks ja väljalaskmiseks, näiteks käeshoitav täppismanomeeter, mis on varustatud sobiva süstlanõelaga; gaasipidav 3-käiguline kraan hõlbustab ülerõhu väljalaskmist (1. liide). Oluline on, et rõhu väljalaskmiseks kasutatava toru ja kraani siseruumala oleks võimalikult väike, nii et selle seadme ruumala arvestamata jätmisest tekkiv viga oleks ebaoluline;

**Märkus:** rõhu näitu kasutatakse otse selleks, et arvutada tekkinud süsiniku kogus vabaruumis (punktid 42–44). Teise võimalusena võib rõhunäidud sobiva teisendusgraafiku abil muuta tekkinud gaasi ruumaladeks (35 °C juures atmosfäärirõhul). Teisendusgraafik koostatakse andmete põhjal, mis saadakse teadaolevate lämmastiku ruumalade süstimisega katsenõudesse (näiteks seerumipudelitesse) 35 ± 2 °C juures ja saadavate stabiliseerunud rõhunäitude registreerimisega (vt 2. liide). Arvutus on esitatud punkti 44 märkuses.

**Hoiatus:** mikrosüstalde kasutamisel vältige torkevigastusi;

- d. süsinikuanalüsaator, mis sobib anorgaanilise süsiniku otseseks määramiseks vahemikus 1–200 mg/l;
- e. suure täpsusega süstlad gaasi- ja vedelikeproovide võtmiseks;
- f. magnetsegajad ja magnetpulgad (soovi korral);
- g. kindakapp (soovituslik).

**Reagendid**

14. Kogu katse vältel tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid reagente.

<sup>(1)</sup> Soovitav suurus on 0,1–1 liiter.

<sup>(2)</sup> Soovitatakse kasutada gaasikindlaid silikoonmembraane. Lisaks soovitatakse kontrollida membraanide gaasipidavust, kuna paljud müügil olevad membraanid, eelkõige butüülkumm-membraanid, ei ole metaani puhul piisavalt kindlad ning mõned membraanid hakkavad gaasi läbi laskma, kui neist katse tingimustes on nõel läbi torgatud.

<sup>(3)</sup> Seadet tuleks kasutada ja regulaarselt kalibreerida vastavalt tootja juhendile. Kui kasutatakse ettenähtud kvaliteediga manomeetrit, mis on näiteks ümbritsetud terasmembraaniga, ei ole vaja seda laboris kalibreerida. Selle manomeetri kalibreerimise õigsust saab kontrollida laboris nii, et mõõdetakse üks rõhk 1 × 10<sup>5</sup> Pa ja võrreldakse seda mehhaanilise näidikuga manomeetri näiduga. Kui seade mõõdab selle ühe rõhu õigesti, on ka tema skaala lineaarsus muutmata. Kui kasutatakse muid mõõteseadmeid (millel ei ole sertifikaati tootja kalibreerimise kohta), soovitatakse kogu selle mõõtmisvahemik korrapäraste ajavahemike järel kalibreerida.

▼ **M6****Vesi**

15. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis on vabastatud hapnikust läbipuhumisega, milleks kasutatakse gaasilist lämmastikku hapnikusisaldusega alla 5 µl/l; vesi peab sisaldama vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC).

**Katsekeskkond**

16. Valmistatakse lahenduslahus, mis sisaldab järgmisi aineid näidatud koguses:

veevaba kaaliumdivesinikfosfaat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,27 g
dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,12 g
ammooniumkloriid, $\text{NH}_4\text{Cl}$	0,53 g
kaltsiumkloriidihüdraat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,075 g
magneesiumkloriidheksahüdraat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
raud(II)kloriidtetrahüdraat, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
resasuriin (hapniku indikaator)	0,001 g
naatriumsulfiidnonahüdraat, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
mikroelementide põhilahus (soovi korral, punkt 18)	10 ml
lisada hapnikuvaba vett (punkt 15)	kuni 1 liitri

*Märkus:* kasutada tuleks värskest tarnitud naatriumsulfiidi või see peaks olema pestud ja enne kasutamist kuivatatud, et tagada piisav taandamisvõime. Katse võib teha ilma kindakappi kasutamata (vt punkt 26). Sel juhul peaks naatriumsulfiidi lõppkontsentratsioon katsekeskkonnas olema suurem, 0,20 g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  liitris. Naatriumsulfiidi võib lisada ka sobiva anaeroobse põhilahusena läbi suletud katsenõu membraani, kuna see vähendab oksüdeerumisohtu. Naatriumsulfiidi võib asendada titaan(III)tsitraadiga, mida lisatakse läbi suletud katsenõu membraani lõppkontsentratsioonini 0,8–1,0 mmol/l. Titaan(III)tsitraat on väga tõhus ja vähemürgeine taandav reagent, mis valmistatakse järgmiselt: lahustakse 2,94 g trinaatriumsitraatdihüdraati 50 ml hapnikuvabas vees (saadakse kontsentratsioon 200 mmol/l) ja lisatakse 5 ml 15 % (mass/maht) titaan(III)kloriidi lahust; lahuse pH viiakse leeliselega  $7 \pm 0,2$  juurde ja lahus viiakse lämmastikujoo all sobivasse nõusse; titaan(III)tsitraadi kontsentratsioon sellises põhilahuses on 164 mmol/l.

17. Katsekeskkonna komponendid, välja arvatud taandaja (naatriumsulfiid, titaantsitraat) segatakse ja lahusest puhutakse vahetult enne kasutamist läbi gaasilist lämmastikku umbes 20 minutit, et eemaldada hapnik. Seejärel lisatakse sobiv kogus värskest valmistatud taandaja lahust (valmistatud hapnikuvabas vees) vahetult enne katsekeskkonna kasutamist. Katsekeskkonna pH viiakse vajaduse korral lahjendatud mineraalse happe või leelise abil  $7 \pm 0,2$  peale.



**▼ M6****Mikroelementide põhilahus (soovi korral)**

18. On soovitatav, et kasvukeskkond sisaldaks järgmisi mikroelemente, kuna see tõhustab anaeroobse lagunemise protsesse, eriti kui kasutatakse madalat inokulumi kontsentratsiooni (nt 1 g/l) (11).

mangaankloriidtetrahüdraat, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mg
boorhape, $\text{H}_3\text{BO}_3$	5 mg
tsinkkloriid, $\text{ZnCl}_2$	5 mg
vask(II)kloriid, $\text{CuCl}_2$	3 mg
dinaatriummolibdaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg
koobaltkloriidheksahüdraat, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg
nikkelkloriidheksahüdraat, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg
dinaatriumselenit, $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	5 mg
lisada hapnikuvaba vett (punkt 15)	kuni 1 liitri

**Uuritav aine**

19. Uuritav aine lisatakse põhilahuse, suspensiooni või emulsioonina või otse tahke aine või vedelikuna või adsorbeerituna klaaskiudfiltrile, nii et lõppkontsentratsioon ei ületaks 100 mg orgaanilist süsinikku liitris. Kui kasutatakse põhilahust, tehakse sobiv lahus vees (punkt 15) (mis on enne gaasilise lämmastiku läbipuhumisega hapnikust vabastatud) sellise kontsentratsiooniga, et lisatav ruumala ei suurendaks reaktsioonisegu koguruumala rohkem kui 5 %. Põhilahuse pH viiakse vajaduse korral  $7 \pm 0,2$  peale. Kui aine ei ole vees piisavalt lahustuv, tuleb järgida standardit ISO 10634 (13). Lahusti kasutamise korral tehakse täiendav kontroll, milles inokuleeritud kasvukeskkonnale lisatakse ainult lahustit. Orgaanilisi lahusteid nagu kloroform ja süsiniktetrakloriid, mis teadaolevalt takistavad metaani vabanemist, tuleks vältida.

Hoiatus: ettevaatlikult tuleb käsitseda mürgiseid aineid ja aineid, mille omadused ei ole teada.

**Võrdlusained**

20. Võrdlusaineid nagu naatriumbensoaat, fenool ja polüetüleenglükool 400 on edukalt kasutatud meetodi õige rakendamise kontrollimiseks; 60 päevaga toimub nendel ainetel biolagunemine enam kui 60 % ulatuses. Valmistatakse valitud võrdlusaine põhilahus (hapnikust vabastatud vees) samal viisil kui uuritava aine korral ning kui see on vajalik, reguleeritakse pH väärtuseni  $7 \pm 0,2$ .

**Inhibeerimise kontroll (tingimisi vajalik)**

21. Selleks et valida kõige sobivam kontsentratsioon katse jaoks, tuleb hankida teavet uuritava aine mürgisuse kohta anaeroobsetele mikroorganismidele; selleks lisatakse uuritavat ainet ja võrdlusainet katsekeskkonnaga (vt punkt 16) nõusse kumbagi samas kontsentratsioonis kui eespool lisatud (vt punktid 19 ja 20 ning ISO 13641-1 (12)).

▼ **M6****Läbikäärinud muda**

22. Kogutakse läbikäärinud muda reoveepuhasti käärimistankist, milles peamiselt töödeldakse olmereovett. Muda tuleks täielikult iseloomustada ja esitada muda kohta taustteave (vt punkt 54). Kui kasutatakse kohandatud inokulumit, võib kaaluda tööstusettevõtte reoveepuhasti läbikäärinud muda kasutamist. Läbikäärinud muda võtmiseks kasutatakse laia kaelaga pudeleid, mis võivad venida, näiteks kõrgtihedast polüetüleenist vms materjalist pudeleid. Pudel täidetakse mudaga kuni umbes 1 cm-ni ülemisest servast, ja suletakse õhukindlalt, eelistatav on kaitseventiiliga kork. Pärast laborisse toomist võib võetud muda kohe kasutada või panna see laboratoorsesse kääritustanki. Biogaasi ülerõhku tuleb pudelite ettevaatliku avamisega välja lasta. Teise võimalusena võib inokulumiallikana kasutada laboris kasvatatud anaeroobset muda, kuid selle aktiivsuse spekter võib olla väiksem.

Hoiatus: läbikäärinud mudast vabaneb süttivaid gaase, mis tekitab tulekahju- ja plahvatusohtu; samuti võib see sisaldada patogeenseid organisme, seepärast tuleb reoveemuda käsitsemisel olla ettevaatlik. Ohutusega seotud põhjustel ei kasutata muda võtmiseks klaasnõusid.

23. Mudast taustgaaside vabanemise ja tühikatsete mõju vähendamiseks võib kaaluda muda eelnevat kääritamist. Kui on vajalik eelkääritamine, tuleks mudal lasta ilma toitainete või substraatide lisamiseta käärida  $35 \pm 2$  °C kuni 7 päeva. On leitud, et umbes 5-päevane eelkääritamine annab tühikatsetest gaasi vabanemise puhul optimaalse tulemuse, ilma et liiga palju pikeneks oote- või inkubatsiooniperiood katsefaasi jooksul või väheneks aktiivsus selle väikse arvu ainete suhtes, mida on uuritud.
24. Kui uuritav aine on – või eeldatavalt on – halvasti biolagundatav, võib kaaluda muda eelnevat kokkupuutesse viimist uuritava ainega, et saada paremini kohanenud inokulum. Sellisel juhul lisatakse läbikääritatud mudale uuritavat ainet orgaanilise süsiniku sisalduseni 5–20 mg/l ja inkubeeritakse kuni 2 nädalat. Eelnevalt kokkupuutes olnud aktiivmuda pestakse hoolikalt enne kasutamist (vt punkt 25) ning katseprotokollis kirjeldatakse eelneva kokkupuute puhul kasutatud tingimusi.

**Inokulum**

25. Aktiivmuda pestakse (vt punktid 22–24) vahetult enne kasutamist, et vähendada anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon alla 10 mg/l lõplikus katesuspensioonis. Muda tsentrifugeeritakse suletud topsides (nt 3 000 g 5 minuti jooksul) ja supernatant visatakse ära. Sade tsentrifugeeritakse põhjas suspensioonist hõljuvaks keskkonnas (punktid 16 ja 17), suspensioon tsentrifugeeritakse uuesti ja supernatant visatakse jälle ära. Kui anorgaanilise süsiniku sisaldus ei ole veel piisavalt vähenenud, võib muda pesemist korrata kuni kaks korda. Näib, et mikroorganismidele see halvasti ei mõju. Lõpuks suspensioonist saadud sade vajalikus koguses katsekeskkonnas ja määratakse tahkete osakeste üldsisaldus [vt näiteks ISO 11923 (15)]. Tahkete osakeste lõplik kontsentratsioon katsenõus peaks olema vahemikus 1–3 g/l (või ligikaudu 10 % lahjendamata läbikääritatud muda kontsentratsioonist). Eespool nimetatud toimingud tuleb teha nii, et muda kokkupuude hapnikuga oleks minimaalne (võib töötada näiteks lämmastiku atmosfääris).

▼ **M6****KATSE KÄIK**

26. Järgmiste ettevalmistavate tööde puhul tuleb läbikäritatud muda ja hapniku kokkupuude viia praktiliselt võimaliku miinimumini, näiteks on võib-olla vajalik töötada kindakapis lämmastiku atmosfääris ja/või puhuda pudelitest läbi lämmastikku (4).

**Uuringukatsete ja kontrollkatsete ettevalmistamine**

27. Valmistage ette katsenõud vähemalt kolme paralleelkatse jaoks (vt punkt 13-b) uuritava ainega, tühikatsetega, võrdlusainega, inhibeerimise kontrollkatsetega (tingimuslik) ja rõhukontrolli kambritega (soovituslik) (vt punktid 7 ja 19–21). Ette võib valmistada ka täiendavad nõud primaarse biolagundatavuse hindamiseks uuritava aine spetsiifilise määramise teel. Sama tühikatsete komplekti võib kasutada mitme uuritava aine puhul ühes ja samas katses, kui vabaruumi mahud on ühesugused.
28. Valmistage ette lahjendatud inokulum, enne kui hakkate seda lisama katsenõudesse, näiteks laiaotsalise pipeti abil. Lisage hästi segatud inokulumi alikvoodid (punkt 25), nii et tahkete osakeste üldkontsentratsioon oleks kõikides nõudes ühesugune (vahemikus 1–3 g/l). Lisage uuritava aine ja võrdlusaine põhilahused pärast seda, kui olete vajaduse korral korrigeerinud pH väärtuseni  $7 \pm 0,2$ . Uuritav aine ja võrdlusaine tuleb lisada kõige asjakohasema manustamismeetodiga (punkt 19).
29. Orgaanilise süsiniku kontsentratsioon katses peaks tavaliselt olema vahemikus 20–100 mg/l (punkt 4). Kui uuritav aine on mürgine, tuleks vähendada selle kontsentratsioon katses väärtuseni 20 mg C/l või isegi alla selle, kui mõõdetakse primaarset biolagunemist konkreetse aine spetsiifilise analüüsiga. Tuleks märkida, et madalamal uuritava aine kontsentratsioonil katse tulemuste varieeruvus suureneb.
30. Tühikatsenõudesse lisage uuritava aine põhilahuse, suspensiooni või emulsiooni asemel samasugused kogused vastavat vedelikku, mida kasutati uuritava aine lisamiseks. Kui uuritav aine lisati klaaskiudfiltri või orgaanilise lahusti kasutamisega, lisage tühikatsenõudesse filter või samasugune kogus lahustit, mis aurustati. Valmistage lisaks ette eraldi paralleelkatsed uuritava ainega pH väärtuse mõõtmiseks. Korrigeerige pH  $7 \pm 0,2$ -ni, lisades vajaduse korral väikese koguse lahjendatud mineraalhapest või leelist. Ühesugused kogused pH neutraliseerimiseks kasutatud ainet tuleks lisada kõikidesse nõudesse. Sellised pH korrigeerimised ei peaks olema vajalikud, kuna uuritava aine ja võrdlusaine põhilahuste pH on juba seatud neutraalseks (vt punktid 19 ja 20). Kui tuleb mõõta primaarset biolagunemist, tuleks sobiv proov võtta pH kontrollimise nõust või täiendavast katsenõust ja määrata selles uuritava aine sisaldus spetsiifilise analüüsiga. Kõikidesse nõudesse võib lisada kaetud magnetid (magnetpulgad), kui reaktsioonisegu on vaja segada (ei ole kohustuslik).
31. Hoolitsege selle eest, et vedeliku üldruumala  $V_1$  ja vabaruumi ruumala  $V_h$  oleks kõigis nõudes ühesugused; määrake  $V_1$  ja  $V_h$  ning märkige need üles. Iga nõu tuleks sulgeda gaasimembraaniga ja viia kindakapist (vt punkt 26) üle inkubaatorisse (vt punkt 13-a).

**▼ M6****Lahustumatu uuritav aine**

32. Veos halvasti lahustuva aine kaalutud kogus lisage otse ettevalmistatud nõusse. Kui on vaja kasutada lahustit (vt punkt 19), viige uuritava aine lahus või suspensioon tühjadesse nõudesse. Võimaluse korral aurustage lahusti lämmastiku läbijuhtimisega ja seejärel lisage vajalikud kogused ülejäänud koostisaineid, nimelt lahjendatud muda (punkt 25) ja hapnikuvaba vett. Tuleks ette näha ka täiendav lahusti kontrollkatse (vt punkt 19). Lahustumatu aine lisamise muude meetodite kohta vt ISO 10634 (13). Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida süstlaga täielikult ettevalmistatud ja suletud nõudesse, kui eeldatakse, et pH lähteväärtus ei ületa  $7 \pm 1$ , muul juhul doseerige nii, nagu eespool kirjeldatud (vt punkt 19).

**Inkubeerimine ja gaasi rõhu mõõtmised**

33. Ettevalmistatud nõusid inkubeerige umbes 1 tund temperatuuril  $35 \pm 2$  °C, et toimuks tasakaalustumine ja liigne gaas eralduks atmosfääri; selleks loksutage järjekorras iga nõu, torgake rõhumõõtmiseadme (punkt 13-c) nõel läbi membraani ja avage kraan, kuni manomeeter näitab 0-rõhku. Kui selles staadiumis või vahepealsete mõõtmiste tegemisel on rõhk vabaruumis atmosfääri rõhust madalam, tuleks lisada gaasilist lämmastikku, et rõhk oleks võrdne atmosfääri rõhuga. Sulgege kraan (vt punkt 13-c) ja jätkake inkubeerimist pimedas nii, et kõigi nõude kõik osad oleksid kääritamistemperatuuri juures. Jälgige nõusid pärast inkubeerimist 24–48 tundi. Jätke katsest välja kõik nõud, mille supernatantvedelik värvub selgelt roosaks, mis tähendab, et resasuriin (vt punkt 16) on muutnud värvi, mis näitab hapniku juuresolekut (vt punkt 50). Väikest hapnikukogust võib süsteem taluda, kuid suurem hapniku kontsentratsioon võib oluliselt pärssida anaeroobset biolagundamist. Kolmest paralleelkatsest ühe üksiku nõu väljajätmine on lubatav, kuid kui selliseid nõusid on rohkem, tuleb katse tegemise korraldus läbi vaadata ja katset korrata.
34. Segage või loksutage iga nõu sisu hoolikalt mõne minuti jooksul vähemalt 2 või 3 korda nädalas ja natuke aega enne iga rõhumõõtmist. Loksutamine viib inokulumi uuesti suspensiooni ja tagab gaaside tasakaalu. Kõik rõhu mõõtmised tuleb teha kiiresti, sest kui mõõtmise ajal temperatuur langeb, saadakse vale näit. Rõhu mõõtmise ajal tuleks kogu katsenõud, kaasa arvatud vabaruum, hoida kääritamistemperatuuril. Mõõtte gaasi rõhk näiteks nii, et surute rõhumõõtmiseadmega ühendatud süstla nõela (punkt 13-c) läbi membraani. Tuleks olla hoolikas, et vältida vee sattumist süstlanõela sisse; kui selline asi juhtub, tuleb märjaks saanud osad kuivatada ja panna süstla otsa uus nõel. Rõhk tuleks mõõta millibaarides (vt punkt 42). Gaasi rõhku nõus võib mõõta perioodiliselt, näiteks kord nädalas, ja soovi korral võib liigse gaasi lasta atmosfääri. Teine võimalus on mõõta rõhk ainult katse lõpul, et määrata moodustunud biogaasi kogus.
35. Soovitav on gaasi rõhku mõõta vahepeal, kuna rõhu suurenemine võimaldab hinnata, millal võib katse lõpetada ja nii saab jälgida ka biolagunemise kineetikat (vt punkt 6).

▼ **M6**

36. Tavaliselt lõpetatakse katse pärast 60-päevast inkubeerimist, kui rõhu mõõtmisest leitud biolagunemise kõver ei ole juba enne seda platoole jõudnud; platoofaas on faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks. Kui platoo väärtus on väiksem kui 60 %, on tulemust raske tõlgendada, kuna see näitab, et ainult osa molekulist on mineraliseeritud või et on tehtud viga. Kui tavalise inkubeerimisaja lõpus gaasi üha tekib ja platoofaasi ilmselt ei ole saavutatud, tuleks kaaluda katse pikendamist, et kontrollida, kas saavutatakse platoo väärtus (> 60 %).

**Anorgaanilise süsiniku mõõtmine**

37. Pärast viimast gaasi rõhu mõõtmist katse lõpus laske mudal settida. Avage järjest iga nõu ja võtke kohe proov anorgaanilise süsiniku (IC) kontsentratsiooni (mg/l) määramiseks supernatantvedelikus. Supernatantvedelikku ei tohiks tseentrifugida ega filtrida, kuna sellele kaasneks lubamatu lahustunud süsinikdioksiidi kadu. Kui vedelikku ei saa analüüsida kohe proovi võtmise ajal, võite säilitada proovi ilma vabaruumita suletud viaalis kuni kaks päeva temperatuuril 4 °C. Pärast anorgaanilise süsiniku mõõtmist mõõdetakse ja registreeritakse pH väärtus.
38. Teise võimalusena võib anorgaanilise süsiniku supernatandis määrata kaudselt lahustunud anorgaanilise süsiniku ehk süsinikdioksiidi vabanemise kaudu, mille saab mõõta vabaruumis. Pärast viimast gaasi rõhu mõõtmist reguleeritakse rõhk igas katseanumas atmosfäärirõhule. Iga nõu sisu hapustatakse ligikaudu pH 1-ni kontseentreeritud mineraalhappe (nt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) lisamisega läbi suletud nõu membraani. Loksutatud nõusid inkubeeritakse temperatuuril 35 ± 2 °C umbes 24 tundi ja mõõdetakse rõhumõõtjaga gaasi rõhk, mis on tekkinud süsinikdioksiidi vabanemise tõttu.
39. Samasugused lugemid võetakse ka vastavate tühikatsete, võrdlusaine ja inhibeerimise kontrollnõu (kui seda kasutati) puhul (vt punkt 21).
40. Mõnel juhul, eriti kui samu kontrollkatsenõusid kasutatakse mitme uuritava aine puhul, tuleks mõelda vahepealsele anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mõõtmisele nii katse- kui ka kontrollkatsenõudes, kui see on asjakohane. Sellisel juhul tuleb ette valmistada piisaval arvul nõusid, et jätkuks ka kõigi vahepealsete mõõtmiste jaoks. Selline meetod on eelistatav kõikide proovide võtmisele ainult ühest nõust. Viimast võib teha ainult siis, kui lahustunud anorgaanilise süsiniku määramiseks vajalikku proovi mahtu ei peeta liiga suureks. Lahustunud anorgaaniline süsinik tuleks määrata pärast gaasi rõhu mõõtmist ilma liigset gaasi välja laskmata, nagu on kirjeldatud allpool:
- võtke süstla abil läbi membraani ilma nõu avamata võimalikult väiksemahuline proov supernatandist ja määrake proovis anorgaaniline süsinik;
  - pärast proovi võtmist lastakse liigne gaas välja või ei lasta;
  - tuleks võtta arvesse, et isegi väike supernatandi koguse vähenemine (nt 1 %) võib oluliselt suurendada vabaruumis oleva gaasi ruumala (V<sub>h</sub>);
  - võrranditesse (vt punkt 44) viiakse vajaduse korral sisse parandid, millega arvestatakse V<sub>h</sub> suurenemist võrrandis 3.

**▼ M6****Spetsiifilised analüüsid**

41. Kui on vaja määrata primaarset anaeroobset lagunemist (vt punkt 30), võtke vajaliku mahuga proov uuritava ainega nõust katse alguses ja lõpus. Kui te seda teete, siis pange tähele, et vabaruumi ja vedelikufaasi ruumalad, vastavalt  $V_h$  ja  $V_l$ , muutuvad ning seda tuleb võtta arvesse gaasi tekkimise tulemuste arutamisel. Teise võimalusena võib proove konkreetse aine määramiseks võtta täiendavatest katsesegudest, mis on selleks eelnevalt ette nähtud (punkt 30).

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

42. Praktilistel põhjustel mõõdetakse gaasi rõhku millibaarides ( $1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^2 \text{ Pa}$ ;  $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$ ), mahtusid liitrites ja temperatuuri Celsiuse kraadides.

**Süsinik vabaruumis**

43. Kuna nii 1 mool metaani kui ka üks mool süsinikdioksiidi sisaldab kumbki 12 g süsinikku, võib süsiniku massi tekkinud gaasis väljendada järgmiselt:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Võrrand 1}$$

kus:

$m$  = süsiniku mass (mg) vabanenud gaasi teatavas ruumalas;

12 = süsiniku suhteline aatommass;

$n$  = gaasi moolide arv antud ruumalas.

Kui olulistest kogustes tekib muid gaase peale metaani või süsinikdioksiidi (nt  $\text{N}_2\text{O}$ ), tuleb võrrandit 1 muuta, et kirjeldada tekkinud gaaside võimalikku mõju.

44. Gaaside seadustest võib  $n$  väljendada järgmiselt:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Võrrand 2}$$

kus:

$p$  = gaasi rõhk (paskalites);

$V$  = gaasi ruumala ( $\text{m}^3$ );

$R$  = universaalne gaasikonstant [8,314 J/(mol K)]

$T$  = inkubeerimistemperatuur (kelvinites).

Ühendame võrrandid 1 ja 2 ning võtame arvesse ka tühikatses vabaneva gaasi:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Võrrand 3}$$

kus:

$m_h$  = gaasina vabaruumis oleva puhta süsiniku mass (mg);

$\Delta p$  = esialgse ja lõpliku gaasirõhu vahe keskmine, millest on lahutatud vastav tühikatsenõude keskmine (millibaarides);

▼ **M6**

$V_h$  = vabaruumi maht nõus (l);

0,1 = tegur, millega teisendatakse njuuton/m<sup>2</sup> millibaarideks ja m<sup>3</sup> liitriteks.

Võrrandit 4 tuleks kasutada tavapärase inkubeerimise puhul temperatuuril 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Võrrand 4}$$

*Märkus:* Alternatiivne mahu arvutamine. Rõhumõõtja näidud teisendatakse vabanenud gaasi milliliitriteks, kasutades standardkõverat, mis saadakse sissesüstitud ruumala (ml) ja vastavate rõhumõõtja näitude kandmisega graafikule (2. liide). Gaasi moolide arv (n) iga nõu vabaruumis arvutatakse nii, et kumulatiivne vabanenud gaasi ruumala (ml) jagatakse teguriga 25 286 ml/mol, mis on ühe mooli gaasi poolt enda alla võetav ruumala 35 °C juures atmosfäärirõhul. Kuna 1 mool CH<sub>4</sub> ja 1 mool CO<sub>2</sub> sisaldab kumbki 12 g süsinikku, on süsiniku mass (mg) vabaruumis ( $m_h$ ) leitav võrrandiga 5:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Võrrand 5}$$

Tühikatsede tulemuste arvessevõtmine, et arvestada gaasi tekkimist tühikatses:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad \text{Võrrand 6}$$

kus:

$m_h$  = gaasina vabaruumis oleva puhta süsiniku mass (mg);

$\Delta V$  = uuritava ainega katsenõude ja tühikatsenõude vabaruumis oleva gaasi ruumala erinevuste keskväärtsus;

25286 = ruumala, mille võtab enda alla 1 mool gaasi temperatuuril 35 °C ja rõhul 1 atmosfäär.

45. Biolagundamise käiku võib vajaduse korral jälgida kumuleeritud rõhu kasvu järgi, pannes graafikule  $Dp$  (millibaarides) sõltuvana ajast. Saadud kõvera abil tehakse kindlaks ootefaasi pikkus (päevades), mis kantakse protokollile. Ootefaas on aeg katse algusest kuni olulise lagunemise alguseni (vt näide, 3. liide). Kui supernatandist on võetud ja analüüsitud vahepealseid proove (vt punktid 40, 46 ja 47), võib kumulatiivse rõhu asemel panna graafikule vabanenud üldsüsiniku (gaasi- ja vedelfaasis).

#### Süsinik vedelfaasis

46. Metaani kogust vedelfaasis ignoreeritakse, kuna selle lahustuvus vees on teatavasti väga vähene. Anorgaanilise süsiniku mass katsenõude vedelfaasis arvutatakse võrrandi 7 järgi:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Võrrand 7}$$

kus:

$m_l$  = anorgaanilise süsiniku mass (mg) vedelfaasis;

$C_{net}$  = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon (mg/l) katseanumates, millest on lahutatud kontsentratsioon kontrollnõudes katse lõpul;

$V_l$  = vedeliku maht nõus (l);

**▼M6****Gaasistatud süsiniku kogusisaldus**

47. Gaasistatud süsiniku kogumass katsenõus arvutatakse võrrandi 8 järgi:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Võrrand 8}$$

kus:

 $m_t$  = gaasistatud süsiniku kogumass (mg); $m_h$  ja  $m_l$  on defineeritud eespool.**Uuritava aine süsinik**

48. Uuritavast ainest saadud süsiniku mass katsenõus arvutatakse võrrandi 9 järgi:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Võrrand 9}$$

kus:

 $m_v$  = uuritavast ainest saadud süsiniku mass (mg); $C_c$  = uuritavast ainest saadud süsiniku kontsentratsioon (mg/l) katsenõus $V_l$  = vedeliku maht katsenõus (l).**Biolagunemise määr**

49. Biolagunemise protsent arvutatakse vabaruumis olevast gaasist võrrandi 10 järgi ja üldise biolagunemise protsent võrrandi 11 järgi:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Võrrand 10}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Võrrand 11}$$

kus:

 $D_h$  = biolagunemise protsent vabaruumis oleva gaasikoguse järgi; $D_t$  = summaarne biolagunemine (%); $m_h$ ,  $m_v$  ja  $m_t$  on defineeritud eespool.

Primaarse biolagunemise määr arvutatakse uuritava aine kontsentratsiooni mõõtmisest (soovi korral) inkubeerimise alguses ja lõpus võrrandi 12 järgi:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Võrrand 12}$$

kus:

 $D_p$  = uuritava aine primaarse biolagunemise protsent; $S_i$  = uuritava aine lähtekontsentratsioon (mg/l) $S_e$  = uuritava aine kontsentratsioon katse lõpus (mg/l).

Kui analüüs näitab uuritava aine olulist kontsentratsiooni anaeroobse muda muutmata inokulumis, tuleb kasutada võrrandit 13:



**▼ M6**

$$D_p^I = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Võrrand 13}$$

kus:

$D_p^I$  = uuritava aine primaarse biolagunemise parandatud protsent;

$S_{ib}$  = uuritava aine „näiline” lähtekontsentratsioon (mg/l);

$S_{eb}$  = uuritava aine „näiline” lõppkontsentratsioon (mg/l) tühikatsetes.

**Tulemuste nõuetekohasus**

50. Tuleks kasutada ainult selliste nõude rõhu mõõtmise tulemusi, milles ei ole märgata roosat värvust (vt punkt 33). Anaeroobse käitlemise meetodite nõuetekohane kasutamine viib hapnikuga saastumise miinimumini.
51. Katse võib lugeda nõuetekohaseks ainult juhul, kui võrdlusaine jõuab platooni, mis vastab enam kui 60 % biolagunemisele <sup>(1)</sup>.
52. Kui pH katse lõpus oli läinud välja vahemikust  $7 \pm 1$  ja biolagunemine oli ebapiisav, tuleb katset korrata katsekeskkonnaga, mille puhvermahtuvus on suurem.

**Lagunemise pärssimine**

53. Gaasi vabanemine nõudes, milles on nii uuritav aine kui ka võrdlusaine, peaks olema vähemalt sama suur kui nõudes, mis sisaldavad ainult võrdlusainet; vastasel korral on tegemist gaasi tekke pärssimisega. Mõnel juhul on gaasi vabanemine uuritava ainega, kuid ilma võrdlusaineta nõus väiksem kui tühikatse kontrollnõus, mis näitab, et uuritaval ainel on inhibeeriv mõju.

**Katseprotokoll**

54. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

*Uuritav aine:*

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava aine puhtusaste (lisandid).

*Katsetingimused:*

- lahjendatud kääritusnõuvedeliku maht ( $V_l$ ) ja nõu vabaruumi maht ( $V_h$ );
- katsenõude kirjeldus, biogaasi määramise kirjeldus (näiteks rõhumõõtja tüüp) ja anorgaanilise süsiniku analüsaatori kirjeldus;
- uuritava aine ja võrdlusaine lisamine katsesüsteemi: katses kasutatud kontsentratsioon ja lahustite kasutamine;
- andmed kasutatud inokulumi kohta: reoveepuhasti nimi, reoveepuhasti kirjeldus (nt töotemperatuur, muda retentsiooniaeg, peamiselt olmereovesi jne), kontsentratsioon, igasugune teave, mis on vajalik selle põhjendamiseks ja teave inokulumi eeltöötlemise kohta (nt eelkäiritamine, eelnevasse kokkupuutesse viimine);
- inkubatsioonitemperatuur;
- paralleelkatsete arv.

<sup>(1)</sup> Seda tuleks uuesti hinnata, kui võrdlusainete hulgas on adsorbeerumisele kalduvaid või lahustumatuid aineid.

▼ **M6***Tulemused:*

- pH ja anorgaanilise süsiniku sisaldus katse lõpus;
- uuritava aine kontsentratsioon katse alguses ja lõpus, kui mõõdeti konkreetset ainet;
- kõik andmed, mis mõõdeti uuritava aine katses, tühikatses, võrdlusaine katses ja vajaduse korral inhibeerimise kontrollnõudes (nt rõhk millibaa-rides, anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon (mg/l)) tabeli kujul (eraldi tuleb esitada vabaruumis ja vedelikus mõõdetud andmed);
- andmete statistiline analüüs, katse kestus ja biolagunemise kõver uuritava aine ja võrdlusaine ning inhibeerimise kontrollkatsete korral;
- uuritava aine ja võrdlusaine biolagunemise protsent;
- iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;
- tulemuste arutelu.

## KIRJANDUS

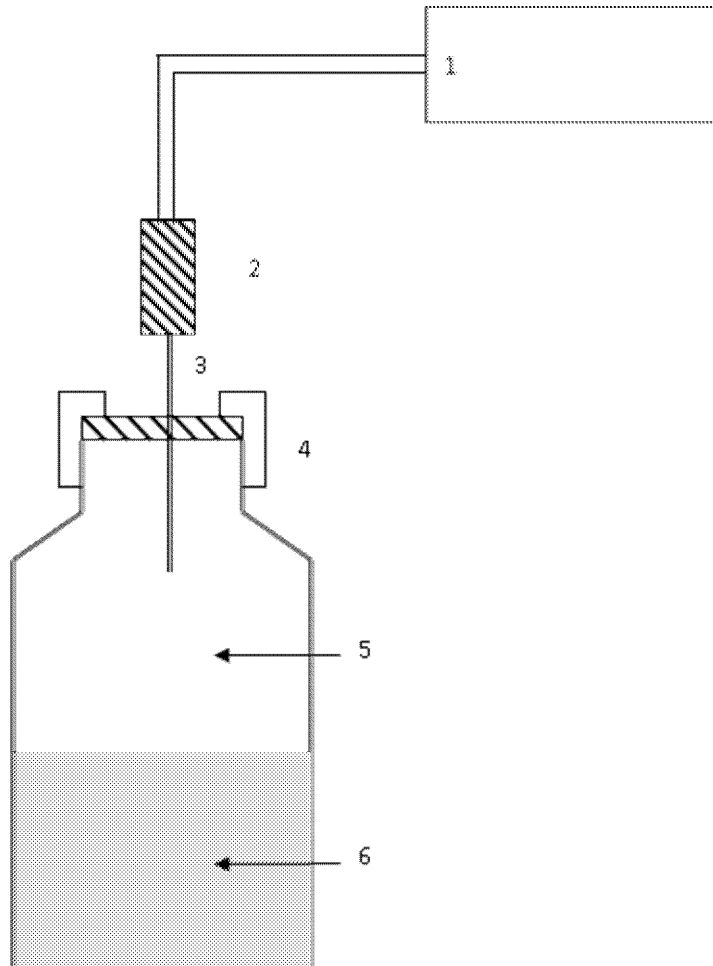
- (1) Käesoleva lisa järgmised peatükid:
  - C.4, Kohese biolagunduvuse määramine;
  - C.9, Biodegradatsioon – Zahni-Wellensi test;
  - C.10, Reovee aeroobse töötlemise simulatsioonikatse:
    - A: aktiivmuda, B: biokiled
  - C.11, Biodegradatsioon – aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* **19**, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, **47**, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* **13**, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, **17**, 2441-2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

**▼ M6**

- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
- (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
- (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6**

1. liide

**Näidisseade biogaasi tootmise mõõtmiseks gaasi rõhu järgi***Selgitus:*

- 1 – rõhumõõtur
- 2 – gaasipidav 3-käiguline kraan
- 3 – süstlanõel
- 4 – gaasi mitte läbilaskev sulgur (valtsitav rõngaskork ja membraan)
- 5 – vabaruum ( $V_h$ )
- 6 – läbikääratud muda inokulum ( $V_l$ )

Katsenõusid inkubeeritakse temperatuuril  $35 \pm 2$  °C

**▼ M6**

## 2. liide

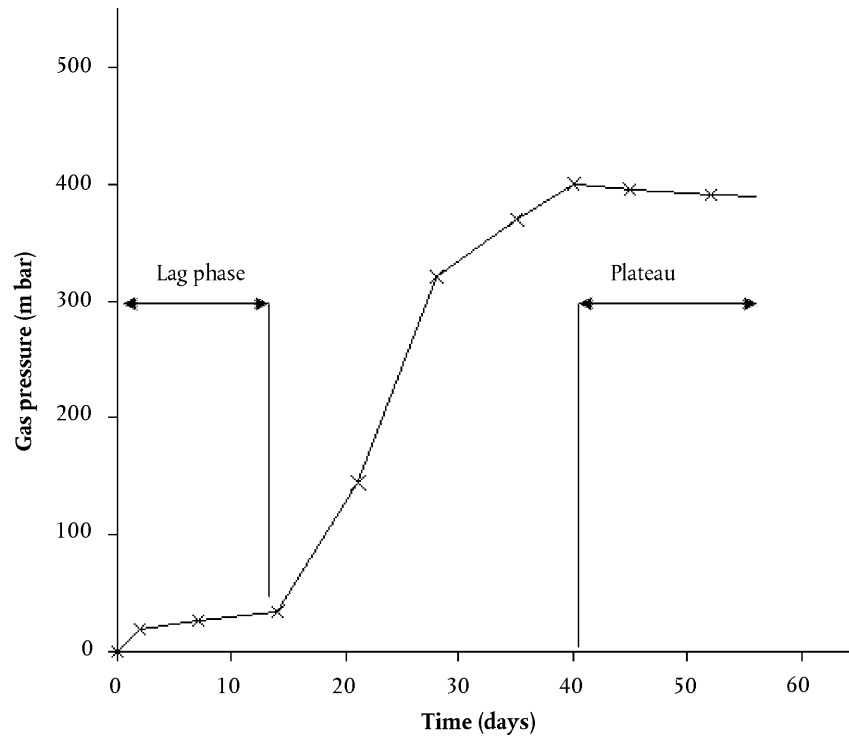
**Rõhumõõtori näitude teisendamine**

Rõhumõõtori näitusid võib gaasi ruumalaga siduda standardkõvera abil, mis saadakse teadaoleva ruumalaga õhukoguste süstimisega  $35 \pm 2$  °C juures seerumipudelitesse, milles on reaktsioonisegu ruumalaga  $V_R$  võrdne kogus vett:

- viiesse seerumipudelis, mida on hoitud temperatuuril  $35 \pm 2$  °C, viiakse vee alikvoodid ruumalaga  $V_R$  ml. Pudelid suletakse ja pannakse veevanni  $35$  °C juurde 1 tunniks tasakaalustuma;
- rõhumõõtur lülitatakse sisse, lastakse stabiliseeruda ja viiakse selle näit 0 peale;
- süstlanõel torgatakse läbi ühe nõu membraani, avatakse kraan, kuni rõhumõõtur näitab rõhku 0 ja suletakse siis kraan;
- sama korratakse ülejäänud pudelitega;
- igasse pudelisse süstitakse 1 ml õhku temperatuuriga  $35 \pm 2$  °C. Rõhumõõturiga ühendatud nõel surutakse läbi membraani ühte pudelisse ja lastakse rõhu näidul stabiliseeruda. Märgitakse rõhk üles, avatakse kraan, kuni rõhk on 0, ja seejärel kraan suletakse;
- sama korratakse ülejäänud pudelitega;
- kogu seda tegevust korratakse 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml õhuga;
- koostatakse kõver rõhunäitude (Pa) sõltuvuse kohta sissesüstitud gaasi mahust (ml). Mõõtori näidud on lineaarsed rõhu vahemikus 0–70 000 Pa ja vabanevad gaasi ruumala vahemikus 0–50 ml.

▼ **M6**

## 3. liide

**Lagunemiskõvera näide (kumulatiivne netorõhu suurenemine)**

## 4. Liide

## Anaeroobse biolagunemise katse näidisandmelehed – andmeleht uuritava aine kohta

Labor: ..... Uuritav aine: ..... Katse nr: .....

Katsetemperatuur, °C: ..... Vabaruumi maht ( $V_h$ ): .....(l) Vedelfaasi maht ( $V_1$ ): .....(l)Süsinikku uuritavas aines  $C_{c,v}$ : .....(mg/l)  $m_v$  <sup>(1)</sup>: .....(mg)

Päev	$p_1$ (katse) (mbar)	$p_2$ (katse) (mbar)	$p_3$ (katse) (mbar)	$p$ (katse) keskmise (mbar)	$p_4$ (tühikatse) (mbar)	$p_5$ (tühikatse) (mbar)	$p_6$ (tühikatse) (mbar)	$p$ (tühikatse) keskmise (mbar)	$p$ (neto) katse – tühi- katse keskmise (mbar)	$\Delta p$ (neto) kumulatiivne (mbar)	$m_h$ vabaruumi $C$ <sup>(2)</sup> (mg)	$D_h$ Biolagune- mine <sup>(3)</sup> (%)
	$C_{IC, 1}$ katse (mg)	$C_{IC, 2}$ katse (mg)	$C_{IC, 3}$ katse (mg)	$C_{IC}$ katse keskmise (mg)	$C_{IC, 4}$ tühikatse (mg)	$C_{IC, 5}$ tühikatse (mg)	$C_{IC, 6}$ tühikatse (mg)	$C_{IC}$ tühikatsete keskmise (mg)	$C_{IC, net}$ katse – tühi- katse keskmise (mg)	$m_1$ vedelfaasis $C$ <sup>(4)</sup> (mg)	$m_t$ kokku $C$ <sup>(5)</sup> (mg)	$D_t$ Biolagune- mine <sup>(6)</sup> (%)
Anorg. C (lõpp)												
pH (lõpp)												

<sup>(1)</sup> süsinikku katsenõus,  $m_v$  (mg):  $m_v = C_{c,v} \times V_1$ <sup>(2)</sup> Süsinikku vabaruumis,  $m_h$  (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C):  $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$ <sup>(3)</sup> Biolagunemine, mis on arvatud vabaruumis olevast gaasist,  $D_h$  (%):  $D_h = (m_h \times 100)/m_{c,v}$ <sup>(4)</sup> Süsinik vedelfaasis,  $m_1$  (mg):  $m_1 = C_{IC,net} \times V_1$ <sup>(5)</sup> Gaasistatud süsiniku kogusisaldus,  $m_t$  (mg):  $m_t = m_1 + m_v$ <sup>(6)</sup> Summaarne biolagunemine,  $D_t$  (%):  $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼ M6

Labor: ..... Võrdlusaine: ..... Katse nr: .....

Katsetemperatuur, °C: ..... Vabaruumi maht ( $V_h$ ): ..... Vedelfaasi maht ( $V_1$ ): .....(l)

Süsinikku võrdlusaines  $C_{c,v}$  (mg/l): .....  $m_v$  (1) (mg): .....

Päev	$p_1$ (võrdlus) (mbar)	$p_2$ (võrdlus) (mbar)	$p_3$ (võrdlus) (mbar)	$p$ (võrdlus) keskmise (mbar)	$p_4$ (inhib.) (mbar)	$p_5$ (inhib.) (mbar)	$p_6$ (inhib.) (mbar)	$p$ (inhib.) keskmise (mbar)	$p$ (võrdlus) võrdlusaine – tühikatse (mbar)	$\Delta p$ (võrdlus) kumulatiivne (mbar)	$m_h$ vabaruumi C (2) (mg)	$D_h$ Biolagune- mine (3) (%)
	$C_{IC, 1}$ võrdlusaine (mg)	$C_{IC, 2}$ võrdlusaine (mg)	$C_{IC, 3}$ võrdlusaine (mg)	$C_{IC}$ võrdlusaine keskmise (mg)	$C_{IC, 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 6}$ inhib. (mg)	$C_{IC}$ inhib. keskmise (mg)	$C_{IC, net}$ võrdlusaine – inhib. (mg)	$m_1$ vedelfaasis C (4) (mg)	$m_t$ kokku C (5) (mg)	$D_t$ Biolagune- mine (6) (%)
Anorg. C (lõpp)												
pH (lõpp)												

(1) Süsinikku katsendüs,  $m_v$  (mg):  $m_v = C_{c,v} \times V_1$   
(2) Süsinikku vabaruumis,  $m_h$  (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C):  $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$   
(3) Biolagunemine, mis on arvatud vabaruumis olevast gaasist,  $D_h$  (%):  $D_h = (m_h \times 100)/m_v$   
(4) Süsinikku vedelfaasis,  $m_1$  (mg):  $m_1 = C_{IC,net} \times V_1$   
(5) Gaasistatud süsiniku kogusisaldus,  $m_t$  (mg):  $m_t + m_1$   
(6) Summaarne biolagunemine,  $D_t$  (%):  $D_t = (m_t \times 100)/m_v$



▼ **M6****C.44. LEOSTUMINE MULLAKOLONNIS****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 312 (2004). Sünteetilised kemikaalid satuvad pinnasesse kas otse, teadliku pinnasesse viimisega (nt põllumajanduskemikaalid) või kaudselt (nt reovesi → reovee-sete → muld või õhk → märg- või kuivsadene). Selliste kemikaalide riskihindamiseks on oluline eelnevalt hinnata seda, kas need kemikaalid võivad mullas muunduda ning liikuda (leostuda) edasi mulla sügavamatesse kihtidesse ja lõpuks põhjavette.
2. Kemikaalide võimaliku mullas leostumise mõõtmiseks kontrollitud laboritingimustes on mitu meetodit, näiteks mulla õhukese kihi kromatograafia, mulla paksu kihi kromatograafia, mulla kolonnkromatograafia ning adsorptsiooni ja desorptsiooni mõõtmised (1, 2). Mitteioniseerunud kemikaalide korral võimaldab *n*-oktanol-vee jaotuskoeffitsient ( $P_{ow}$ ) varakult hinnata nende võimalikku adsorptsiooni ja leostumist (3, 4, 5).
3. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod põhineb häiritud mulla kolonnkromatograafial (mõisted vt 1. liide). Tehakse kahte tüüpi katseid, et määrata kontrollitud laboritingimustes i) uuritava kemikaali võimalik leostumine mullas, ja ii) kemikaali muundumissaaduste võimalik leostumine mullas (uuring vanandatud jääkidega)<sup>(1)</sup>. Katsemeetod põhineb olemasolevatel meetoditel (6, 7, 8, 9, 10, 11).
4. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sette valimist käsitlevas OECD tööühmas, mis tuli kokku Itaalias Belgirates 1995. aastal (12). Samuti andis tööühm soovitusi mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamise kohta leostumiskatsete puhul

**KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

5. Kolonnid, mis on valmistatud sobivast inertsest materjalist (nt klaas, roostevaba teras, alumiinium, teflon, polüvinüülkloriid jne), täidetakse mullaga ja seejärel küllastatakse ja tasakaalustatakse „kunstliku vihma” lahusega (mõiste vt 1. liide) ja nõrutatakse. Seejärel kantakse iga mullakolonna pinnale uuritavat kemikaali ja/või uuritava kemikaali vanandatud jääke. Seejärel hakatakse mullakolonna voolutama kunstliku vihmaga ja kogutakse nõrgvesi. Pärast leostamisprotsessi eemaldatakse muld kolonnist ja jagatakse sobivaks arvuks osadeks olenevalt sellest, millist teavet tahetakse saada. Iga mullasamba osa ja nõrgvett analüüsitakse uuritava kemikaali ja vajaduse korral muundumissaaduste või muude huvipakkuvate kemikaalide määramiseks.

**KATSEMEETODI KASUTATAVUS**

6. Katsemeetodit saab kasutada (mürgistamata või radioaktiivse märgisega, nt <sup>14</sup>C) uuritavate kemikaalide puhul, mille jaoks on olemas piisava täpsuse ja tundlikkusega määramismeetodid. Katsemeetodit ei kasutata kemikaalide puhul, mis lenduvad kergesti pinnasest ja veest ning mida seepärast ei jää selle katsemeetodi tingimustes mulda ega nõrgvette.

**ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

7. Mullakolonnis leostumise mõõtmiseks võib kasutada mürgistamata või radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali. Radioaktiivse märgisega ainet on vaja selleks, et uurida muundumissaaduste (vanandatud uuritava kemikaali jäägid)

<sup>(1)</sup> Taimekaitsevahendite kolonnis leostumise uuringud võivad anda teavet uuritava kemikaali ja selle muundumissaaduste liikuvuse kohta ja võivad täiendada partiiviisilisi sorptsiooni uuringuid.

▼ **M6**

leostumist ja määrata massibilanssi. Soovitatakse kasutada  $^{14}\text{C}$ -märgist, kuid muud isotoobid nagu  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  võivad samuti olla kasulikud. Kuivõrd see on võimalik, tuleks märgis paigutada molekuli kõige stabiilsema(te) osa(de) külge. Uuritava kemikaali puhtus peab olema vähemalt 95 %.

8. Enamik kemikaale tuleks peale kanda eraldi ainena. Taimekaitsevahendite koostises oleva toimeaine seostumise uurimiseks võib kasutada ka valmis-toodet, kuid uuritava kemikaali enda uurimine on eriti vajalik siis, kui segu tõenäoliselt mõjutab vabanemiskiirust (nt granuleeritud või toimeaine ohjatud eraldumisega tooted). Seoses konkreetset toodet arvestavate võimalike erinevustega katse korralduse suhtes võib olla kasulik pidada enne katse tegemist nõu reguleeriva asutusega. Vanandatud jääkide leostumise uuringu puhul tuleks kasutada puhast lähtekemikaali.

9. Enne mullakolonnis leostumise katse tegemist peaks uuritava aine kohta olema kogutud järgmine teave:

- (1) lahustuvus vees [katsemeetod A.6] (13);
- (2) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- (3) aururõhk [katsemeetod A.4] (13) ja/või Henry konstant;
- (4) jaotuskoeffitsient süsteemis *n*-oktanool-vesi [katsemeetodid A.8 ja A.24] (13);
- (5) adsorptsioonikoeffitsient ( $K_d$ ,  $K_f$  või  $K_{OC}$ ) [katsemeetodid C.18 ja/või C.19] (13);
- (6) hüdrolüüs [katsemeetod C.7] (13);
- (7) dissotsiatsioonikonstant ( $pK_a$ ) [OECD katsejuhend 112] (25);
- (8) aeroobne ja anaeroobne muundumine mullas [katsemeetod C.23] (13).

*Märkus:* Temperatuur, mille juures mõõtmised tehakse, tuleks esitada vastavas katseprotokollis.

10. Uuritava kemikaali kogus mullakolonnis peaks olema piisav, et võimaldada kindlaks teha vähemalt 0,5 % kasutatud kogusest igas mullasamba osas. Taimekaitsevahendi toimeaine puhul peaks pealekantava uuritava kemikaali kogus vastama suurimale soovitatud kasutamismääradele (üks kasutuskogus).

11. Kätesaadav peab olema sobiv teadaoleva mõõtetäpsuse, kordustäpsusega ja tundlikkusega analüüsimeetod uuritava kemikaali ning vajaduse korral selle muundumissaaduste määramiseks mullas ja nõrgvees. Uuritava kemikaali ja selle oluliste muundumissaaduste (tavaliselt vähemalt kõik muundumissaadused, mida on  $\geq 10$  % uuritava aine kogusest täheldatud muundumisteede uuringutes, kuid eelistatavalt kõik probleemsed muundumissaadused) analüüsi tuvastuspiir peaks olema teada (vt punkt 17).

**▼ M6****VÕRDLUSKEMIKAALID**

12. Tuleks kasutada võrdluskemikaale nagu atrasiin või monuroon, mis on väli-tingimustes teadaolevalt mõõdukad leostujad, ja hinnata uuritava kemikaali suhtelist liikuvust mullas nende suhtes (1, 8, 11). Vee liikumise jälgimiseks mullasambas võib kasutada mitte sorbeeruvat ja mitte lagundatavat polaarset võrdlusainet (nt tritium, bromiid, fluorestseiin, eosiin); see võib aidata ka kinnitada mullakolonna hüdrodünaamilisi omadusi.
13. Mullasamba osades ja nõrgvees leitud muundumissaaduste kirjeldamiseks ja/või kindlakstegemiseks kromatograafiliste, spektroskoopiliste või muude asjakohaste meetoditega võivad olla kasulikud ka analüüsi võrdluskemikaalid.

**MÕISTED JA ÜHIKUD**

14. Vt lisa 1.

**KVALITEEDIKRITERIUMID****Saagis**

15. Mullasamba osades ja kolonni nõrgvees leitud uuritava kemikaali protsendimäärade summa annab leostumiskatse saagise. Saagis peaks olema vahemikus 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (11) ja 70–110 % märgiseta kemikaalide puhul (8).

**Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

16. Uuritava kemikaali ja muundumissaaduste koguste määramise meetodi korratavust saab kontrollida nii, et ühte ja sama mullasamba osa või nõrgvett analüüsitakse kaks korda (vt punkt 11).
17. Uuritava kemikaali ja muundumissaaduste igas mullasamba osas või nõrgvees määramise analüütilise meetodi avastamispiir peaks olema vähemalt 0,01 mg/kg (uuritava kemikaalina) või 0,5 % lisatud kogusest igas mullasamba osas, olenevalt sellest, kumb on madalam. Kvantitatiivse koguse määramispiir tuleks samuti määrata.

**KATSEMEETODI KIRJELDUS****Katsesüsteem**

18. Katse tegemiseks kasutatakse leostumise uurimise kolonni (osadeks jagatavat või mitte), mis on valmistatud sobivast inertsest materjalist (nt klaas, roostevaba teras, alumiinium, teflon, polüvinüülkloriid jne), mille siseläbimõõt on vähemalt 4 cm ja kõrgus vähemalt 35 cm. Tuleks uurida kolonni materjali selles suhtes, ega sel ei ole mingit koostoimet uuritava kemikaali ega selle muundumissaadustega. Mõned näited osadeks jagatava ja mittejagatava kolonni kohta on esitatud 2. liites.
19. Mullatäidise panemiseks kolonni kasutatakse lusikat, varbkolbi ja vibratsiooniseadet.
20. Mullakolonna niisutamiseks kunstliku vihmaga kasutatakse kolb- või peristaltilist pumpa, dušiotsikut, Mariotte'i pudelit või lihtsat tilklehtrit.

**▼M6****Laboriseadmed ja kemikaalid**

21. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:
- (1) analüüsideadmed, nagu GLC-, HPLC- ja TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud detekteerimisadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta kemikaalide määramiseks või pööratud isotooplahjendusmeetodi kasutamiseks;
  - (2) seadmed identifitseerimise jaoks (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, TMR jne);
  - (3) vedelik-stsintillatsiooniloendaja radioaktiivse märgisega uuritava kemikaali puhul;
  - (4) oksüdeerija märgisega materjali põletamiseks;
  - (5) ekstraheerimiseseade (nt tsentrifuugiküvetid külmeekstraheerimiseks ja Soxhlet'i seade pidevekstraheerimiseks tagasijooksuga);
  - (6) seadmed lahuste ja ekstraktide kontsentreerimiseks (nt rotaatoraurusti).
22. Kasutatavad kemikaalid hõlmavad järgmist: orgaanilised lahustid, analüütiliselt puhtad, nt atsetoon, metanool jt; stsintillatsioonivedelik; 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahus destilleeritud või deioniseeritud vees (nn kunstlik vihm).

**Uuritav kemikaal**

23. Mullakolonnile kandmiseks tuleks uuritav kemikaal lahustada deioniseeritud või destilleeritud vees. Kui uuritav kemikaal on vees halvasti lahustuv, võib seda kolonnile kanda valmistootena (vajaduse korral pärast vees suspendeerimist või emulgeerimist) või mõnes orgaanilises lahustis. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit, peaks selle kogus olema minimaalne ning see tuleks mulla pinnalt aurustada enne kolonni voolutamise algust. Tahked tooted nagu graanulid tuleks kolonnile kanda tahkel kujul ilma veeta; toodet võib enne kasutamist segada väikse koguse (nt 1 g) kvartslivaga, et tagada selle ühtlasem jaotumine mullakolonna pinnal.
24. Uuritava kemikaali kogus mullakolonnis peaks olema piisav, et võimaldada kindlaks teha vähemalt 0,5 % kasutatud kogusest igas mullasamba osas. Taimekaitsevahendite toimeainete puhul võib lähtuda soovitatavast kasutamismäärast (üks kasutuskogus) ning nii lähteühendi kui ka vanandatud ühendi leostamine peab olema vastavuses kasutatava mullakolonna pindalaga <sup>(1)</sup>.

**Võrdluskemikaal**

25. Leostumiskatse tegemisel tuleks kasutada võrdluskemikaali (vt punkt 12). See tuleks kanda mullakolonna pinnale samal viisil kui uuritav kemikaal ja

<sup>(1)</sup> Koguse, mis tuleb kanda silindrilisele mullakolonnile, saab arvutada järgmise valemi abil:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

kus:

M = mullakolonnile kantav kogus [μg]

A = kasutamismäär [kg/ha]

d = mullakolonna diameeter [cm]

π = 3,14

▼ **M6**

sobival määral, mis võimaldab seda korralikult tuvastada kas samas mullakolonnis koos uuritava kemikaaliga kasutatava sisestandardina või eraldi kolonnis. Eelistada tuleb mõlema kemikaali voolutamist samas kolonnis, välja arvatud juhul, kui kemikaalid on sarnase märgisega.

**Mullad***Muldade valimine*

26. Leostumisuuringutes tuleks ühe uuritava lähtekemikaali puhul kasutada 3–4 mulda, millel on erinev pH, orgaanilise süsiniku sisaldus ja tekstuur (12). Juhised leostumiskatsete jaoks muldade valimiseks on esitatud tabelis 1. Ioniseeritava uuritava aine puhul peavad väljavalitud mullad hõlmama laia pH-vahemikku, et oleks võimalik hinnata aine liikuvust ioniseeritud ja ioniseerimata vormis; vähemalt kolme mulla pH peaks olema selline, mille juures uuritav kemikaal on liikuv vormis.

Tabel 1.

**Leostumisuuringute jaoks muldade valimise juhend**

Mulla nr	pH	Orgaaniline süsinik %	Savisisaldus %	Tekstuur (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	raske liivsavi
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	tolmjas liivsavi
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	keskmise liivsavi
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 #	saviliiv
5	< 4,5	> 10 §	< 10	saviliiv/liiv

(\*) Vastavalt FAO ja Ameerika Ühendriikide põllumajandusministeeriumi süsteemile (14).

§ Vastavad muutjad peaksid eelistatavalt jääma esitatud vahemikku. Kui sobivat mullamaterjali on siiski raske leida, aktsepteeritakse ka märgitud miinimumist väiksemaid väärtusi.

‡ Mullad, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on alla 0,3 %, võivad häirida orgaanilise aine sisalduse ja adsorptsiooni vahelist korrelatsiooni. Seepärast on soovitatav kasutada muldasid, mille minimaalne orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,3 %.

# Väga kõrge süsinikusisaldusega (nt > 10 %) muld ei pruugi olla seaduslikult vastuvõetav nt pestitsiidide registreerimisel.

27. Mõnikord võib olla vaja uurida muid mullatüpe, mis esindaksid jaheda või parasvöötme kliimaga või troopilisi piirkondi. Seepärast juhul, kui eelistatakse teisi mullatüpe, tuleks neid iseloomustada samade parameetritega ja neil peaks olema samalaadne omaduste varieeruvus, nagu on kirjeldatud leostumiskatsete jaoks muldade valimise juhistes (vt tabel 1), isegi kui need mullad ei vasta täpselt nendele kriteeriumidele.
28. Leostumiskatse tegemisel vanandatud jääkidega tuleks kasutada ühte mulda (12). Selle liivisisaldus peaks olema > 70 % ja orgaanilise süsiniku sisaldus vahemikus 0,5–1,5 % (nt muld nr 4 tabelis 1). Suurema arvu mullatüüpide kasutamine võib olla vajalik siis, kui teave muundumissaaduste kohta on oluline.
29. Kõiki muldasid tuleks iseloomustada vähemalt nende teksturi (liiva-, tolmu- ja saviprotsent vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (14)), pH, katioonivahetusvõime, orgaanilise süsiniku sisalduse, mulla lasuvustiheduse (häiritud muld) ja veemahutavuse järgi. Mikroobide biomassi mõõtmine on

**▼ M6**

nõutav ainult sellise mulla puhul, mida kasutatakse vanandamis-/inkubeerimisaja jooksul enne leostumiskatse tegemist vanandatud uuritava ainega. Täiendav teave mulla omaduste kohta (nt mulla klassifikatsioon, savi mineraloogia, eripind) võib olla kasulik katse tulemuste tõlgendamise puhul. Mulla omaduste määramiseks saab kasutada viidetes (15, 16, 17, 18, 19) soovitatud meetodeid.

*Muldade kogumine ja säilitamine*

30. Muld tuleks võtta ülemisest kihist (A-horisondist) kuni 20 cm sügavusel. Taimestiku ja makrofauna jäägid ning kivid tuleks eemaldada. Mullad (välja arvatud uuritava kemikaali vanandamiseks kasutatavad mullad) kuivatatakse õhu käes toatemperatuuril (eelistatavalt vahemikus 20–25 °C). Kogused tuleks murendada võimalikult ettevaatlikult, nii et mulla struktuur muutuks võimalikult vähe. Muld sõelutakse läbi sõela avaga  $\leq 2$  mm. Soovitatakse hoolikat homogeniseerimist, sest see suurendab tulemuste korratavust. Enne kasutamist võib mulda hoida toatemperatuuril ja õhu käes kuivatuna (12). Säilitamisaega ei piirata, kuid üle kolme aasta säilitatud mulda tuleks enne kasutamist uuesti analüüsida orgaanilise süsiniku sisalduse ja pH suhtes.
31. Üksikasjalik teave mullaproovide kogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjad hõlmavad järgmist: täpne asukoht [näidatakse täpselt vastavalt UTM-ile (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) või geograafiliste koordinaatide abil], taimkate, töötlemine põllukultuure kaitsvate kemikaalidega, väetamine orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine (12). Kui mulda on juba töödeldud uuritava ainega või selle struktuursete analoogidega viimase nelja aasta jooksul, ei tuleks seda leostumisuuringus kasutada.

*Katsetingimused*

32. Katse ajal tuleks mullaga leostumiskolonne hoida pimedas toatemperatuuril, kui see temperatuur püsib vahemikus  $\pm 2$  °C. Soovitatavad temperatuurid on vahemikus 18–25 °C.
33. Kunstliku vihma (0,01 M CaCl<sub>2</sub>) tuleks lisada pidevalt mullasamba pinnale kiirusega 200 mm 48 tunni jooksul<sup>(1)</sup>; See kiirus vastab 251 ml lahuse lisamisele, kui kolonni siseläbimõõt on 4 cm. Kui katse eesmärk seda nõuab, võib lisaks kasutada muid kunstliku vihma kiirusi ja pikemat katse kestust,

*Katse käik**Uuritava lähtekemikaali leostumine*

34. Vähemalt kaks leostumiskolonna täidetakse töötlemata, õhu käes kuivatatud ja sõelatud (< 2 mm) mullaga kuni kõrguseni ligikaudu 30 cm. Ühtlase täitmise saavutamiseks lisatakse mulda kolonni väikeste portsjonitena ja surutakse kokku varbkolviga; samas vibreeritakse kolonni kergelt, kuni

<sup>(1)</sup> See modelleerib väga suurt vihmasadu. Keskmine sademete hulk näiteks Kesk-Euroopas on 800–1 000 mm aastas.

▼ **M6**

- kolonni ülemine kiht rohkem enam kokku ei vaju. Ühetaoline täitmine on vajalik selleks, et leostumiskolonnidega saada korratavaid tulemusi. Kolonni täitmise tehnika kohta vt viited (20, 21 ja 22). Kolonni täitmise korratavuse kontrollimiseks mõõdetakse kolonni pandud mulla kogumass <sup>(1)</sup>; paralleelkolonnide massid peaksid olema sarnased.
35. Pärast täitmist kolonnid eelneisutatakse kunstliku vihmaveega (0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahus) altpoolt ülespoole, et asendada õhk mulla poorides veega. Seejärel lastakse mullakolonnidel tasakaalustuda ja liigne vesi vajub raskusjõu toimel välja. Vt ülevaade kolonni küllastamismeetoditest, viide (23).
36. Seejärel kantakse mullakolonnile uuritav kemikaal ja/või võrdluskemikaal (vt ka punktid 23–25). Ühtlase jaotuse saamiseks kantakse uuritava kemikaali ja/või võrdluskemikaali lahused, suspensioonid või emulsioonid ühtlaselt kogu mullasamba pinnale. Kui uuritava kemikaali pealekandmiseks on soovitatud selle segamist mulda, tuleks kemikaal segada väikse koguse (nt 20 g) mullaga ja kanda see mullasamba pinnale.
37. Mullasamba pind kaetakse seejärel paagutatud klaasfiltriketta, klaashelmeste, klaaskiudfiltri või filterpaberikettaga, et jaotada kunstlikku vihma ühtlaselt üle kogu kolonni pinna ja vältida mullapinna häirimist vihmatiljadega. Mida suurem on kolonni läbimõõt, seda hoolikam tuleb olla kunstliku vihma kolonnile juhtimisega, et tagada vihma ühtlane jaotumine kogu kolonni pinnal. Seejärel lisatakse mullakolonnidele kunstlikku vihma tilkhaaval kolb- või peristaltilise pumba või tilklehtri abil. Eelistatavalt tuleks nõrgvett koguda fraktsioonidena ja märkida üles nende kogused <sup>(2)</sup>.
38. Pärast kolonnide voolutamist ja nõrguda laskmist jagatakse kolonnid nõutavaks arvuks osadeks, olenevalt sellest, millist teavet tahetakse katsega saada, osasid ekstraheeritakse sobivate lahustite või lahustisegudega ja määratakse nendes uuritav aine või vajaduse korral muundumissaadused, üldradioaktiivsus ja võrdlusaine. Nõrgvett või nõrgveefraktsioone analüüsitakse otse või pärast ekstraheerimist, et määrata nendes samad ained. Kui kasutatakse radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali, tuleb määrata kõik fraktsioonid, mis sisaldavad  $\geq 10\%$  kolonnile kantud radioaktiivsusest.

*Vanandatud jääkide leostumine*

39. Värskele mullale (mida ei ole eelnevalt õhu käes kuivatatud) lisatakse radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali sellises koguses, mis vastab mullakolonni pindalale (vt punkt 24), ja inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes vastavalt katsemeetodile C.23 (13). Inkubeerimise (vanandamise) aeg peaks

<sup>(1)</sup> Häiritud muldade nädistihedused on järgmised: liiv 1,66 g/ml  
keskmise liivsavi 1,17 g/ml  
saviliiv 1,58 g/ml  
tolmmuld 1,11 g/ml

<sup>(2)</sup> Tüüpiline nõrgvee maht on vahemikus 230–260 ml, mis vastab ligikaudu 92–104 % kogu kunstliku vihma mahust (251 ml), kui kasutatakse mullakolonni, mille läbimõõt on 4 cm ja pikkus 30 cm.

**▼ M6**

- olema piisavalt pikk, et tekiks olulisel määral muundumissaadusi; uuritava kemikaali soovitatav vanandamisaeg on selle kemikaali üks poolestusaeg, <sup>(1)</sup> kuid mitte üle 120 päeva. Enne leostamist määratakse vanandatud mullas uuritava kemikaali ja selle muundumissaaduste sisaldus.
40. Leostumiskolonnid täidetakse kuni 28 cm kõrguseni samasuguse (kuid õhu käes kuivatatud) mullaga, mida kasutati punktis 34 kirjeldatud vanandamise katses, ja määratakse täidisega mullakolonna kogumass. Seejärel mullakolonnid eelniisutatakse, nagu on kirjeldatud punktis 35.
41. Seejärel kantakse mullakolonna pinnale 2 cm paksuse kihina vanandatud mulla jääkidena uuritav kemikaal ja selle jäägid (muundumissaadused) (vt punkt 39). Mullakolonna maksimaalne kõrgus (töötlemata muld pluss vanandatud muld) ei tohiks eelistatavalt olla üle 30 cm (vt punkt 34).
42. Leostumiskatse tehakse vastavalt punktis 37 esitatud kirjeldusele.
43. Pärast leostumist määratakse mullasamba osades ja nõrgvees vastavalt punktis 38 esitatud kirjeldusele uuritav kemikaal, selle muundumissaadused ja ekstraheerumata radioaktiivsus. Selleks et määrata, kui suur osa vanandamisjääkidest jääb pärast leostumist 2 cm paksusesse pinnakihti, tuleks see mullasamba osa analüüsida eraldi.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

44. Iga mullasambaosa ja nõrgveefraktsiooni kohta tuleks esitada uuritava kemikaali, muundumissaaduste, ekstraheerumatute ainete ja, kui lisati, võrdluskemikaali kogused protsentidena pealekantud annusest. Iga kolonna kohta esitatakse graafiliselt nende protsendimäärad funktsioonina mullasamba sügavusest.
45. Kui kolonniga leostumise uuringus lisatakse ka võrdlusaine, saab uuritava kemikaali leostumist hinnata suhtelises skaalas, kasutades suhtelisi liikuvustegureid (*relative mobility factor*, RMF; määratlus vt 3. liide) (1, 11), mis võimaldab võrrelda mitmesuguste kemikaalide leostumisandmeid, mis on saadud erinevate mullatüüpidega. Mitmete taimekaitsevahendite RMFi väärtuste näited on esitatud 3. lisas.
46. Kolonnist leostumise katsega võib hinnata ka  $K_{oc}$  (orgaanilise süsiniku normeeritud adsorptsioonikoefitsiendi) ja  $K_{om}$  (orgaanilise süsiniku normeeritud jaotuskoefitsiendi) väärtusi, kui kasutada keskmisi leostumisvahemaid või leitud korrelatsioone RMFi ja  $K_{OM}$  või  $K_{OC}$  vahel (4) või lihtsat kromatograafiateooriat (24). Siiski tuleks viimast meetodit kasutada ettevaatusega, arvestades eelkõige, et leostumisprotsessis ei ole küllastunud voolamise tingimusi, pigem on tegu küllastumata süsteemidega.

<sup>(1)</sup> Mullas võib tekkida lisaks ühele peamisele muundumissaadusele veel muidki muundumissaadusi, mis võivad muundumiskatse käigus tekkida eri aegadel. Sellisel juhul võib olla vajalik teha leostumiskatse erineva vanuseni vanandatud jääkidega.



**▼ M6****Tulemuste tõlgendamine**

47. Käesolevas meetodis kirjeldatud kolonnis leostumise uuringud võimaldavad määrata uuritava kemikaali (lähteaine) ja/või selle muundumissaaduste (vanandatud jääkide) leostumist või liikuvust mullas. Need katsed ei võimalda kvantitatiivselt prognoosida leostumist välitingimustes, kuid neid võib kasutada selleks, et võrrelda ühe kemikaali „leostuvust” muude kemikaalide omaga, mille leostumiskäitumine võib olla teada (24). Samuti ei mõõdetata nende katsetega kvantitatiivselt uuritava kemikaali protsentuaalset kogust, mis võib jõuda põhjavette (11). Siiski võib kolonnis leostumise katse tulemus aidata otsustada, kas on vaja täiendavaid välioludele lähendatud või välikatseid kemikaalide puhul, mis on laborikatsetes näidanud suurt liikuvusvõimet.

**Katseprotokoll**

48. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine:

*Uuritav kemikaal ja võrdluskemikaal (kui seda kasutatakse):*

- tavanimetus, keemiline nimetus (IUPACi ja CASi nomenklatuur), CASi number, keemiline struktuur (milles on näidatud märgise asukoht, kui kasutatakse radioaktiivse märgisega materjali) ja olulised füüsikaliskemilised omadused;
- uuritava kemikaali puhtus (lisandid).
- märgisega kemikaalide radiokeemiline puhtusaste ja eriaktiivsus (vajaduse korral).

*Katsemullad:*

- üksikasjalikud andmed kogumiskoha kohta;
- mulla omadused, nt pH, orgaanilise süsiniku ja savi sisaldus, tekstuur ja lasuvustihedus (häiritud mulla korral);
- mulla mikroobne aktiivsus (ainult mulla puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaali vanandamiseks);
- mullaproovide säilitamise kestus ja tingimused.

*Katsetingimused:*

- uuringu kuupäevad;
- leostumiskolonnide pikkus ja läbimõõt;
- mullakolonnides oleva mulla üldmass;
- uuritava kemikaali ja vajaduse korral võrdluskemikaali kogus;
- kunstliku vihma kogus, vihmutamise sagedus ja kestus;
- katsesüsteemi temperatuur;
- paralleelkatsete arv (vähemalt kaks);
- meetodid uuritava kemikaali, muundumissaaduste ja vajaduse korral võrdluskemikaali määramiseks mullasamba osades ja nõrgvees;
- meetodid uuritava kemikaali ja muundumissaaduste kindlakstegemiseks ja iseloomustamiseks mullasamba osades ja nõrgvees.

▼ **M6***Katsetulemused:*

- tulemused tabeli kujul, väljendatuna kontsentratsioonidena ja protsendina lähteannusest mullasamba osades ja nõrgvees;
- massibilanss, kui see on asjakohane;
- nõrgvee kogused;
- leostumisvahemaad ja, kui see on asjakohane, suhtelised liikuvustegurid;
- graafik, milline % leiti mullasamba osas funktsioonina osa sügavusest;
- tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

## KIRJANDUS

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Komisjoni direktiiv 95/36/EÜ, 14. juuli 1995, millega muudetakse nõukogu direktiivi 91/414/EMÜ taimekaitsevahendite turuleviimise kohta, I lisa, EÜT L 172, 22.7.1995, lk 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/-Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (13) Käesoleva lisa järgmised peatükid:

Peatükk A.4. Aururõhk

Peatükk A.6. Lahustuvus vees

▼ **M6**

Peatükk A.8. Jaotustegur. Loksutamismeetod

Peatükk A.24 Jaotuskoefitsient, HPLC meetod

Peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst

Peatükk C.18. Adsorptsioon/desorptsioon, kasutades partii tasakaalustamise meetodit

Peatükk C.23. Aeroobne ja anaeroobne transformatsioon mullas

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- (15) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). *Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼ **M6***1. liide***Mõisted ja ühikud**

**Jäägid vanandatud mullas** – uuritav kemikaal ja muundumissaadused pinnases pärast kemikaali pinnasesse kandmist ja aega, mis on olnud piisavalt pikk kemikaali liikumise, adsorptsiooni, metaboliseerimise ja hajumise jaoks, mis on muutunud kemikaali jaotumist ja keemilist olemust (1).

**Kunstlik vihm** – 0,01 M CaCl<sub>2</sub> lahus destilleeritud või deioniseeritud vees.

**Keskmine leostumisvahemaa** – selle mullasambaosa põhi, milles summaarne taasleitud kemikaalisaldus on 50 % taasleitud kemikaali üldsisaldusest [tavaline leostumiskatse], või (selle mullasambaosa põhi, milles summaarne taasleitud kemikaalisaldus on 50 % taasleitud kemikaali üldsisaldusest) – ((vanandatud jääkidega pinnasekihi paksus)/2) [vanandatud jääkide leostumise katse].

**Kemikaal** – aine või segu.

**Nõrgvesi** – veefaas, mis on läbinud mullaprofiili või mullakoloni (1).

**Leostumine** – protsess, mille käigus kemikaal liigub allapoole läbi mullaprofiili või mullakoloni (1).

**Leostumisvahemaa** – sügavaim mullasambaosa, milles pärast leostumisprotsessi leiti  $\geq 0,5$  % pealekantud uuritavast kemikaalist või vanandatud jääkidest (sama kui sissetungimise sügavus).

**Avastamispiir ja määramispiir** – avastamispiir on kemikaali kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kemikaali identsust tõendavat signaali eristada analüüsi artefaktidest. Määramispiir on kemikaali kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kontsentratsiooni määrata nõutava täpsusega.

**Suhteline liikuvustegur (RMF)** – (uuritava kemikaali leostumisvahemaa (cm)) / (võrdluskemikaali leostumisvahemaa (cm))

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil

**Muundumissaadus** – iga kemikaal, mis on tekkinud uuritava kemikaali biotiliste või abiootiliste muundumisreaktsioonide tulemusel, kaasa arvatud CO<sub>2</sub> ja saadused, mis on seotud jääkides.

**Muld** – mineraalsete ja orgaaniliste keemiliste koostisainete segu; orgaanilised koostisained sisaldavad suure süsiniku- ja lämmastikusisalduse ning suure molekulmassiga ühendeid, milles elavad väiksed (enamasti mikro-)organismid. Mulla puhul võib eristada kahte olekut:

— looduspärane, nagu see on aja jooksul tekkinud, mitmesuguste mullatüüpide iseloomulike kihtidega;

— häiritud, nagu see tavaliselt esineb haritavatel aladel või labidaga kaevatud proovides, mis on võetud käesoleva katsemeetodi kohaste katsete tegemiseks (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

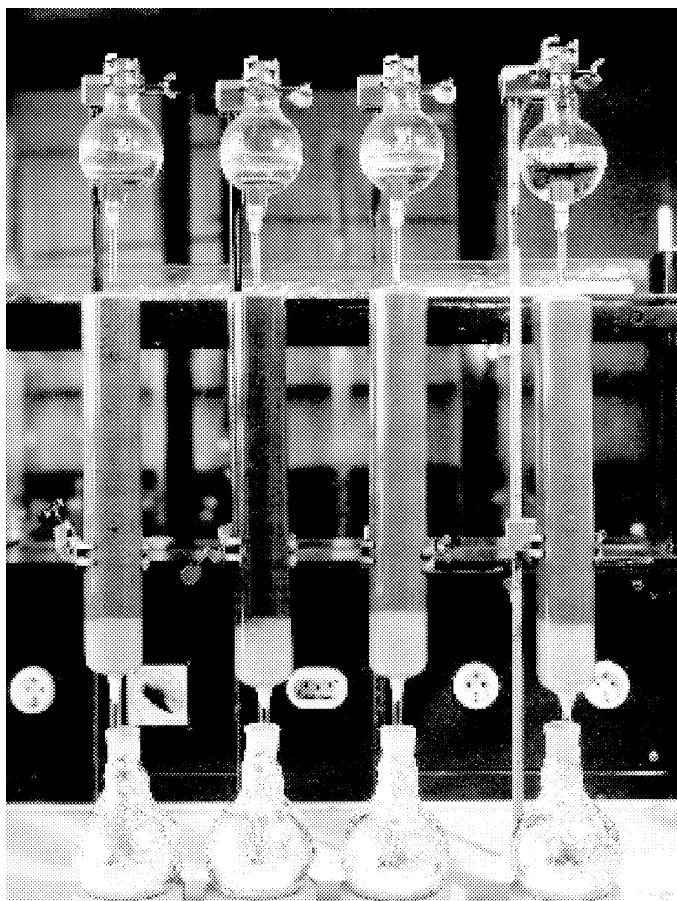
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼ M6

## 2. liide

## Joonis 1.

Osadeks mitte lahtivõetava klaasist leostumiskoloni näidis; pikkus 35 cm, siseläbimõõt 5 cm (1)



← Tilklehtrid kunstliku vihma lisamiseks

← Paagutatud klaasketas, mulla pinna häirimise vältimiseks ja kunstliku vihma ühtlaseks jaotamiseks

← Klaaskolonn, mis on täidetud katseks võetud mullaga (kui uuritakse valgustundlikke kemikaale, tuleb kolonni ümber mähkida alumiinium-foolium)

← Kvartsiiva kiht

← Klaaskiudtropp, mis hoiab mulda kolonnis

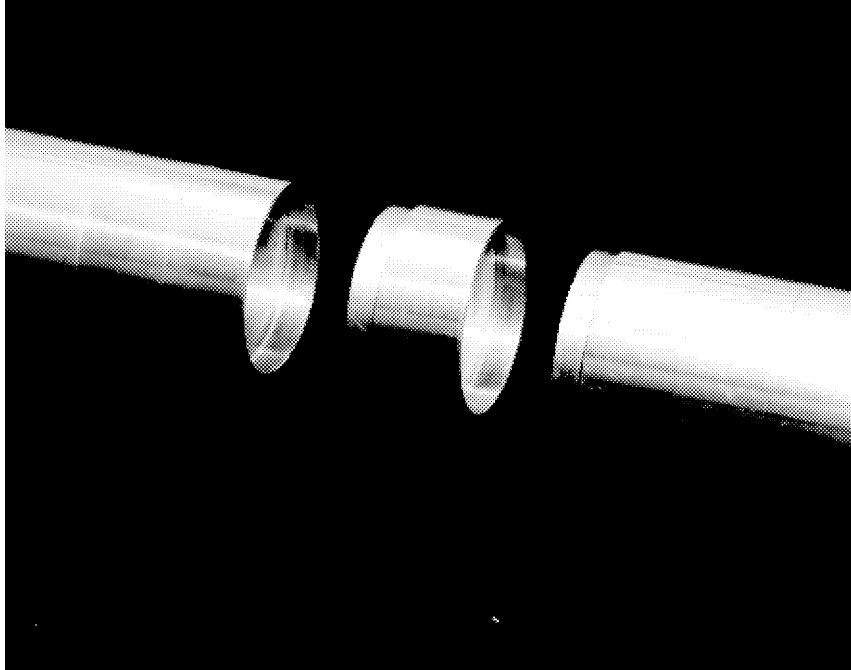
← Ümara põhjaga kolb nõrgavee kogumiseks; fotolüüsi vältimiseks mähitud alumiinium-fooliumi sisse

- (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.

▼ **M6**

*Joonis 2.*

**Osadeks lahtivõetava metallkolonni näidis; kolonni siseläbimõõt on 4 cm (1)**



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. *Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III*, 203-213.

▼ **M6**

## 3. liide

**Suhtelise liikuvusteguri (RMF) (\*) näiteid eri taimekaitsevahendite puhul (1, 2) ja vastavad liikuvusklassid +**

RMFi vahemik	Kemikaal (RMF)	Liikuvusklass
≤ 0,15	Paratioon (< 0,15), flurodifeen (0,15)	I liikumatu
0,15–0,8	Profenofoss (0,18), propikonasool (0,23), diasinon (0,28), diuroon (0,38), terbutüülasiin (0,52), metidatioon (0,56), prometriin (0,59), propasiin (0,64), alakloor (0,66), metolakloor (0,68)	II veidi liikuv
0,8–1,3	Monuroon (**) (1,00), atrasiin (1,03), simasiin (1,04), fluometuroon (1,18)	III mõõdukalt liikuv
1,3–2,5	Prometoon (1,67), tsüanasiin (1,85), bromatsiil (1,91), karbutilaat (1,98)	IV suhteliselt liikuv
2,5–5,0	Karbofuraan (3,00), dioksakarb (4,33)	V liikuv
> 5,0	Monokrotofoss (> 5,0), dikrotofoss (> 5,0)	VI väga liikuv

(\*) Suhteline liikuvustegur on leitud järgmiselt (3):

$$RMF = \frac{\text{uuritava kemikaali leostumisvahemaa(cm)}}{\text{võrdluskemikaali leostumisvahemaa(cm)}}$$

(\*\*) Võrdluskemikaal

+ Muud kemikaalide mullas liikuvuse klassifitseerimise süsteemid põhinevad mulla õhukese kihi kromatograafia abil leitud  $R_f$  väärtustel ja  $K_{oc}$  väärtustel (5, 6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.” Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼ **M6****C.45. PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖDELDUD PUIDUST KESKKONDA ERALDUVATE HEITKOGUSTE MÄÄRAMINE. LABORATOORNE MEETOD HEITE MÄÄRAMISEKS KATMATA PUIDUST, MIS ON KOKKUPUUTES MAGEVEE VÕI MEREVEEGA**

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 313 (2007). Puidukonservandiga töödeldud puidust keskkonda eralduvat heidet on vaja mõõta, et oleks võimalik hinnata töödeldud puidu keskkonnariske. Käesolevas juhendis kirjeldatakse laborimeetodit heite hindamiseks töödeldud puidust kahes olukorras, kus heide võib sattuda keskkonda:
  - heide töödeldud puidust, mis on kokkupuutes mageveega. Töödeldud puidu pinnalt võib puidukonservant sattuda vette;
  - heide töödeldud puidust, mis on kokkupuutes mereveega. Töödeldud puidu pinnalt võib puidukonservant sattuda merevette.
2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on uurida heidet puidust ja puitesemetest, mis ei ole muu materjaliga kaetud ja on kokkupuutes magevee või mereveega. Kasutamisklasse kasutatakse rahvusvaheliselt selleks, et kategoriseerida bioloogilisi ohte, millega puutub kokku töödeldud puitese. Kasutamisklassid võimaldavad määratleda samuti olukorda, milles kasutatakse töödeldud puitesemeid, ja keskkonna osi (õhk, vesi, pinnas), mida puidukonservandiga töödeldud puit võib ohustada.
3. Käesolev katsemeetod on laborimeetod, milles töödeldud puiduga kokkupuutes olevast veest (heitekeskkonnast) võetakse üha pikema kokkupuute ajavahemiku järel proove. Heite kogus heitekeskkonnas on seotud puiteseme pindala ja kokkupuute kestusega, millest saab hinnata heitevoogu ühikutes  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{päev}$ . Niimoodi saab hinnata heitevoogu (leostumiskiirust) pärast pikemaid kokkupuuteaegu.
4. Heite kogust võib kasutada töödeldud puidu keskkonnariski hindamiseks.

## LÄHTEKAALUTLUSED

5. Eeldatakse, et puidu pinnalt konservandi leostumise mehhanism ja intensiivsus ei tarvitse olla magevees samasugune kui merevees. Seega on puidu töötlemiseks kasutatavate konservantide ja segude puhul, mida kasutatakse merevee keskkonnas oleva puidu puhul, vaja uurida leostumist merevees.
6. Puit, mida on töödeldud puidukonservandiga, peab kaubanduslikult kättesaadava puidu suhtes olema esindav. See peaks olema töödeldud vastavalt konservandi tootja juhistele, asjakohastele normidele ja spetsifikatsioonidele. Puit peab pärast töötlemist ja enne katse algust olema konditsioneeritud; tuleb teatada selle konditsioneerimise tingimused.
7. Kasutatavad puidu näidised peavad olema kaubanduslike toodete suhtes esindavad (nt puidu liik, tihedus ja muud omadused).



**▼ M6**

8. Katsed võib kasutada puidu puhul, mida on töödeldud immutamise või millele konservant on pinnale kantud, samuti töödeldud puidu puhul, mille pinda on kohustuslikus korras täiendavalt töödeldud (näiteks värvitud kaubandusliku kasutuse puhul nõutavas korras).
9. Vee koostis, kogus, pH ja füüsikaline olek on olulised puidust leostuva heite koguse, sisalduse ja laadi määramiseks.

**KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

10. Puidukonservandiga töödeldud katsekehad sukeldatakse vette. Kokkupuuteaja jooksul võetakse mitmesuguste ajavahemike järel nii palju proove veest (heitekeskkond) ja analüüsitakse neid, et piisaks statistiliste arvutuste tegemiseks. Analüüsitulemustest arvutatakse heite kiirus ühikutes  $\text{mg/m}^2/\text{päev}$ . Proovivõtuajad tuleks registreerida. Katse töötlemata näidistega võib lõpetada, kui esimese kolme andmepunkti puhul ei leita mingit tausta.
11. Töötlemata puidunäidiste lisamine katsesse võimaldab määrata ka muude heiteainete kui kasutatud puidukonservantide heite taustkontsentratsioonid.

**KVALITEEDIKRITERIUMID****Täpsus**

12. Heite hindamise meetodi täpsus sõltub analüüsitavatest tootenäidistest – kuivõrd hästi esindavad need kaubanduslikku töödeldud puitu, sellest, kuivõrd hästi esindab vesi tegelikku vett ja kokkupuuterežiim – tegelikke looduslikke tingimusi.
13. Analüüsimetodi mõõdetäpsus, kordustäpsus ja korratavus tuleks määrata enne katse tegemist.

**Korratavus**

14. Võetakse kolm proovi veest, analüüsitakse need ja leitakse heite väärtuse keskväärtnus. Tulemuste korratavus ühes laboris ja eri laborites sõltub immutamisrežiimist ja puidust, mida kasutatakse katsekehade valmistamiseks.

**Tulemuste lubatav vahemik**

15. Vastuvõetav on tulemuste vahemik, milles kõrgeimad ja madalaimad tulemused erinevad vähem kui üks suurusjärk.

**KATSETINGIMUSED****Vesi**

16. Magedasse vette leostumise stsenaariumid: Puidust magedasse vette leostumise uurimiseks soovitatakse kasutada deioniseeritud vett (nt ASTM D 1193 tüüp II). Vee temperatuur peab olema  $20 \pm 2$  °C ning mõõdetud pH ja temperatuur registreeritakse katseprotokollis. Veeproovidest, mis on võetud enne töödeldud puidu katsekehade viimist vette, saab määrata analüüsitavate kemikaalide (taust-)sisalduse vees. See on kontroll, millega määratakse analüüsitavate kemikaalide taustnivoo.

▼ **M6**

17. Merevette leostumise stsenaariumid: Puidust merevette leostumise uurimiseks soovitatakse kasutada sünteetilist merevett (nt ASTM D 1141 asendusmerevesi ilma raskmetallideta). Vee temperatuur peab olema  $20 \pm 2$  °C ning mõõdetud pH ja temperatuur registreeritakse katseprotokollis. Veeproovidest, mis on võetud enne töödeldud puidu katsekehade viimist vette, saab määrata analüüsitava kemikaalide sisalduse vees. Tegemist on analüüsi kontrollkatsega, millega määratakse oluliste kemikaalide taustsisaldus.

**Puidust katsekehad**

18. Puuliik peab olema tüüpiline selliste puuliikide jaoks, mida kasutatakse puidukonservantide tõhususe kontrollimiseks. Soovitavad liigid on *Pinus sylvestris* L. (harilik mänd), *Pinus resinosa* Ait. (vaigumänd) või *Pinus* spp (lõunamänd). Täiendavaid katseid võib teha muude liikidega.
19. Kasutada tuleks sirge süüga puitu, milles ei oleks oksakohti. Vaiguse välimusega materjali tuleks vältida. Puit peab olema kaubanduslikult kättesaadava puidu jaoks esindav. Protokollis tuleks anda puidu allikas, tihedus ja aastaringide tihedus 10 mm kohta.
20. Puitkatsekehade komplektiks soovitatakse võtta viis standardile EN 113 vastava suurusega klotsi (mõõtmed 25 mm × 50 mm × 15 mm), kus pikiküljel on paralleelne süüga, kuigi võib kasutada ka muude mõõtmetega katsekehasid, näiteks 50 mm × 150 mm × 10 mm. Katsekehad tuleb täielikult sukeldada vette. Katsekehad peaksid 100 % ulatuses koosnema maltspuidust. Iga katsekeha on märgistatud nii, et seda oleks võimalik kindlaks teha kogu katse jooksul.
21. Kõik katsekehad peaksid olema hõõveldatud või saetud ja pinnad ei tohi olla lihvitud.
22. Puitkatsekehasid võetakse analüüsi tegemiseks vähemalt viis komplekti: kolm katsekehade komplekti töödeldakse puidukonservandiga, üks komplekt on töötlemata ja üht komplekt kasutatakse selleks, et hinnata katsekehade niiskusesisaldust pärast ahjus kuivatamist ja enne töötlemist. Valmistatakse ette piisav arv katsekehasid, et nendest saaks valida kolm katsekehakomplekti, milles seotud puidukonservandi kogused oleksid keskväärtuse suhtes 5 % vahemikus.
23. Kõikide katsekehade otsad on kaetud (suletud) kemikaaliga, mis ei lase puidukonservandil imbuda katsekeha otsast puusüü sisse ega lase konservandil leostuda katsekeha otsa süü kaudu. Otsa sulgeva vahendi pealekandmisel on vaja eristada katsekehasid, millele konservant kantakse pinnale, katsekehadedest, millesse konservandil lastakse sisse imbuda. Otsa sulgev vahend tuleb katsekehale kanda enne töötlemist puidukonservandiga ainult juhul, kui konservant kantakse pinnale.
24. Katsekeha otsa süü peab olema avatud, kui töötlemisel lastakse konservandil imbuda puidu sisse. Seepärast tuleb selliste katsekehade otsad sulgeda alles konditsioneerimisperioodi lõpus. Hinnatakse üksnes heidet, mis toimub läbi pikisüülise pinna. Suletud otsi katvat kihti tuleks kontrollida ja vajaduse korral see uuesti peale kanda, enne kui alustatakse leostumist; seda ei tohiks uuesti peale kanda pärast leostumise alustamist.

**▼ M6****Mahuti katsekehade sukeldamiseks**

25. Mahuti on tehtud inertsest materjalist ja on piisavalt suur, et mahutada viis EN113 moodsus puitkatsekeha 500 ml vees, mille pindala suhe mahusse on 0,4 cm<sup>2</sup>/ml.

**Katsekehade hoidja**

26. Katsekehade komplekt pannakse hoidjale, mis võimaldab katsekehade kõigil avatud pindadel olla kokkupuutes veega.

**PUIDUKONSERVANDIGA TÖÖTLEMISE KÄIK****Töödeldud katsekehade ettevalmistamine**

27. Puitkatsekeha töödeldakse uuritava konservandiga vastavalt kõnealuse toote puhul ettenähtud töötlemismeetodile, mis võib olla konservandiga immutamisel põhinev protsess või katsekeha pinnale kandmine kas tootesse kastmise, toote pihustamise või pintsliga pealekandmise abil.

**Konservandid, millega töötlemine põhineb puidu immutamisel**

28. Valmistatakse konservandi lahus, millega immutamise tulemusel saavutatakse toote ettenähtud sidumine või peetumine puidus. Puitkatsekeha kaalutakse ja võetakse selle moodsud. Immutamine peab toimuma vastavalt puidu konservandiga töötlemise kirjeldusele kasutusklassi 4 või 5 puhul. Katsekeha kaalutakse uuesti pärast töötlemist ja konservandi peetumine (kg/m<sup>3</sup>) puidus arvutatakse järgmise valemi abil:

$$\frac{\text{mass pärast töötlust(kg)} - \text{mass enne töötlust(kg)}}{\text{katsekeha ruumala(m}^3\text{)}} \times \frac{\text{lahuse kontsentratsioon(\% mass/mass)}}{100}$$

29. Katses võib kasutada ka tööstuslikult \big( nt vaakuumseiveimmutuse meetodiga) töödeldud puitu. Kõik toimingud tuleb registreerida protokollis ning konservandi peetumine sellel viisil töödeldud puidus tuleb välja selgitada ja kanda protokollis.

**Konservandid, millega töötlemine põhineb toote kandmisel puidu pinnale**

30. Puitkatsekehade pinna töötlemine hõlmab tootesse kastmist, toote pihustamist või kandmist katsekeha pinnale pintslis abil. Katsekeha töötlemise meetod ja pealekandmise määr (nt l/m<sup>2</sup>) peab vastama kõnealuse konservandiga pinna töötlemise eeskirjale.
31. Katses võib kasutada ka tööstuslikult töödeldud puitu. Kõik toimingud tuleb registreerida protokollis ning konservandi peetumine sellel viisil töödeldud puidul tuleb välja selgitada ja kanda protokollis.

**Katsekehade konditsioneerimine pärast töötlemist**

32. Pärast töötlemist tuleb töödeldud katsekehad konditsioneerida vastavalt konservandi tarnija soovitudele, mis on esitatud uuritava konservandi märgisel, vastavalt tööstusliku töötlemise tavadele või vastavalt standardile EN 252.

**▼ M6****Katsekehade ettevalmistamine ja valimine**

33. Pärast konditsioneerimist arvutatakse katsekehade rühma kohta keskmine konservandi peetumine ning valitakse leostumiskatseks juhuslikkuse alusel kolm esindavat katsekehakomplekti, milles peetumise väärtused erinevad rühma keskvaärtusest kuni 5 %.

**KONSERVANDI HEITE MÕÕTMISE KÄIK****Sukeldamismeetod**

34. Katsekehad kaalutakse ja sukeldatakse seejärel täielikult vette; märgitakse üles selle kuupäev ja kellaaeg. Nõu kaetakse, et vähendada aurumist.
35. Vett vahetatakse järgmistel aegadel: 6 tundi, 1 päev, 2 päeva, 4 päeva, 8 päeva, 15 päeva, 22 päeva, 29 päeva pärast katse algust. Märgitakse üles iga veevahetuse kuupäev ja kellaaeg ning nõust saadud vee mass.
36. Pärast iga veevahetust võetakse veest, millesse katsekehade komplekt on olnud sukeldatud, proov hilisema keemilise analüüsi jaoks.
37. Proovide võtmise kord võimaldab arvutada heite koguse sõltuvuse ajast. Proove tuleks hoida tingimustes, milles uuritav aine hästi säilib, näiteks külmkapis pimeduses, et vähendada proovis mikroobide kasvu enne analüüsi.

**HEITE MÕÕTMISED****Töödeldud proovid**

38. Võetud veeproove analüüsitakse keemiliselt toimeaine ja/või selle lagunemis- või muundumissaaduste määramiseks, kui see on asjakohane.

**Töötlemata katsekehad**

39. Vee (heitekeskkonna) kogumine selles süsteemis ja töötlemata puiduproovidest leostunud kemikaalide hilisem määramine võimaldab hinnata konservandi võimaliku heite kiirust töötlemata puidust. Heitekeskkonna proovide kogumine pärast üha pikenevat kokkupuuteaega ja analüüsimine võimaldavad hinnata heitekiiruse sõltuvust ajast. Kõnealuse analüüsi tegemine on kontrollmeetod töötlemata puidus oleva uuritava kemikaali tausttaseme määramiseks; sellega tõendatakse, et katsekehade allikana kasutatud puitu ei ole varem konservandiga töödeldud.

**ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Keemilised analüüsid**

40. Kogutud veeproove analüüsitakse keemiliselt ja veeanalüüsi tulemused väljendatakse asjakohastes ühikutes, näiteks µg/l.

**Andmete esitamine**

41. Kõik tulemused registreeritakse. Liites on esitatud soovitatud registreerimisvormi näide ühe töödeldud katsekehade komplekti jaoks ja kokkuvõtlik tabel heite keskvaärtuste arvutamiseks iga proovivõtuajavahemiku puhul.
42. Päevane heitevoog mg/m<sup>2</sup>/päev arvutatakse nii, et kolme paralleelkatse kolmest mõõtmisest võetakse keskvaärtus ja jagatakse sukelduspäevade arvuga.

▼ **M6****Katseprotokoll**

43. Katseprotokollis esitatakse vähemalt järgmine teave:

- uuritava puidukonservandi tarnija nimi;
- uuritava puidukonservandi konkreetne ja spetsiifiline nimi või kood;
- konservandi toimeaine(te) kaubanduslik või tavanimetus koos komponentide üldise kirjeldusega (nt kaaslahusti, vaik) ja koostisega massiprotsentides;
- asjakohane peetunud kogus või pealekandmise määr (vastavalt  $\text{kg/m}^3$  või  $\text{l/m}^2$ ) puidu kohta, mis on viidud kokkupuutesse veega;
- kasutatud puiduliik, tihedus ja aastaringide arv 10 mm kohta;
- uuritava puidukonservandi peetunud kogus või pealekandmise määr ( $\text{l/m}^2$  või  $\text{kg/m}^3$ ) ja selle arvutamiseks kasutatud valem;
- konservandiga töötlemise meetod, milles on täpselt kirjeldatud puidu immutamise režiimi või pealekandmise meetodit, kui seda kasutati;
- konservandiga töötlemise kuupäev ja puitkatsekehade hinnanguline niiskusesisaldus protsentides;
- kasutatud konditsioneerimismeetod, täpsustades selle tüübi, tingimused ja kestuse;
- puitkatsekeha otste sulgemise vahendi kirjeldus ja pealekandmiskordade arv;
- iga järgnenud töötlemise kirjeldus, nt pealekantud värvi tarnija, värvi tüüp, omadused ja pealekandmise määr;
- iga sukeldamise kohta alguse kuupäev ja kellaaeg, vee kogus, mida kasutati puitkatsekehade igal sukeldamisel, ja puidu poolt sukeldatud olekus sisseimatud vee kogus;
- kõik kõrvalekalded kirjeldatud meetodist ja kõik asjaolud, mis võivad olla mõjutanud tulemusi.

**KIRJANDUS**

- (1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
- (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼ **M6**

## 1. liide

**Katsemeetodi tulemuste registreerimise vorm**

**Puidukonservandiga töödeldud puidust keskkonda toimuva heite hindamine. Laboratoorne meetod heite määramiseks katmata puidust, mis on kokkupuutes magevee või mereveega**

<b>Katse läbiviinud asutus</b>	
<b>Puidukonservant</b>	
Konservandi tarnija	
Puidukonservandi konkreetne ja spetsiifiline nimi või kood	
Konservandi kaubanduslik või tavanimi	
Muud koostisained	
Asjakohane peetunud konservandi kogus veega kokkupuutesse viidud puidu kohta	
<b>Töötlemine</b>	
Pealekandmisviis	
Pealekandmise kuupäev	
Peetunud koguse arvutamiseks kasutatud valem:	
Konditsioneerimisviis	
Konditsioneerimise kestus	
Oste sulgemiseks kasutatud vahend ja pealekandmiskordade arv	
Edasine töötlemine	kui see on asjakohane
<b>Katsekehad</b>	
Puiduliik	
Puidu tihedus	(miinimum ... keskväärtus ... maksimum)
Kasvu kiirus (aastaringide arv 10 mm kohta)	(miinimum ... keskväärtus ... maksimum)
Niiskusesisaldus	

▼ **M6**

<b>Katsekehakomplektid (*)</b>	<b>Peetunud kogus (nt kg/m<sup>3</sup>)</b>
Töödeldud „x”	5 katsekeha keskvaartus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „y”	5 katsekeha keskvaartus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „z”	5 katsekeha keskvaartus ja standardhälve või vahemik
Töötlemata	
<b>Kõrvalekaldumised katsemeetodi näitajatest</b>	nt vee kvaliteet, katsekehade mõõtmised jne
(*) x, y, z tähistavad kolme paralleelset proovi	

▼ **M6**

Aeg	Veevahetus	Katsekeha mass		Vee sidumine		Veeproov				
		Töödeldud (keskmine)	Töötlemata	Töödeldud (keskmine)	Töötlemata		Katses kasutatav vesi	x	y	z
	Kuupäev	g	g	g	g	Nr	pH	pH	pH	pH
algus										
6 tundi						1				
24 tundi						2				
2 päeva						3				
4 päeva						4				
8 päeva						5				
15 päeva						6				
22 päeva						7				
29 päeva						8				



▼ M6

Palun koostage eraldi tabelid iga toimeaine kohta

Aeg	Veevahetus	Analüüsitulemused:															
		Töötlemata katsekehad			Töödeldud katsekehad												
		Toimeaine kontsentratsioon vees mg/l	Heite kogus mg/m <sup>2</sup>	Leostumise kiirus mg/m <sup>2</sup> /päev	Toimeaine kontsentratsioon vees				Heite kogus				Leostumise kiirus				
					x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine	
Kuupäev																	
6 tundi																	
24 tundi																	
2 päeva																	
4 päeva																	
8 päeva																	
15 päeva																	
22 päeva																	
29 päeva																	

Märkus: Kuna töötlemata katsekehade tulemusi võib olla vaja kasutada töödeldud katsekehade tulemuste parandamiseks, tuleks töötlemata katsekehade tulemused esitada esimesena ja kõik töödeldud katsekehadega saadud tulemused peaksid olema parandatud väärtused. Samuti võib olla vajalik kasutada esialgse vee analüüsist saadud parandit.

▼ **M6**

2. liide

**Mõisted**

**Keemiline aine:** aine või segu

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M6****C.46. BIOAKUMULATSIOON PÕHJASETETES ELAVATES VÄHEHARJASUSSIDES****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga 315 (2008), milles käsitletakse põhjasetetes elavaid ja nendest toituvaid loomi, kes võivad kokku puutuda setetes kogunevate ainetega (1). Selliste põhjasetetest toituvate loomade hulgas on oluline osa veekeskkonna väheharjasussidel, kes asuvad veekeskkonna süsteemide alumises otsas. Nad elavad setetes ja on sageli kõige levinum liik elupaikades, mille tingimused ei sobi muudele loomadele. Tänu setete bioturbatsioonile ja muude loomade söödaga varustamisele võib nendel loomadel olla suur mõju selliste ainete biokättesaadavuse tagamisel muude organismide, näiteks põhjaloomadest toituvate kalade jaoks. Vastupidiselt põhjasetete pinnal elavatele organismidele kaevuvad põhjasetetes elavad veekeskkonna väheharjasussid setetes ja toituvad setteosakestest, mis on setete pinnast allpool. Seepärast puutuvad need organismid saasteainetega kokku mitmel viisil – otsese kontakti, saastunud setteosakeste, poorides oleva vee ja setet katva vee allaneelamise kaudu. Mõned põhjasetetes elavate väheharjasusside liiki, keda praegu ökotoksikoloogilistes katsetes kasutatakse, on kirjeldatud 6. liites.
2. Uuritava aine bioakumulatsiooni iseloomustavate näitajate hulka kuuluvad kõigepealt bioakumulatsioonitegur (*bioaccumulation factor*, BAF), settest omastamise kiiruskonstant ( $k_s$ ) ja eraldumise kiiruskonstant ( $k_e$ ). Nende näitajate üksikasjalikud määratlused on esitatud 1. liites.
3. Ainete bioakumulatsioonivõime üldiseks hindamiseks ja setete pinnale või sisse kogunema kalduvate ainete bioakumulatsiooni uurimiseks oleks vaja seda keskkonnaosa iseloomustavat katsemeetodit (1, 2, 3, 4).
4. Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata end setetega siduvate ainete bioakumulatsiooni põhjasetetes elavatesse väheharjasussidesse. Setet rikastatakse uuritava ainega. Rikastatud sette kasutamise soovitatakse modelleerida saastunud setet.
5. Käesolev meetod põhineb olemasolevatel sette mürgisuse ja bioakumulatsiooni katsemeetoditel (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Muud kasulikud dokumendid on järgmised: rahvusvahelise seminari arutelu ja tulemused (11) ning rahvusvaheliste võrdluskatsete tulemused (12).
6. Selle katsega uuritakse stabiilseid neutraalseid orgaanilisi aineid, mis seovad end setetega. Käesoleva meetodiga saab uurida ka end setetega siduvate stabiilsete metallorgaaniliste ühendite bioakumulatsiooni (12). Meetodit ei saa kasutada metallide ja muude mikroelementide puhul (11), kui ei muudeta katseplaani – substraadi ja vee ruumalasad ning arvatavasti ka koeproovi suurust.

**EELTINGIMUS JA TEAVE UURITAVA AINE KOHTA**

7. Praeguseks on bioakumulatsiooni kohta kindlaks tehtud ainult mõned selged kvantitatiivsed struktuuri-aktiivsuse sõltuvused (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) (14). Kõige laialdasemalt kasutatav sõltuvus on stabiilsete orgaaniliste ainete bioakumulatsiooni ja biokontsentratsiooni ning nende lipofiilsuse vahel (mida väljendab oktaanooli-vee jaotuskoeffitsiendi logaritmi ( $\log K_{ow}$ ); mõiste vt 1. liide), mis on välja arendatud aine vee ja

▼ **M6**

kala vahel jaotumise kirjeldamiseks. Ka sette kohta on kindlaks tehtud selliseid sõltuvusi (15, 16, 17, 18). Peamise kvantitatiivse struktuuri-aktiivsuse sõltuvusest võib  $\log K_{ow}$ - $\log BCF$ i sõltuvus (kus BCF on biokontsentratsiooni tegur) abiks olla end settega siduvate ainete bioakumulatsioonivõime esmasel hindamisel. Siiski võib bioakumulatsiooni tegurit mõjutada katseloomaks valitud organismide lipiidisisaldus ja sette orgaanilise süsiniku sisaldus. Seepärast võib ka orgaanilise süsiniku – vee jaotuskoeffitsienti ( $K_{oc}$ ) kasutada olulise tegurina end settega siduvate orgaaniliste ainete bioakumulatsioonivõime määramisel.

8. Käesolevat katset saab kasutada, kui tegemist on:
- stabiilse orgaanilise ainega, mille  $\log K_{ow}$  väärtus on vahemikus 3,0–6,0 (5, 19), ja ka väga lipofiilse ainega, mille  $\log K_{ow}$  on suurem kui 6,0 (5);
  - selliste orgaaniliste ainete hulka kuuluva ühendiga, mille kalduvus elusorganismidesse kuhjuda on teada, nt pindaktiivsed ained või tugevasti adsorbeeruma kalduvad ained (nt kõrge  $K_{oc}$  väärtus).
9. Enne katse alustamist tuleks uuritava aine kohta koguda näiteks järgmine teave: ohutusabinõud, sobivad säilitamistingimused ja stabiilsus ning analüüsiks sobivad meetodid. Juhised selliste ainete uurimiseks, mille füüsikaliskemilised omadused raskendavad katse tegemist, on esitatud publikatsioonides (20) ja (21). Enne, kui hakatakse uurima aine bioakumulatsiooni põhjasetetes elavatesse väheharjasussidesse, peaks uuritava aine kohta olema olema järgmine teave:
- tavanimetus, keemiline nimetus (eelistatavalt Rahvusvahelise Puhta ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) nimetus), struktuurivalem, CASi registreerimisnumber, puhtus;
  - lahustuvus vees [katsemeetod A.6 (22) ];
  - oktanooli-vee jaotuskoeffitsient  $K_{ow}$  [katsemeetodid A.8, A.24 (22)];
  - sette-vee jaotuskoeffitsient, mis on väljendatud  $K_d$  või  $K_{oc}$ -na [katsemeetod C.19 (22)];
  - hüdrolüüs [katsemeetod C.7 (22)];
  - fotokeemiline muundumine vees (23);
  - aururõhk [katsemeetod A.4 (22)];
  - kiire biolagunduvus [katsemeetodid C.4 ja C.29 (22)];
  - pindpinevus [katsemeetod A.5 (22)];
  - kriitiline mitsellimoodustumise kontsentratsioon (24).
- Lisaks on asjakohane veel järgmine teave, kui see on leitav:
- biolagunemine veekeskkonnas [katsemeetodid C.24 ja C.25 (22)];
  - Henry konstant.
10. Radioaktiivse määrgisega katseaine võib lihtsustada vee, sette ja bioloogiliste proovide analüüsi ning seda võib kasutada otsustamiseks, kas on vaja kindlaks teha ja mõõta ka lagunemissaadusi. Siinkirjeldatud meetod valideeriti rahvusvahelistes võrdluskatsetes (12), milles kasutati  $^{14}C$ -määrgisega aineid. Kui mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust, põhineb bioakumulatsioonitegur (BAF) lähteainel, hõlmates sealhulgas ka kõiki peetunud lagunemissaadusi. Samuti on võimalik kombineerida metabolismi uuringut bioakumuleerumise uuringuga; selleks analüüsitakse ja määratakse lähteaine ning

▼ **M6**

selle lagunemissaaduste protsent proovidest, mis on võetud omastamisfaasi lõpus või bioakumulatsiooni haripunktis. Igal juhul on soovitatav, et bioakumulatsiooniteguri arvutamine põhineks lähteaine sisaldusel organismides ja mitte ainult radioaktiivsete jääkide kogusisaldusel.

11. Lisaks uuritava aine omadustele on vaja teada veel tema mürgisust väheharjasussiliikidele, keda kasutatakse katses, näiteks mediaanset surmavat kontsentratsiooni ( $LC_{50}$ ) selle ajavahemiku jaoks, mis on vajalik omastamisperioidiks, et osata valida mürgisest tasemest oluliselt madalam kokkupuutekontsentratsioon. Andmete olemasolu korral tuleks eelistada subletaalsete näitajate pikaajaliste uuringutega saadud subletaalseid näitajaid ( $EC_{50}$ ). Kui sellised andmed ei ole kättesaadavad, võivad kasulikku teavet anda muude katseloomadega saadud mürgisusandmed või akuutse toksilisuse katse tingimustel, milles kavatakse uurida bioakumulatsiooni.
12. Kättesaadav peab olema asjakohane teadaoleva täpsuse ja tundlikkusega analüüsimeetod aine kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks katselahustes, settes ja bioloogilises materjalis, samuti andmed proovi valmistamise ja säilitamise kohta ning materjali ohutuskaidid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid vees, settes ja usside kudedes. Kui kasutatakse radioaktiivse määrgisega uuritavat ainet, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o  $Bq\ mol^{-1}$ ), määrgisega aatomi täpne asukoht ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent. Uuritava aine eriradioaktiivsus peaks olema võimalikult suur, et tuvastada võimalikult väikseid uuritava aine kontsentratsioone (11).
13. Kättesaadav peaks olema teave sette kohta, mida katses kasutatakse (nt sette või selle koostisosade päritolu, poorivee pH ja ammoniaagi kontsentratsioon (looduslikud setted), orgaanilise süsiniku sisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi % kuivainest) (6).

## KATSE PÕHIMÕTE

14. Katse koosneb kahest faasist: omastamise (kokkupuute) faas ja (aine) eraldumise (kokkupuutejärgne) faas. Omastamisfaasi ajal puutuvad ussid kokku uuritava ainega rikastatud settega, mille kohal on taastatud vesi ja mis on vajaduse korral tasakaalustatud (11). Usside kontrollrühmi hoitakse katseloomade puhul kasutatavatega identsetes tingimustes, aga ilma uuritava aineta.
15. Eraldumisfaasi ajaks kantakse ussid üle sette ja vee süsteemi, milles ei ole uuritavat ainet. Eraldumisfaas on vajalik selleks, et saada teavet kiiruse kohta, millega uuritavat ainet katseorganismidest väljutatakse (19, 25). Eraldumisfaas on vajalik alati, välja arvatud juhul, kui kokkupuute ajal on uuritava aine omastamine tühiselt väike (näiteks kui uuritava aine kontsentratsioon katse- ja kontrollrühma ussides statistiliselt ei erine). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, saab kineetilisi parameetreid (kineetiline bioakumulatsioonitegur  $BAF_k$ , omastamise ja eraldumise kiiruskonstant/-konstandid) määrata eraldumisfaasi tulemuste kasutamise. Uuritava aine kontsentratsiooni muutumist ussides/usside peal jälgitakse katse mõlema faasi ajal.
16. Omastamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi, kuni  $BAF$  on jõudnud platoole või statsionaarsesse olekusse. Vaikimisi peaks omastamisfaas kestma 28 päeva. Praktilised kogemused on näidanud, et 12–14-päevane omastamisfaas on paljude stabiilsete neutraalsete orgaaniliste ainete puhul piisav statsionaarse oleku saavutamiseks (6, 8, 9).

▼ **M6**

17. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päevaga, alustatakse eraldumisfaasi: uuritava ainega kokkupuutes olnud väheharjasussid kantakse üle sama keskkonnaga nõusse, mis aga ei sisalda uuritavat ainet. Eraldumisfaas lõpetatakse, kui uuritava kemikaali sisaldus ussides langeb 10 %-ni sellest, mis mõõdeti 28. päeval, või kui on möödunud kuni 10 päeva. Jääkide sisaldus ussides eraldumisfaasi lõpus (*Non-eliminated residues*, *NER*) on üks täiendavaid mõõdetavaid ja teatatavaid näitajaid. Bioakumulatsioonitegur ( $BAF_{ss}$ ) arvutatakse eelistatult nii ussides leitud kontsentratsiooni ( $C_a$ ) ja settes leitud kontsentratsiooni ( $C_s$ ) suhtarvuna kui ka settest omastamise kiiruskonstandi ( $k_s$ ) ja eraldumise kiiruskonstandi ( $k_e$ ) suhtarvuna ehk kineetilise bioakumulatsioonitegurina ( $BAF_K$ ), eeldades esimest järku kineetikat. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päeva jooksul, arvutatakse  $BAF_K$  omastamise kiiruskonstandist ja eraldumise kiiruskonstandist. Arvutused vt 2. liide. Kui kineetika ei ole esimest järku, tuleks kasutada keerulisemaid mudeleid (2. liide ja viide 25).
18. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta 28 päevaga, võib omastamisperioodi soovi korral pikendada ja jätkata kokkupuutes olevate ussirühmade mõõtmisi, kuni saavutatakse statsionaarne olek; paralleelselt sellega tuleks omastamisfaasi 28. päeval siiski alustada eraldumisfaasi.
19. Omastamise kiiruskonstant, eraldumise kiiruskonstant (või kiiruskonstandid, kui kasutatakse keerulisemaid mudeleid), kineetiline bioakumulatsioonitegur ( $BAF_K$ ) ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse teoreetilise mudeli võrranditest (vt mudelid, 2. liide). Mudeli sobivust katseandmetega saab hinnata korrelatsioonikordaja või determinatsioonikordaja järgi (kui kordaja läheneb 1-le, kirjeldab mudel katseandmeid hästi).
20. Katsetulemuste varieeruvuse vähendamiseks väga lipofiilsete orgaaniliste ainete puhul tuleks bioakumulatsiooni tegurid täiendavalt esitada ka sõltuvusena katse kasutatavate organismide lipiidisisaldusest ja orgaanilise süsiniku üldsisaldusest (*TOC*) setetes (*biota-sediment accumulation factor*, *BSAF*), väljendatuna sette orgaanilise süsiniku kg usside lipiidisisalduse kg kohta. See lähenemisviis põhineb kogemustel ja veekeskkonna teoreetilistel korrelatsioonidel, kus teatavate keemiliste ainete klasside puhul on leitud selge seos aine bioakumuleerumisvõime ja lipofiilsuse vahel, mis on kindlaks tehtud kalade kui mudelorganismide abil (14, 25, 27). Kõnealuste ainete puhul jälgitav bioakumulatsioon sõltub ka katse kasutatud kalade lipiidisisaldusest. Põhjaorganismide puhul on leitud samalaadseid korrelatsioone (15, 16, 17, 18). Kui usside biomassi on piisavalt, saab katseloomade lipiidisisalduse määrata samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava aine kontsentratsioon. Siiski on lipiidisisalduse mõõtmiseks otstarbekas kasutada kohanenud kontroll-loomi vähemalt omastamisfaasi alguses või eelistatavalt lõpus, lipiidisisaldust saab seejärel kasutada bioakumulatsiooniteguri (*BAF*) normeerimiseks.

## KATSE NÕUETEKOHASUS

21. Katse on nõuetekohane järgmistel tingimustel:
- usside kumulatiivne suuremus (kontrollrühmas ja kokkupuuterühmas) kuni katse lõpuni ei tohiks ületada 20 % nende esialgsest arvust.
  - lisaks sellele tuleb tõendada, et ussid kaevuvad settesse, nii et kokkupuude oleks maksimaalne. Täpsemalt vt punkt 28.

**▼ M6****MEETODI KIRJELDUS****Katses kasutatavad liigid**

22. Katse tegemiseks võib kasutada mitut veekeskkonna väheharjasusside liiki. Kõige sagedamini kasutatavad liigid on loetletud 6. liites.
23. Mürgisuskatseid (96 tundi, üksnes vees) tuleks teha korrapäraste ajavahe-  
mike järel (nt kord kuus) võrdlusainega nagu kaaliumkloriid (KCl) või vask-  
sulfaat ( $\text{CuSO}_4$ ) (1) selleks, et saada teavet katseloomade terviseseisundi  
kohta (1, 6). Kui kontroll-mürgisuskatset korrapäraste ajavahe-  
mike järel ei  
tehta, tuleks sette bioakumulatsiooni katses kasutatavate loomade partiid  
kontrollida võrdlusaine abil. Lipiidisisalduse määramine võib samuti anda  
kasulikku teavet loomade seisundi kohta.

*Katses kasutatavate loomade kasvatamine*

24. Bioakumulatsiooni katsete tegemiseks piisava arvu usside saamiseks võib  
usse pidada labori alalises ühe-liigi-kultuuris. Valitud katseloomaliikide  
laboris kasvatamise meetodid on esitatud 6. liites. Üksikasjade kohta vt  
viited (8, 9, 10, 18, 28, 29, 30, 31, 32).

**Seadmed**

25. Tuleks olla tähelepanelik, et vältida seadmete kõigis osades selliste materja-  
lide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat ainet adsorbeerida või muid  
kemikaale eraldada ning avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Võib  
kasutada tavapäraseid riskikülükukujulisi või silindrilisi kambreid, mis on  
valmistatud keemiliselt inertsest materjalist ja on sobiva mahuga katseusside  
paigutamiseks vastavalt lubatud koormuse määrale. Tuleks vältida pehmest  
plastikust torude kasutamist vee ja õhu lisamiseks. Katse kasvukeskkonnaga  
kokkupuutuvates seadmetes tuleks kasutada polütetrafluoroetüleen, rooste-  
vaba teras ja/või klaasi. Suure adsorptsioonikoefitsiendiga ainete korral  
(näiteks sünteetilised püretroidid) võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi.  
Sellistel juhtudel tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata (5). Radioak-  
tiivse märgisega uuritava aine ja lenduva aine puhul tuleks olla hoolikas, et  
vältida uuritava aine väljapuhumist ja väljapuhutud uuritava aine kaotsimi-  
neket. Tuleb kasutada püüdureid (nt sobiva absorbendiga klaasist gaasipesu-  
pudelit), mis peab kinni katsekambritest aurustunud jäägid (11).

**Vesi**

26. Kattev vesi peab olema sellise kvaliteediga, mis tagab valitud katseloomaliigi  
ellujäämise aklimatsiooni- ja katseperioodide vältel, ilma et tekiks mingeid  
ebanormaalse välimuse või käitumise ilminguid. Katva veena katsete ajal ja  
ka usside laborikultuuris pidamisel soovitatakse kasutada taastatud vett  
vastavalt katsemeetodile C.1 (25). On näidatud, et sellises vees saavad  
mitmed katseliigid ellu jääda, kasvada ja paljuneda (8) ning seejuures on  
tagatud katse- ja kasvatustingimuste maksimaalne standardsus. Kasutatud vee  
kohta tuleks teatada vähemalt pH, elektrijuhtivus ja karedus. Kasulikku  
teavet peaks andma vee mikrosaasteainete määramine enne kasutamist (4.  
liide).
27. Katseperioodi kestel peaks vesi olema konstantse kvaliteediga. Katva veekihi  
pH peaks olema vahemikus 6–9. Vee üldkaredus peaks katse alguses olema  
vahemikus 90–400 mg  $\text{CaCO}_3$  liitris (7). Kõnealuse taastatud vee pH ja

▼ **M6**

kareduse vahemikud on esitatud katsemeetodis C.1 (25). Kui võib kahtlustada mingit vastastikust mõju karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine vahel, tuleks kasutada väiksema karedusega vett. 4. liites on esitatud täiendavad kriteeriumid lahjendusvee vastuvõetavaks tunnistamiseks vastavalt OECD katsejuhendile 210 (34).

**Sete**

28. Katses kasutatav sete peab olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseorganismidel selles elada ja eelistatavalt paljuneda aklimatiseerumise ja katse ajavahemike vältel, ilma et neil tekiks ebatavalisi muutusi välimuses või ebatavalist käitumist. Ussid peaksid saama settesse kaevuda. Katseorganismide kaevumiskäitumine võib mõjutada kokkupuudet uuritava ainega ja seega BAFi väärtust. Seega tuleks jälgida sette vältimist katseloomade poolt ja nende kaevumiskäitumist, kui katva veekihi hügusus võimaldab vaatlusi, ning kanda vaatluste tulemused protokollis. Kontroll- ja kokkupuuterühmade ussid peaksid kaevuma settesse 24 tunni jooksul pärast nende lisamist katse nõudesse. Kui märgatakse, et ussid püsivalt settesse ei kaevu või väldivad setet (näiteks on selliseid usse üle 20 %, kui möödunud on üle poole omastamisfaasist), siis näitab see, et kas ei ole katsetingimused sobivad või ei ole katseloomad terved või põhjustab sellist käitumist uuritav aine. Sellisel juhul tuleks katse peatada ja seda tuleks korrata paremates tingimustes. Täiendavat teavet sette allaneelamise kohta saab publikatsioonides (35, 36) kirjeldatud meetoditest, milles täpsustatakse sette allaneelamist või osakeste valimist katseorganismide poolt. Kui seda on võimalik vaadelda, siis vähemalt sette allaneelamisele osutavate fekaaliterade olemasolu või puudumine sette pinnal tuleks registreerida ja seda tuleb arvesse võtta katse tulemuste tõlgendamisel, kuna see annab teavet usside ja uuritava aine kokkupuuteteede kohta.
29. Katsetes ja usside laborikultuurides (5. liide) soovitatakse kasutada tehissetet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (40) kirjeldatud tehismullal, kuna vajaliku kvaliteediga looduslik sete ei pruugi kogu aasta jooksul olla kättesaadav. Lisaks võib looduslikus settes olla oma fauna ja ka mikroaastained, mis võivad mõjutada katse tulemusi. Mitmed katseliigid jäävad tehissetes ellu, kasvavad ja paljunevad (8).
30. Tehissete kohta esitatakse vähemalt järgmine teave: koostisosade päritolu, osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), veesisaldus ja pH. Redokspotentsiaal mõõdetakse vajaduse korral. Ent ka reostamata kohast pärit looduslikku setet võib kasutada nii katse tegemisel kui ka katseloomade kasvatamisel (1). Loodusliku sette kirjeldamisel tuleks esitada vähemalt järgmised andmed: päritolu (võtmise koht), pH, poorivee ammoniaagisisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent) ja veesisalduse protsent (6). Enne loodusliku sette rikastamist uuritava ainega on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus, kui eeldatakse ammoniaagi tekkimist. Selle konditsioneerimisperioodi lõpus tuleks kattev veekiht eemaldada ja ära visata. Sette või selle koostisosade mikroaastainete analüüsi tegemine enne kasutamist peaks andma kasulikku teavet.

*Valmistamine*

31. Loodusliku sette käitlemist enne laboris kasutamist on kirjeldatud publikatsioonides (1, 6, 44). Tehissete valmistamist on kirjeldatud 5. liites.



**▼ M6***Säilitamine*

32. Loodusliku sette säilitamisaeg laboris peaks olema võimalikult lühike. Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseagentuur soovib (6) seda säilitada kuni 8 nädalat  $4 \pm 2$  °C juures pimedas. Säilitamislõus ei tohiks sette kohal olla vabaruumi. Soovitused tehissete säilitamiseks on esitatud 5. liites.

**Uuritava aine lisamine**

33. Sete rikastatakse uuritava ainega. Rikastamisel kaetakse üks või mitu sette koostisosa uuritava ainega. Näiteks kvartslüüva või osa sellest (nt 10 g kvartslüüva katsenõu kohta) võib immutada sobivas lahustis lahustatud uuritava ainega; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Ainega kaetud komponendi saab seejärel segada niiske sette sisse. Sete valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja lüüva segust pärit lüüva, s.o sete tuleks siis valmistada väiksema lüüvakogusega (6).
34. Kui kasutatakse looduslikku setet, võib uuritavat ainet lisada sette õhu käes kuivatatud osa rikastamise teel, nagu on kirjeldatud eespool tehissete puhul, või uuritava aine ja niiske sette segamisega, kasutades seejärel aurustamise etappi (kui kasutatakse lahustit). Sobivad lahustid märja sette rikastamisel on etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool (5, 34). Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava aine lahustuvus valitud lahustis. Täiendavad juhised rikastamismeetodite kohta on esitatud publikatsioonis Environment Canada (1995) (41). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud uuritav aine oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Rikastatud settest tuleks võtta mitu osaproovi ja teha nende analüüsid, et kontrollida uuritava aine kontsentratsiooni settes ja teha kindlaks, kuivõrd ühtlane on uuritava aine jaotus.
35. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritaval ainel jaotuda settefaasi ja veefaasi vahel. Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja ainest ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel isegi kuni mitu nädalat (4–5 nädalat) (28, 42). Käesolevas katses tasakaalu saabumist ei oodata, kuid soovitatav on jätta tasakaalustumiseks 48 tundi kuni 7 päeva. Olenevalt uuringu eesmärgist võib näiteks keskkonningimuste modelleerimisel rikastatud setet tasakaalustada või vanandada pikema aja jooksul (11).

**KATSE KÄIK****Eelkatse**

36. Eelkatse on vajalik selleks, et optimeerida lõpliku katse tingimusi nagu uuritava aine kontsentratsioon(id), omastamis- ja eraldumisfaasi kestus. Eelkatse käigus tuleb jälgida usside käitumist, näiteks sette vältimist (st ussid põgenevad settest, mille põhjuseks võib olla uuritav aine ja/või sete

▼ **M6**

ise), ja kõik tähelepanekud tuleks registreerida. Sette vältimist võib kasutada ka subletaalse näitajana eelkatses, mis võimaldab hinnata uuritava aine kontsentratsiooni või kontsentratsioonivahemikku, mida tuleb kasutada bioakumulatsiooni katses.

**Kokkupuutetingimused***Omastamisfaasi kestus*

37. Katseorganismid puutuvad uuritava ainega kokku omastamisfaasi ajal. Esimene proov tuleks võtta vahemikus 4–24 tundi pärast omastamisfaasi algust. Omastamisfaasis tuleks katset jätkata, kuni on möödunud 28 päeva (1, 6, 11) või kuni saab tõendada, et juba varem on püstitunud tasakaal. Statsionaarne olek on saabunud siis, kui: i) kõigil proovivõtuaegadel on bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafik paralleelne ajateljega; ii) vähemalt kahepäevase vahega võetud proovidest määratud kolm järjestikust BAF väärtust erinevad üksteisest vähem kui  $\pm 20\%$ ; ning iii) statistiline analüüs (nt dispersioonanalüüs ja regressioonanalüüs) näitab, et kolme proovivõtuajavahemiku proovide analüüsivastustes ei ole olulisi erinevusi. Kui 28 päevaga statsionaarse olekuni ei jõuta, võib omastamisperioodi lõpetada ja alustada eraldumisfaasi;  $BAF_K$  saab arvutada omastamise ja eraldumise kiiruskonstantidest (vt ka punktid 16–18).

*Eraldumisfaasi kestus*

38. Esimene proov tuleks võtta 4–24 tundi pärast eraldumisfaasi algust, kuna alguses võib jääkide sisaldus kudedes kiiresti muutuda. Eraldumisfaas on soovitatav lõpetada, kui uuritava aine kontsentratsioon on alla 10 % statsionaarse oleku kontsentratsioonist või pärast kuni 10 päeva. Jääkide sisaldus ussides eraldumisfaasi lõpus kantakse protokollis kui eraldumatud jäägid; see on teisene otsitav näitaja. Eraldumisfaasi pikkus võib olla piiratud ajavahe-  
mikuga, mille kestel uuritava aine kontsentratsioon ussides jääb veel ülespoole analüütilisest määramispiirist.

**Katseloomad***Katses kasutatavate usside arv*

39. Usside arv proovi kohta peab olema piisavalt suur, et tagada sellise usside koemassi olemasolu, milles uuritava aine mass omastamisfaasi alguses ja eraldumisfaasi lõpus oleks oluliselt suurem uuritava aine avastamispiirist bioloogilistes materjalides. Omastamisfaasi ja eraldumisfaasi nimetatud etappides on uuritava aine kontsentratsioon tavaliselt suhteliselt väike (6, 8, 18). Kuna paljude veekeskkonna väheharjasussiliikide üksikisendi mass on väga väike (märgmass on *Lumbriculus variegatus*'e ja *Tubifex tubifex*'i puhul 5–10 mg), võib konkreetse katsekambri ussid koondada üheks prooviks kaalumise ja uuritava aine määramise jaoks. Suurema üksikisendi massiga katseliikide (nt *Branchiura sowerbyi*) puhul võib kasutada ühest isendist koosnevaid paralleelkatseid, kuid sellisel tuleks paralleelkatsete arv suurendada viieni iga proovivõtukorra kohta (11). Tuleb siiski märkida, et *B. sowerbyi*'d ei olnud laboritevahelise võrdlusuuringu (12) liikide hulgas, ja seepärast ei saa seda soovitada meetodi puhul eelistatava liigina.
40. Tuleks kasutada ühesuguse suurusega usse (*L. variegatus*'e kohta vt 6. liide). Ussid peaksid olema pärit ühest allikast ja tegemist peaks olema ühe vanuseklassi täiskasvanud või suurte loomadega (vt 6. liide). Looma mass ja vanus võivad oluliselt mõjutada BAFi väärtust (näiteks erineva lipiidisisalduse ja/või munade olemasolu tõttu); need näitajad tuleks korralikult registreerida. Usside keskmise märg- ja kuivmassi mõõtmiseks tuleks enne katse algust kaaluda usside osaproov.

▼ **M6**

41. *Tubifex tubifex*'i ja *Lumbriculus variegatus*'e puhul tuleb eeldada paljunemist katse ajal. Kui bioakumulatsiooni katse ajal paljunemist ei toimu, tuleks see registreerida ja seda tuleks arvestada katse tulemuste tõlgendamisel.

*Usside panemine katsesse*

42. Tuleks kasutada suurt sette/usside ja vee/usside suhtarvu, et viia uuritava aine kontsentratsiooni vähenemine omastamisfaasi ajal miinimumini ja vältida lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemist. Valitud koormusnorm peaks vastama ka valitud liigi looduslikule asustustihedusele (43). Näiteks *Tubifex tubifex*'i puhul soovitatakse koormusnormi 1–4 mg usside kudet (märgmass) 1 grammi märja sette kohta (8, 11). Viidetes (1) ja (6) soovitatakse *L. variegatus*'e puhul koormusnormi  $\leq$  g usside koe kuivmassi sette 50 g orgaanilise süsiniku kohta.
43. Katses kasutatavad ussid eemaldatakse nende kasvunõust selles oleva sette sõelumisega. Loomad (täiskasvanud suured isendid, kellel ei ole hiljutise jagunemise märke) viiakse üle klaasnõudesse (nt Petri tassid), milles on puhas vesi. Kui katsetingimused erinevad kultuuri kasvutingimustest, peaks ussidele piisama 24 tunni pikkusest aklimatiseerumisfaasist. Enne kaalumist tuleks liigne vesi usside küljest kõrvaldada. Selleks pannakse ussid ettevaatlikult eelnevalt niisutatud pehmele paberile. Usse ei soovitata kuivatada kuivatuspaberiga, kuna see võiks tekitada neil stressi või vigastusi. Brunson *et al.* (1998) soovitavad kasutada kuivaks tupsutamata usse, kelle mass on umbes 1,33 korda suurem kui vajalik biomass. Need täiendavad 33 % on erinevus kuivaks tupsutatud ja tupsutamata usside massi vahel (28).
44. Omastamisfaasi alguses (katse 0-päev) võetakse ussid aklimatisatsioonikambri ja jaotatakse juhuslikkuse alusel nõudesse (nt Petri tassidele), milles on taastatud vesi; usse lisatakse tassidele kahekaupa, kuni igal tassil on kümme ussi. Iga kõnealuse rühma ussid viiakse juhuslikkuse alusel üle eraldi katse-nõudesse, nt pehmete teraspintsettide abil. Katsenõusid inkubeeritakse seejärel katse tingimustes.

*Söötmine*

45. Arvestades tehissete vähest toitainesisaldust tuleks settele lisada söödaalikas. Selleks et katseorganismide kokkupuudet mitte alahinnata, näiteks neile saastamata sööda valikulise manustamise tõttu, tuleb katseloomade paljunemiseks ja kasvuks vajalik sööt lisada settesse üks kord enne uuritava kemikaali lisamist või selle lisamise ajal (vt 5. liide).

**Sette/vee suhtarv**

46. Soovitav sette/vee suhtarv on 1:4 (45). Sellist suhtarvu peetakse sobivaks, et hoida hapniku kontsentratsioon vajalikul tasemel ja vältida ammoniaagi teket katvas veekihi. Hapnikusisaldus katvas veekihi peaks pidevalt olema  $\geq$  40 % küllastuskontsentratsioonist. Katvat veekihti tuleks ettevaatlikult aereerida (nt 2–4 mulli sekundis) Pasteuri pipetiga, mis on paigutatud ligikaudu 2 cm kõrgusele sette pinnast, et setet võimalikult vähe häirida.

**▼ M6****Valgus ja temperatuur**

47. Nii kasvatamisel kui ka katses on valgustusperiood 16 tundi (1, 6). Valguse intensiivsus katse piirkonnas peaks olema umbes 500–1 000 luksit. Temperatuur peaks olema kogu katse vältel  $20 \pm 2$  °C.

**Uuritava kemikaali kontsentratsioonid**

48. Omastamise kineetika mõõtmiseks kasutatakse üht võimalikult väikest kontsentratsiooni, kuid võib kasutada veel ka teist, kõrgemat kontsentratsiooni (vt näiteks (46)). Sel juhul võetakse proovid pärast 28 päeva või statsionaarse oleku saabumist ja analüüsitakse neid, et kinnitada madalama kontsentratsiooni juures mõõdetud bioakumulatsioonitegurit (11). Suurem kontsentratsioon peaks olema valitud nii, et saab välistada kahjuliku toime (nt ligikaudu 1 % madalaimast teadaolevast kroonilise mürgisuse kontsentratsioonist  $EC_{x}$ , mis on saadud asjakohasest kroonilise mürgisuse katsest). Madalam uuritava kontsentratsioon peaks olema oluliselt suurem kui kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir settes ja bioloogilistes proovides. Kui uuritava kemikaali toimet avaldav kontsentratsioon on analüütilise tuvastuspiiri lähedal, on soovitatav kasutada radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali, millel on suur eriradioaktiivsus.

**Ainega kokkupuute katsete ja kontrollkatsete paralleelkatsed**

49. Kineetika mõõtmiseks tuleb nii omastamis- kui ka eraldumisfaasi jooksul teha vähemalt kolm paralleelset ainega kokkupuute katset iga proovivõtupunkti kohta (11). Kui tahetakse võtta täiendavaid proove katse ajal, tuleks teha ka täiendavaid paralleelkatseid. Eraldumisfaasi jaoks valmistatakse ette sobiv arv paralleelkatseid rikastamata settega ja katva veega, nii et ainega kokkupuutunud ussid saab omastamisperioodi lõpus viia ettenähtud kontsentratsiooniga nõudest rikastamata nõudesse. Ainega kokkupuutumise paralleelkatsete arv peaks olema piisav nii omastamisfaasi kui ka eraldumisfaasi jaoks.
50. Teise võimalusena võib eraldumisfaasi ajal proovide võtmiseks ettenähtud ussid panna ühte suurde nõusse, milles on sama partii rikastatud sete kui see, mida kasutatakse omastamise kineetika määramiseks. Tuleks näidata, et katse tingimused (näiteks sette sügavus, sette ja vee suhtarv, koormus, temperatuur ja vee kvaliteet) on võrreldavad omastamisfaasi puhul kasutatavate paralleelkatsete tingimustega. Omastamisfaasi lõpus tuleks sellest nõust võtta vee, setete ja usside proovid analüüsi tegemiseks ning piisav arv suuri usse, kellel ei ole hiljutise jagunemise märke, tuleks hoolikalt välja võtta ja kanda üle eraldumisfaasi jaoks ettevalmistatud paralleelkatsetesse (nt kümme katselooma igasse paralleelkatsenõusse).
51. Kui peale vee ei kasutata muud lahustit, tuleks bioloogiliste ja taustanalüüside jaoks ette näha vähemalt 9 negatiivse kontrolli paralleelkatset (vähemalt 3 võetakse proovideks alguses, 3 omastamisfaasi lõpus ja 3 eraldumisfaasi lõpus). Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse solubiliseerivat vahendit, tuleks lisaks uuritava ainega tehtavatele paralleelkatsetele teha ka lahusti kontrollrühma paralleelkatset (vähemalt 3 võetakse proovideks alguses, 3 omastamisfaasi lõpus ja 3 eraldumisfaasi lõpus). Sel juhul tuleks ette näha negatiivne (ilma lahustita) kontrollrühm nelja täiendava paralleelkatsetega proovide võtmiseks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelkatseid võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Üksikasjad on esitatud 3. liites.

▼ **M6****Vee kvaliteedi mõõtmise sagedus**

52. Katvas veekihi tuleks omastamisfaasi ja eraldumisfaasi ajal määrata vähemalt järgmised vee kvaliteedi näitajad:

temperatuur	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme ja iga proovivõtukuupäeva kohta ja ühes kontrollnõus üks kord nädalas ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus; ümbritseva keskkonna (katseruumi või vesivanni) temperatuuri või temperatuuri ühes esindavas katsenõus võib registreerida ka pidevalt või iga tunni tagant;
lahustunud hapniku sisaldus	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme kohta ja ühes kontrollnõus iga proovivõtukuupäeva kohta; väljendatakse ühikutes mg/l ja protsendina õhuga küllastumisel saadud väärtusest ( <i>air saturation value</i> , ASV);
õhu juurdevool	kontrollitakse vähemalt üks kord (töö-)päeva jooksul ja reguleeritakse vajaduse korral;
pH	ühes nõus iga kontsentratsioonitaseme ja iga proovivõtukuupäeva kohta ja ühes kontrollnõus üks kord nädalas ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus;
vee üldkaredus	vähemalt ühes uuritava ainega nõus ja ühes kontrollnõus omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus, väljendatakse CaCO <sub>3</sub> milligrammidena liitris;
ammoniaagi üldsisaldus	vähemalt ühes uuritava ainega nõus ja ühes kontrollnõus omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus; väljendatakse NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NH <sub>3</sub> või üldlämmastiku milligrammidena liitris.

**Usside, sette ja vee proovide võtmine ja analüüsimine***Proovivõtu ajakava*

53. 28-päevase omastamisfaasi ja 10-päevase eraldumisfaasi proovivõtu ajakavade näidised on esitatud 3. liites.
54. Katsekambritest võetakse vee- ja setteproov, et määrata uuritava aine kontsentratsioon enne usside lisamist ning omastamisfaasi ja eraldumisfaasi ajal. Katse ajal määratakse uuritava aine kontsentratsioonid ussides, settes ja vees, et jälgida uuritava aine jaotumist katsesüsteemi osades.
55. Usside, sette ja vee proovid võetakse vähemalt kuuel korral nii omastamisfaasi kui ka eraldumisfaasi ajal.
56. Jätkake proovide võtmist kuni platoo (statsionaarse oleku) saabumiseni (vt 1. liide) või 28 päeva jooksul. Kui 28 päevaga ei ole platooni jõutud, alustage eraldumisfaasi. Eraldumisfaasi alustamiseks kandke selleks määratud ussid paralleelkatse kambritesse, milles on rikastamata sete ja vesi (vt ka punktid 17 ja 18).

*Proovi võtmine ja proovi ettevalmistamine*

57. Dekanteerimise, sifooni või pipeti abil võetakse veest proovid, mille maht on piisav uuritava aine koguse määramiseks proovis.
58. Ülejäänud veekiht eemaldatakse katsekambritest hoolikalt dekanteerimise või sifooni abil. Sette proovid tuleks võtta ettevaatlikult, et usse võimalikult vähendada.

▼ **M6**

59. Eemaldage proovivõtmise ajaks paralleelkatsenõust kõik ussid, näiteks nii, et suspendeerite sette katvas veekihis ja kallate iga paralleelkatse laia madalasse nõusse, millelt saab ussid ära korjata pehmete teraspintsetidega. Loputage neid kiiresti veega madalas klaas- või terasnõus. Eemaldage liigne vesi. Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad. Surmake ussid külmutamise teel ( $n_t \leq -18$  °C). Registreerida tuleks kookoonite ja/või noorjärkude olemasolu ja arv.
60. Üldiselt tuleks ussid pärast proovi võtmist otsekohe kaaluda ja surmata, ootamata soolestiku tühjendamise faasi, et saada konservatiivne BAF, mis hõlmab ka saastatud soolesisaldist, ning hoida ära kehajääkide kaod, mis võiksid tekkida soolestiku tühjendamisel üksnes vees (8). Aine puhul, mille  $\log K_{ow}$  on suurem kui 5, ei ole aine eraldumine soolestiku tühjendamise aja jooksul üksnes vees tõenäoline, samas kui aine puhul, mille  $\log K_{ow}$  on väiksem kui 4, võivad kaod olla olulised (47).
61. Eraldumisfaasi ajal tühjendavad ussid oma soolestiku puhtasse settesse. See tähendab, et mõõtmisel vahetult enne eraldumisfaasi hõlmavad tulemused ka soolestikus olevat saastunud setet, kuid pärast eraldumisfaasi esimese 4–24 tunni möödumist on enamik soolestiku saastunud sisust asendatud puhta settega (11, 47). Sellises proovis võib kontsentratsiooni ussides käsitada kontsentratsioonina usside kudedes pärast soolestiku tühjendamist. Saastamata settest tingitud uuritava aine kontsentratsiooni lahjenemise arvessevõtmiseks eraldumisfaasis võib hinnata soolesisu massi selliste suhtarvudega nagu usside märgmass / usside tuha mass või usside kuivmass / usside tuha mass.
62. Kui konkreetse uuringu eesmärk on mõõta biokättesaadavust ja tegelikku jääkide sisaldust ainega kokkupuutunud katselooma kudedes, tuleks võtta vähemalt ainega kokkupuutunud katseloomade osaproov (nt kolmest täiendavat paralleelkatsenõust), eelistatavalt statsionaarse oleku ajal, see tuleks kaaluda, lasta tühjendamiseks seista puhtas vees kuni 6 tundi (47) ning kaaluda uuesti enne analüüsi. Andmeid usside massi ja aine sisalduse kohta kudedes, mis saadakse sellest osaproovist, saab siis võrrelda väärtustega, mis leiti usside puhul, kellel ei lastud soolestikku tühjendada. Ussidel, kes on ette nähtud eraldumise mõõtmiseks, ei tuleks lasta end tühjendada enne üleviimist puhtasse settesse, et mitte tekitada neile asjatut stressi.
63. Vee, sette- ja ussiproove tuleks eelistatavalt analüüsida kohe pärast eraldamist (s.o 1–2 päeva jooksul), et vältida lagunemist või muid kadusid, ja arutada juba katse vältel lühiajaksel omastamis- ja eraldumiskiirused. Kohene analüüs hoiab ära ka viivituse platoo saavutamise määramisel.
64. Kui kohene analüüs ei ole võimalik, tuleks proove säilitada sobivates tingimustes. Enne katse alustamist tuleks hankida teavet konkreetse uuritava aine stabiilsuse ja nõuetekohase säilitamise tingimuste kohta (nt säilitamistemperatuur ja -aeg, ekstraktsioonimeetodid jne). Kui selline teave ei ole kättesaadav ja seda peetakse vajalikuks, võib rikastatud kudedega teha kontrollkatse, et määrata stabiilsus säilitamisel.

*Analüüsimeetodi kvaliteet*

65. Kuna kogu meetodi täpsuse määravad peamiselt uuritava aine määramiseks kasutatava analüüsimeetodi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja tundlikkus, tuleb eksperimentaalselt kontrollida, kas keemilise analüüsi täpsus ja korratavus ning uuritava aine eraldamine vee, sette ja usside proovidest vastavad selle meetodi tingimustele. Samuti tuleks jälgida, et kontrollkatsekambrites ei

▼ **M6**

oleks uuritava aine kontsentratsioon kõrgem tausttasemest. Vajaduse korral tuleb  $C_w$ ,  $C_s$  ja  $C_a$  väärtustesse viia sisse parandid aine eraldamise puuduliku saagise ja kontrollkatsete tausttaseme arvestamiseks. Kogu katse vältel tuleb kõiki proove käidelda nii, et minimeerida saastumine ja kaod (näiteks kaod, mida tekitab uuritava aine adsorbeerumine proovivõtuseadmele).

66. Tuleks registreerida uuritava kemikaali üldsaagis, saagis ussidest, settest ja veest ning aurunud uuritava kemikaali püüdmiseks kasutatud absorbente sisaldavast püüdurist (kui kasutati) ja esitada katseprotokollis.
67. Kuna soovitatakse kasutada radioaktiivse märgisega aineid, on võimalik analüüsida kogu radioaktiivsust (st lähteainete ja lagunemissaaduste radioaktiivsus). Kui analüüsimeetod seda võimaldab, pakub olulist teavet uuritava lähtekemikaali ja metaboliitide kvantitatiivne määramine statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus. Kui kavatsetakse teha selliseid mõõtmisi, tuleks proove sobiva meetodiga ekstraheerida, et lähteühendi sisalduse saaks määrata eraldi. Kui leitud lagunemissaadus moodustab olulise protsendi ( $nt > 10\%$ ) katseloomas mõõdetud radioaktiivsusest statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus, on soovitatav selline lagunemissaadus kindlaks teha (5).
68. Väikse biomassi tõttu ei ole sageli võimalik määrata uuritava aine kontsentratsiooni igas üksikus ussis, kui katseloomana ei kasutata *Branchiura sowerbyi*'t (mille isendi märgkaal on 40–50 mg) (11). Seetõttu on lubatav koondada ühest katsenõust võetud isendid üheks prooviks, kuid see piirab statistilisi meetodeid, millega on võimalik andmeid töödelda. Kui teatud statistilist meetodit ja võimsust peetakse tähtsaks, tuleb katses kasutada piisaval arvul katseloomi ja/või paralleelseid katsekambreid, et tagada soovitud andmete koondamine ja täita statistilise meetodi ja võimsusega seotud nõudeid.
69. On soovitatav väljendada bioakumulatsioonitegur BAF nii summaarse märgmassi kui ka summaarse kuivmassi funktsioonina ning vajaduse korral (näiteks väga lipofiilse aine puhul) lipiidisisalduse ja sette orgaanilise süsiniku üldsisalduse funktsioonina. Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada sobivaid meetodeid (48, 49). Standardmeetodina (48) võib soovitada ekstraheerimist kloroformi/metanooliga (50). Klooritud lahustite kasutamise vältimiseks võiks siiski kasutada Bligh' ja Dyeri meetodi (50) muudetud versiooni (51), mis on kontrollitud laboritevahelises ringkatses. Kuna eri meetodid ei pruugi anda sama tulemust (48), on tähtis, et kasutatud meetod oleks põhjalikult kirjeldatud. Võimaluse korral, s.o kui usside kude on piisavalt, tuleks lipiidid määrata samast proovist või ekstraktist, mida kasutati uuritava aine analüüsiks, kuna lipiidid tuleb ekstraktist sageli kõrvaldada, enne kui ekstrakti on võimalik kromatograafiliselt analüüsida (5). Siiski on lipiidisisalduse mõõtmiseks otstarbekas kasutada kohanenud kontroll-loomi näiteks kolmest proovist vähemalt omastamisfaasi alguses või eelistatavalt lõpus.

## ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

**Tulemuste töötlemine**

70. Uuritava kemikaali omastamise kõvera saamiseks kantakse aritmeetilises skalas graafikule uuritava aine kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis

▼ **M6**

sõltuvana ajast. Kui kõver on jõudnud platoole, arvutage statsionaarse oleku  $BAF_{ss}$ :

$$\frac{C_a \text{ stats. olekus või 28. päeval (keskmine)}}{C_s \text{ stats. olekus või 28. päeval (keskmine)}}$$

71. Määrake kineetiline bioakumulatsioonitegur ( $BAF_K$ ) suhtena  $k_s/k_e$ . Eraldumise kiiruskonstant ( $k_e$ ) määratakse tavaliselt eraldumise kõvera alusel (s.o eraldumisfaasis ussides leiduva uuritava aine kontsentratsiooni graafikust). Omastamise kiiruskonstant  $k_s$  arvutatakse omastamiskõvera kineetikast. Kineetilise bioakumulatsiooniteguri ja kiiruskonstantide  $k_s$  ja  $k_e$  saamiseks eelistatud meetod on andmete töötlemine arvutiga, kasutades mittelinearseid parameetri hindamise meetodeid (vt 2. liide). Kui aine eraldumine selgelt ei ole esimest järku, tuleks kasutada keerukamaid mudeleid (25, 27, 52).
72. Elustiku-sette akumulatsioonitegur (*biota-sediment accumulation factor*, BSAF) määratakse  $BAF_K$  normeerimisega, võttes arvesse usside lipiidisisaldust ja sette orgaanilise süsiniku üldsisaldust.

**Tulemuste tõlgendamine**

73. Tulemuste tõlgendamisel peab olema ettevaatlik, kui katses mõõdetud kontsentratsioonitasemed on analüüsimeetodi määramispiiri ligidal.
74. Selgelt määratletud omastamis- ja eraldumiskõverad viitavad hea kvaliteediga bioakumulatsiooni andmetele. Üldiselt ei tohiks hästi kavandatud katse puhul bioakumulatsiooniteguri usalduspiirid ületada 25 % (5).

**Katseprotokoll**

75. Katseprotokollis tuleb esitada järgmine teave:

*Uuritav aine*

- füüsikaline olek ja füüsikalise-keemilised omadused, näiteks  $\log K_{ow}$ , lahustuvus vees;
- kemikaali identifitseerimisandmed; uuritava aine päritolu, kasutatud lahusti nimetus ja kontsentratsioon;
- radioaktiivse märgisega aine puhul: märgistatud aatomite täpne asukoht, eriradioaktiivsus ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent.

*Katses kasutatud liik*

- teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltöötused, aklimatiseerumine, vanus, suuruse vahemik jms.

*Katsetingimused*

- kasutatud katsemeetod (nt staatiline, poolstaatiline või läbivoolukatse);
- kasutatud valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);
- katse kava (nt katsekambrite arv, materjal ja suurus, veekihi maht, settekihi mass ja maht, veemahu asendamise kiirus (poolstaatilise või läbivoolukatse puhul), aeratsioon enne katset ja katse ajal, paralleelkatsete arv, usside arv igas paralleelkatses, uuritava aine kontsentratsioonide arv, omastamisfaasi ja eraldumisfaasi kestus, proovivõtmise sagedus);



▼ **M6**

- uuritava aine ettevalmistamise ja kasutamise meetod ning samuti konkreetse meetodi valimise põhjused;
- nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid;
- tehisevee ja -sette koostisosade allikas või looduslike keskkondade kasutamise puhul vee ja sette päritolu, eeltötluste kirjeldus, tõendid (katsetulemused) selle kohta, et katseloomad suudavad elada ja paljuneda kasutatavas keskkonnas, sette omadused (pH ja poorivee ammoniaagisisaldus (looduslik sete), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC), osakeste suurusjaotus (liiva, tolmu ja savi protsent), veesisaldus, ja muud tehtud mõõtmised) ja vee omadused (pH, karedus, elektrijuhtivus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdeti) ja muud tehtud mõõtmised);
- tehissete nominaalne ja mõõdetud kuivmass protsendina märgmassist (või kuivmassi-märgmassi suhtarv); loodusliku sette mõõdetud kuivmass protsendina märgmassist (või kuivmassi-märgmassi suhtarv);
- katsekambrites oleva vee kvaliteet: temperatuur, pH, ammoniaagisisaldus, üldkaredus ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik teave vee-, sette- ja ussiproovide töötlemise kohta, sh andmed uuritava aine ettevalmistamise, säilitamise, rikastamismeetodite, ekstraheerimis- ja analüüsimeetodite (ning täpsuse) kohta ning lipiidisisalduse kohta ja uuritava aine analüüsisaagiste kohta.

*Tulemused*

- kontrollrühma usside ja iga katsekambri usside suremus ning muu täheldatud subletaalne toime, sealhulgas ebatavaline käitumine (näiteks sette vältimine, fekaalikübemete olemasolu või puudumine, mittepaljunemine);
- sette ja katseorganismide mõõdetud kuivmassi ja märgmassi suhtarv (mis on vajalik normeerimise jaoks);
- usside lipiidisisaldus;
- kõverad, mis näitavad uuritava aine omastamise ja eraldumise kineetikat ussides ning statsionaarse olekuni jõudmiseks vajalikku aega;
- $C_a$ ,  $C_s$  ja  $C_w$  (vajaduse korral koos standardhälbe ja usaldusvahemikuga) kõikide proovivõtuaegade jaoks ( $C_a$ , g/kg, väljendatakse kogu keha märg- ja kuivmassi kohta,  $C_s$ , g/kg, väljendatakse sette märg- ja kuivmassi kohta, ja  $C_w$ , mg/l). Kui on vaja määrata elustiku-sette akumulatsioonitegur (BSAF; mõiste vt 1. liide) (näiteks eri lipiidisisaldusega loomadega tehtud katsete tulemuste võrdlemiseks), peaks  $C_a$  olema väljendatud ka g-des organismi lipiidisisalduse kg kohta ja  $C_s$  peaks olema väljendatud g-des sette orgaanilise süsiniku kg kohta;
- BAF (sette märgkaalu kg / usside märgkaalu kg), sette omastamise kiiruskonstant  $k_s$  (sette märgkaalu g / usside märgkaalu kg / päev), ja eraldumise kiiruskonstant  $k_e$  (1/päev); lisaks võib teatada ka elustiku-sette akumulatsiooniteguri BSAF (sette orgaanilise süsiniku kg / usside lipiidisisalduse kg);

**▼ M6**

- eraldumata jäänud jäägid (*non-eliminated residues*, NER) eraldumisfaasi lõpus;
- kui mõõdeti: lähteaine, lagunemissaaduste ja seotud jääkide protsent (seotud jäägid – uuritav aine, mida ei ole võimalik ekstraheerida tavaliste ekstraheerimismeetodite abil), mis on tuvastatud katseloomades;
- meetodid, mida kasutatakse andmete statistilise analüüsi jaoks.

*Tulemuste hindamine*

- tulemuste vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele, mis on loetletud punktis 21;
- ootamatud või ebatavalised tulemused, näiteks uuritava aine mittetäielik eraldumine katseloomadest; sellisel juhul kõikide varasemate uuringute tulemused, mis võivad anda kasulikku teavet.

▼ **M6***1. liide***Mõisted ja ühikud**

**Tehissete**, spetsiaalselt valmistatud sete, taastatud, või sünteetiline sete – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

**Bioakumulatsioon** – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas. Bioakumulatsioon on biokontsentratsiooni ja biomagnifikatsiooni (vt allpool) tulemus.

**Bioakumulatsioonitegur** (BAF) – uuritava aine kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismi peal ( $C_a$ , g-des'ussi märg- või kuivmassi kg kohta) kõnealuse bioakumulatsiooni katse omastamisfaasis igal ajamomendil, jagatud aine kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas ( $C_s$ , g-des sette märg- või kuivmassi kg kohta). Selleks, et BAF oleks kooskõlas  $C_a$  ja  $C_s$  ühikutega, on BAFi ühik sette kg / usside kg (15).

**Bioakumulatsioonitegureid**, mis arvutatakse otse settest omastamise kiiruskonstandi jagamisel eraldumise kiiruskonstantidega ( $k_s$  ja  $k_e$ , vt allpool), nimetatakse kineetilisteks bioakumulatsiooniteguriks (BAF<sub>K</sub>).

**Biokontsentratsioon** – uuritava aine kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas, mis tuleneb üksnes aine omastamisest keha pinna kaudu.

**Biomagnifikatsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismi peal, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga söödas või saagis, mis tuleneb peamiselt saastunud sööda või saagi kaudu omastamise teel. Biomagnifikatsioon võib viia uuritava aine ülekandumise või kogunemiseni toitumisvõrgustikes.

**Elustiku-sette akumulatsioonitegur** (BSAF) – lipiidide suhtes normeeritud uuritava kemikaali statsionaarse oleku kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil, jagatuna uuritava aine orgaanilise süsiniku suhtes normeeritud kontsentratsiooniga settes statsionaarses olekus.  $C_a$  väljendatakse siis g-des'organismi lipiidide kg kohta ja  $C_s$  g-des sette orgaanilise aine kg kohta.

**Konditsioneerimisperiood** – periood, mida kasutatakse sette mikroobse osa stabiliseerimiseks ja näiteks settekomponentide poolt eraldatava ammoniaagi eemaldamiseks; see on ajavahemik enne sette rikastamist uuritava ainega. Tavaliselt visatakse kattev veeikiht pärast konditsioneerimist ära.

Uuritava aine **eraldumine** – aine kadumine katseorganismi kudedest aktiivsete või passiivsete protsesside tõttu, mis toimivad sõltumatult uuritava aine olemasolust või puudumisest ümbritsevas kasvukeskkonnas.

**Eraldumisfaas** – aeg, mis järgneb katseorganismide ülekandmisele uuritava ainega rikastatud kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda, mille vältel uuritakse aine eraldumist (või netokadu) katseorganismidest.

**Eraldumise kiiruskonstant** ( $k_e$ ) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis pärast katseorganismide ülekandmist uuritavat ainet sisaldavast kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda;  $k_e$  ühik on  $d^{-1}$  (kus  $d$  = päev).

**▼ M6**

**Tasakaalustamisega** kasutatakse selleks, et lasta uuritaval ainel jaotuda tahke faasi, poorivee ja katva veekihi vahel; see toimub pärast sette rikastamist uuritava ainega ja enne katseorganismide lisamist.

**Oktanooli-vee jaotuskoefitsient** ( $K_{ow}$ ) – aine *n*-oktanoolis ja vees lahustuvuse suhe tasakaaluolekus; vahel tähistatakse seda jaotuskoefitsienti ka  $P_{ow}$ -ga.  $K_{ow}$  logaritmi ( $\log K_{ow}$ ) kasutatakse kui aine veeorganismidesse kogunemise (bioakumulatsiooni) võime üht näitajat.

**Orgaanilise süsiniku-vee jaotuskoefitsient** ( $K_{oc}$ ) – tasakaaluolekut iseloomustav suhtarv, mille leidmiseks jagatakse aine kontsentratsioon mulla orgaanilise süsiniku fraktsioonis/fraktsioonil aine kontsentratsiooniga vees.

**Kattev veekiht** – vesi, mis on katsenõus sette peal.

**Platoo** või **statsionaarne olek** – määratletud kui tasakaaluolek omastamise ja eraldumise protsesside vahel, mis toimuvad kokkupuutefaasis ühel ja samal ajal. Statsionaarne olek bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafikul on saavutatud siis, kui kõver on igal proovivõtuajal ajateljega paralleelne ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud proovide bioakumulatsiooniteguri kolme järjekordse analüüsi tulemused on üksteise suhtes 20 % piires ning kolme proovivõtu ajavahemiku vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. Uuritava kemikaali puhul, mida omastatakse aeglaselt, oleksid sobivamad seitsmepäevased ajavahemikud (5).

**Poorivesi** – vesi, mis asub sette- või mullaosakeste vahelises ruumis.

**Settest omastamise kiiruskonstant** ( $k_s$ ) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirus katseorganismis/katseorganismi peal, mille on põhjustanud omastamine settefaasist;  $k_s$  mõõdetakse g setteid kg usside ja päeva kohta.

**Rikastatud sete** – sete, millele on lisatud uuritavat ainet.

**Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur** ( $BAF_{ss}$ ) – bioakumulatsioonitegur statsionaarse oleku puhul, see ei muutu oluliselt pika ajavahemiku jooksul; uuritava aine kontsentratsioon ümbritsevas kasvukeskkonnas ( $C_s$ , g-des sette märg- või kuivmassi kg kohta) on selle ajavahemiku vältel konstantne.

**Omastamis- või kokkupuutefaas** – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava ainega.

▼ **M6**

## 2. liide

**Omastamise ja eraldumise parameetrite arvutamine**

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsiooniteguri saab mõõtmistulemustest arvutada, kui jagada statsionaarses olekus uuritava aine kontsentratsioon katseorganismis  $C_a$  uuritava aine kontsentratsiooniga settes  $C_s$ . Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, arvutatakse bioakumulatsioonitegur samal viisil 28. päeva jaoks. Siiski tuleks ära märkida, kas bioakumulatsioonitegur põhineb statsionaarse oleku kontsentratsioonidel või mitte.

Tavapärane meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri ( $BAF_K$ ), settest omastamise kiiruskonstandi ( $k_s$ ) ja eraldumise kiiruskonstandi ( $k_e$ ) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid. Kui meil on keskmiste akumulatsioonitegurite aegrida ( $C_a$ , keskmised väärtused igal proovivõtu kuupäeval /  $C_s$ , keskmised väärtused igal proovivõtu kuupäeval = AF) omastamisfaasis, mis põhineb usside ja sette märgkaalul, ning mudeli võrrand

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{võrrand 1}]$$

kus  $AF(t)$  on suhtarv, mille saamiseks jagatakse uuritava aine kontsentratsioon ussides uuritava aine kontsentratsiooniga settes omastamisfaasi igal ajahetkel  $t$ , saab arvutiprogrammidega arvutada  $BAF_K$ ,  $k_s$  ja  $k_e$  väärtused.

Kui omastamisfaasi vältel jõutakse statsionaarse olekuni (s.o  $t = \infty$ ), võib võrrandi 1 lihtsustada järgmiselt:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{võrrand 2}]$$

kus

$k_s$  = kudedesse omastamise kiiruskonstant [g setteid kg usside ja päeva kohta];

$k_e$  = eraldumise kiiruskonstant [ $d^{-1}$ ]

Sel juhul on  $k_s/k_e \times C_s$  üks lähenemisviis uuritava aine kontsentratsiooni leidmiseks usside kudedes statsionaarses olekus ( $C_{a,ss}$ ).

Elastiku-sette akumulatsioonitegur (BSAF) tuleks arvutada järgmiselt:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kus  $f_{oc}$  on sette orgaanilise süsiniku fraktsioon ja  $f_{lip}$  on usside lipiidifraktsioon, mis on mõlemad kas kuivmassi või märgmassi kohta.

Kui meil on kontsentratsiooni väärtuste aegrida, saab eraldumise kineetikat modelleerida järgmiste mudeli võrranditega ja parameetrite mittelineaarse hindamise programmi abil.

Vaikimisi soovitatakse lähtepunktiks võtta mõõdetud keskmine jääkide kontsentratsioon usside kehas omastamisfaasi lõpus. Omastamisfaasist modelleeritud/hindatud väärtust tuleks kasutada üksnes siis, kui näiteks mõõdetud väärtus erineb oluliselt mudelile vastavast aine sisaldusest kehas. Vt ka punkt 50, aine eraldumise uurimiseks määratud usside alternatiivne eelnev kokkupuude; selle lähenemisviisi puhul loetakse, et eelnevalt ainega kokkupuutunud usside proovid eraldumisfaasi 0-päeval annavad kehas sisalduva ainekoguse realistliku väärtuse, millest siis algab eraldumise kineetika.

▼ **M6**

Kui aja järgi graafikule kantud andmepunktid näitavad pidevat eksponentsiaalset uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist loomades, võib ajast sõltuva eraldumise kirjeldamiseks kasutada ühe-osa-mudelit (võrrand 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{võrrand 3}]$$

Eraldumisprotsessid näivad vahel olevat kahefaasilised: eraldumisaasi alguses väheneb  $C_a$  kiiresti, kuid hiljem, eraldumise hilisemates järkudes muutub uuritava aine kadu aeglasemaks, vt näiteks (8, 19, 25). Kahte faasi on võimalik tõlgendada eeldusega, et organismis on kaks eraldi osa, millest uuritav aine kaob erineva kiirusega. Neil juhtudel tuleks vaadata asjakohaseid publikatsioone, näiteks (15, 16, 17, 25).

Kahest osast eraldumist saab näiteks kirjeldada järgmise valemi abil (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{võrrand 4}]$$

A ja B on osade suurused (protsendina kudedes olevate ainejääkide üldsisaldusest), kus A on osa, millest aine kaob kiiresti, ja B on osa, milles aine sisaldus väheneb aeglaselt. A ja B summa võrdub 100 protsendiga looma osade üldmahust stacionaarses olekus.  $k_a$  ja  $k_b$  kujutavad endast vastavaid eraldumise kiiruskonstante [ $d^{-1}$ ]. Kui eraldumise kineetikat kirjeldatakse kahe osa mudeliga, võib omastamise kiiruskonstandi  $k_s$  määrata järgmiselt: (53, 54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [\text{võrrand 5}]$$

Sellest hoolimata tuleks selliseid mudelvõrrandeid kasutades olla ettevaatlik, eelkõige kui katse ajal võib muutuda uuritava aine biosaadavus (42).

Alternatiivina eespool esitatud mudelvõrranditele võib kineetilised parameetrid ( $k_s$  ja  $k_e$ ) arvutada ka korraga, kohaldades esimese järgu kineetika mudelit korraga kõigile omastamisfaasi ja eraldumisaasi andmetele. Omastamise ja eraldumise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arutamise meetodi kirjeldus on esitatud publikatsioonides (55, 56 ja 57).

Eraldumata jäänud jäägid (*Non-Eliminated Residues*, *NER*) tuleks arvutada teisese olulise näitajana; selleks korrutatakse keskmine kontsentratsioon ussides ( $C_a$ ) eraldumisaasi 10. päeval, mis on jagatud keskmise kontsentratsiooniga ussides stacionaarses olekus (omastamisfaasi 28. päeval) ( $C_a$ ), 100-ga:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination(average)} \times 100}{C_a \text{ at steady state(average)}}$$

▼ **M6**

## 3. liide

**Proovivõtu ajakava näide 28-päevase bioakumulatsiooni katse puhul****a) omastamisfaas (sealhulgas 4-päevane tasakaalustumisfaas)**

Päev	Tegevused
– 6	Turbasuspensiooni ettevalmistamine sette tegemiseks; suspensiooni konditsioneerimine 48 h vältel.
– 4	Sette või settefraktsiooni rikastamine uuritava ainega; sette kõigi koostisosade segamine; setteproovide võtmine ainega töödeldud settest ja lahusti kontrolli settest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; katva veekihi lisamine; inkubeerimine katsetingimustes (tasakaalustamisfaas).
– 3/– 2	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks.
0	Vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud vee- ja setteproovide võtmiseks ning uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks; usside jaotamine juhuslikkuse alusel katsekambritesse; piisava arvu usside alaproovide võtmine analüüsi taustnäitajate määramiseks. Õhuga varustatuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud proovide võtmiseks; kontrollitakse õhuga varustatust, usside käitumist ja vee kvaliteeti (vt punkt 56); võetakse vee-, sette- ja usside proovid uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Õhuga varustatuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
3	Sama kui päeval 1.
4–6	Sama kui päeval 2.
7	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
8–13	Sama kui päeval 2.
14	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
15–20	Sama kui päeval 2.
21	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
22–27	Sama kui päeval 2.
28	Sama kui päeval 1; vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); omastamisfaasi lõpp; usside piisavate alaproovide säilitamine analüüsi taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; usside ülekandmine allesolevatest kemikaaliga kokkupuute paralleelkatsetest eraldumisfaasi jaoks puhast setet sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); vee-, sette- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades; proovide võtmine püüdlahustest, kui neid kasutatakse.
	Kokkupuute-eelsete tegevuste (tasakaalustamisfaasi) ajakava tuleks määrata aine omaduste põhjal. Vajaduse korral tuleb ettevalmistatud setet konditsioneerida katva veekihi all temperatuuril $20 \pm 2$ °C juures 7 päeva; sellisel juhul tuleb sette tegemist alustada varem.
	Päeva 2 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼ **M6**b) **Eraldumisfaas**

Päev	Tegevused
– 6	Turbasuspensiooni ettevalmistamine sette tegemiseks; suspensiooni konditsioneerimine 48 h vältel.
– 4	Sette kõigi koostisosade segamine; ainega töödeldud settest ja lahusti kontrolli settest setteproovide võtmine uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; katva veekihi lisamine; inkubeerimine katse tingimustes.
0 (omastamisfaasi 28. päev)	Vee kvaliteedi mõõtmise (vt punkt 52); usside ülekandmine allesolevatest ainega kokkupuute paralleelkatsetest puhast setet sisaldavatesse nõudesse; <b>4–6 tundi</b> hiljem kõrvaldatakse paralleelkatsed, mis on ette nähtud vee-, sette- ja usside proovide võtmiseks, et määrata uuritava aine kontsentratsioon; usside jaotamine juhuslikkuse alusel katsekambritesse.
1	Kõrvaldatakse paralleelkatsed proovide võtmiseks; kontrollitakse õhuga varustatust, usside käitumist ja vee kvaliteeti (vt punkt 52); võetakse vee-, sette- ja usside proovid uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Õhuga varustatuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
3	Sama kui päeval 1.
4	Sama kui päeval 2.
5	Sama kui päeval 1.
6	Sama kui päeval 2.
7	Sama kui päeval 1; vajaduse korral lisatakse vett aurustumise kompenseerimiseks.
8–9	Sama kui päeval 2.
10	Sama kui päeval 1; eraldumisfaasi lõpp; vee kvaliteedi mõõtmine (vt punkt 52); vee-, sette- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades; proovide võtmine püüdlahustest, kui neid kasutatakse.
	Sette ettevalmistamine enne eraldumisfaasi tuleks teha samal viisil kui enne omastamisfaasi.
	Päeva 2 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).



▼ **M6**

## 4. liide

**Mõned lahendamiseks sobiva vee füüsikalised-keemilised omadused**

KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOONID
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 µg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaanilised pestitsiidid, üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

## TAASTATUD VEE SOOVITATAV KOOSTIS

## a. Kaltsiumkloriidi lahus

Lahustage 11,76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitri.

## b. Magneesiumsulfaadi lahus

Lahustage 4,93 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitri.

## c. Naatriumvesinikkarbonaadi lahus

Lahustage 2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitri.

## d. Kaaliumkloriidi lahus

Lahustage 0,23 g  $\text{KCl}$  deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitri.

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsi puhtad.

Destilleeritud või deioniseeritud vee juhtivus ei tohiks ületada  $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

25 ml iga lahust a kuni d segatakse ja ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitri. Selles lahuses on kaltsium- ja magneesiumioonide kontsentratsioonide summa 2,5 mmol/l.

Ionide suhtarv Ca:Mg on 4: 1 ning Na:K on 10:1. Selle lahuse puhvermahtuvus happe neutraliseerimisel  $K_{\text{S}4,3}$  on 0,8 mmol/l.

Lahendusveet aereeritakse, kuni on saavutatud vee küllastumine hapnikuga, seejärel hoitakse seda enne kasutamist umbes kaks päeva ilma edasise aereerimiseta.

Sobiva lahendusvee pH peaks olema vahemikus 6–9.

▼ **M6**

## 5. liide

**Tehissete – soovitud valmistamise ja säilitamise kohta**

Erinevalt katsemeetodist C.8 (40), milles soovitatakse tehissetes kasutada turbasisaldust 10 % kuivmassist, kasutatakse käesolevas meetodis tehissetes turbasisaldust 2 %, et see vastaks looduslike setete väiksele kuni keskmisele orgaanilise aine sisaldusele (58).

Kuivkomponentide protsendiline sisaldus tehissetes:

Koostisosa	Kirjeldus	% kuivas settes
Turvas	Turbasamblaturvas, lagunemisaste: „keskmine”, õhu käes kuivatatud, ilma nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud (osakese suurus $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Kvartslüiv	Tera suurus: $\leq 2$ mm, kuid $> 50$ % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 $\mu\text{m}$	76
Kaoliinsavi	Kaoliinisisaldus $\geq 30$ %	$22 \pm 1$
Söödaallikas	<i>Folia urticae</i> , <i>Urtica</i> sp. (kõrvenõgese) peeneks jahvatatud lehed (osakese suurus $\leq 0,5$ mm), või <i>Urtica</i> sp. jahvatatud lehed segus $\alpha$ -tselluloosiga (1: 1); vastavalt farmaatsia nõuetele ja inimtervishoiu ettenähtud kvaliteediga; lisaks kuivale settele	0,4–0,5 %
Kaltsiumkarbonaat	$\text{CaCO}_3$ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas, lisaks kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Juhtivus $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$ , lisaks kuivale settele	30–50

Kui võib eeldada suurevat ammoniaagisisaldust, näiteks kui uuritav aine on teadaolevalt nitrifikatsiooni inhibiitor, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikast nõgesepulbrit tselluloosiga (nt  $\alpha$ -tselluloosi pulber, keemiliselt puhas, osakese suurus  $\leq 0,5$  mm).

**Valmistamine**

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks (tera suurus on  $\leq 0,5$  mm, nähtavad taimeosad puuduvad). Vajalik kogus turbapulbrit suspendeeritakse deioniseeritud vees, mis lisatakse kuivale settele (on leitud, et kui veekogus ületab turba kuivmassi 11,5 korda, saadakse hästi segatav turbakört (8)), kasutades tõhusat homogenisaatorit.

Selle suspensiooni pH reguleeritakse  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $5,5 \pm 0,5$ . Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril  $20 \pm 2$  °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent. Segu pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $6,0 \pm 0,5$ . Seejärel segatakse kogu suspensioon muude kuivade koostisosadega, võttes arvesse koostisosi, mida kasutati rikastamiseks. Lisatakse ülejäänud deioniseeritud vesi, et saada homogeenne sete. pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral  $\text{CaCO}_3$  abil vahemikku  $6,5$ – $7,5$ . Kui eeldatakse ammoniaagi moodustumist, võib olla kasulik hoida sademe pH allpool 7,0 (nt 6,0 ja 6,5 vahel). Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Kui eeldatakse ammoniaagi moodustumist, võib tehissetet konditsioneerida seitse päeva samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus (nt sette-vee suhe 1:4, settekihi paksus samasugune kui katsenõudes) enne, kui setet hakatakse rikastama uuritava ainega, st see peab olema kaetud veega, mida tuleb aereerida. Konditsioneerimisperioodi lõpus tuleks kattev veekiht eemaldada ja ära visata. Võetakse sette proovid (nt kolm proovi), et määrata kuivmass ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus.

**▼ M6**

Seejärel segatakse iga kontsentratsioonitaseme settesse rikastatud kvartsliv, sete jaotatakse paralleelkatsenõudesse ja lisatakse kattev veeikiht (nt sette-vee suhe 1:4 settekihi paksus samasugune kui katsenõudes). Nõusid inkubeeritakse seejärel samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. See on tasakaalustumisperioodi algus. Katvat veeikihti tuleks aereerida.

Valitud söödaallikas tuleks lisada enne sette rikastamist uuritava ainega või rikastamise ajal. Selle võib kohe alguses segada turbasuspensiooniga (vt eespool). Söödaallika liigset lagunemist enne katseloomade lisamist, nt pika tasakaalustamisperioodi ajal, saab vältida aga sellega, et aeg söödaallika lisamise ja kokkupuute alguse vahel tehakse võimalikult lühikeseks. Selleks et tagada sööda piisav kokkupuude uuritava ainega, tuleks söödaallikas segada settega hiljemalt sel päeval, kui sete rikastatakse uuritava ainega. Erandeid võib teha juhul, kui tasakaalustumisperioodi pikkuse tõttu jõuaks liiga suur osa söödast mikroobselt laguneda enne katseorganismide lisamist. Võetakse sette proovid (nt kolm proovi rikastatud settest või kontrollkatsest), et määrata kuivmass ja orgaanilise süsiniku üldsisaldus.

Muude koostisainete (turvas, liiv, kaoliin) kuivmass tuleks esitada grammides ja massiprotsendina kogu kuivainest.

Kuivkomponentidele sette valmistamise ajal lisatava vee ruumala tuleks samuti esitada protsendina kuivaine üldmassist (nt 100 % kuivmassi + 46 % vett tähendab, et 1 000 g kuivmassile lisatakse kokku 460 ml vett, mille tulemusena saadakse 1 460 g märga setet).

**Säilitamine**

Tehisliku sette kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Valmistatud märga setet võib säilitada (üksnes edasiseks kasutamiseks katseloomade kasvukultuuris)  $4 \pm 2$  °C juures pimedas 2–4 nädalat alates valmistamise päevast (8).

Uuritava ainega rikastatud setet tuleks kasutada viivitamata, v.a juhul, kui on andmeid selle kohta, et konkreetset setet saab säilitada ilma uuritava aine mürgisust ja biosaadavust mõjutamata. Rikastatud sette proove võib säilitada kuni analüüsini konkreetse uuritava aine jaoks soovitatavates tingimustes.

▼ **M6**

## 6. liide

**Bioakumulatsiooni uurimiseks soovitatavad väheharjasusside liigid****Harilik mudatupp (*Tubifex tubifex* (MÜLLER)), mudatuplaste sugukond (*Tubificidae*), alamklass väheharjasussid (*Oligochaeta*)**

Väheharjasusside (*Oligochaeta*) hulka kuuluva mudatuplaste perekonna (*Tubificidae*) esindaja harilik mudatupp *Tubifex tubifex* (Müller) elab mageveesetetes torudes, mis on vooderdatud limaga. Mudatupp elab nendes torudes pea alaspidi, neelates setteosakesi ja kasutades nende küljes olevaid mikroorganisme ja orgaanikapudemeid. Mudatupe keha tagumine osa tavaliselt lookleb katvas veekihi, et hõlbustada hingamist. Kuigi see liik elutseb paljudes settetüüpides üle kogu põhjapoolkera, eelistab mudatupp suhteliselt peeneteralist muda (59). Selle liigi sobivust ökotoksikoloogilisteks katseteks on kirjeldatud näiteks järgmistes publikatsioonides (8, 29, 31, 39, 60, 62, 63).

*Kultuuris pidamise meetodid*

Bioakumulatsiooni katsete tegemiseks piisava arvu mudatuppede (*Tubifex tubifex*) saamiseks võib usse pidada laboris püskikultuuris. Mudatupe kultuuris pidamiseks soovatakse (8) katsemeetodis C.8 (40) kirjeldatud tehismullal ja katsemeetodis C.1 kirjeldatud taastatud veel põhinevat süsteemi.

Kultuuri saab pidada klaasist või roostevabast terasest mahutites, mille kõrgus on 12–20 cm. Igasse kultuurinõusse pannakse kiht märga tehissetet, mille valmistamist on kirjeldatud 5. liites. Settekihi paksus peaks võimaldama ussidel järgida oma tavalist kaevamiskäitumist (mudatupel vähemalt 2 cm). Süsteemi lisatakse taastatud vett. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida sette häirimist. Veefaasi aereeritakse kergelt (nt 2 mulli sekundis läbi 0,45 µm filtri lastud õhku) Pasteuri pipeti abil, mis on paigutatud 2 cm kõrgemale sette pinnast. Kultuuri soovitatav temperatuur on 20 ± 2 °C.

Ussid lisatakse kultuurisüsteemi maksimumkoormusega 20 000 isendit sette pinna ruutmeetri kohta. Suurem koormus võib põhjustada kasvu- ja paljunemiskiiruse vähenemist (43).

Tehissete kultuuris tuleb usse sööta. Täiendavaks söödaallikaks sobib peeneks jahvatatud kalasööt TetraMin® (8); Klerks 1994, erakirjavahetus. Söötmine peaks olema piisav kasvu ja paljunemise tagamiseks ning hoidma ammoniaagi kuhjumise ja seente kasvu minimaalse. Sööta võib lisada kaks korda nädalas (nt 0,6–0,8 mg sette pinna ruutsentimeetri kohta). Praktilised kogemused on näidanud, et ühtlast sööda jaotumist kultuurinõus üle kogu sette pinna aitab tagada deioniseeritud vees valmistatud ja homogeenitud söödaspensiooni kasutamine.

Ammoniaagi kuhjumise vältimiseks tuleks katvat veekihti vahetada läbivoolusüsteemi kasutamisega või vähemalt üks kord nädalas käsitsi. Setet tuleks tüvikultuuris vahetada iga kolme kuu tagant.

Usside proovide võtmiseks kultuurist võib kultuuri setet sõeluda läbi 1 mm avadega sõela, kui vaja on üksnes täiskasvanud usse. Kookonite kinnipidamiseks on vaja kasutada 0,5 mm avaga sõela ja noorjärkude kinnipidamiseks 0,25 mm avaga sõela. Sõelad võib panna taastatud vette pärast seda, kui sete on neist läbi läinud. Ussid lahkuvad sõelalt ja neid võib siis noppida veest pehmete teraspintsettide või tulele poleeritud otsaga pipeti abil.

▼ **M6**

Katse tegemiseks või uue kultuuri alustamiseks kasutatakse üksnes vigastamata ja kindlalt määratud mudatupe *Tubifex tubifex* isendeid (vt näiteks (64)). Haiged või vigastatud ussid, samuti seeneniitidega nakatunud kookonid tuleb ära visata.

Sünkroniseeritud kultuurist võib saada teatud vanuses usse sobivate ajavahemike järel, kui soovitakse. Uued kultuuri kasvunõud seatakse valmis valitud ajavahemike järel (nt iga kahe nädala tagant) ja alustatakse teatavas vanuses loomadest (nt kookonitest). Siin kirjeldatud kasvatustingimuste puhul saavad ussid täiskasvanuks 8–10 nädala pärast. Kultuurist saab hakata usse võtma, kui ussid on munenud uued kookonid, näiteks kümne nädala pärast. Võetud täiskasvanud usse saab kasutada katsete tegemiseks ja kookoneid võib kasutada uue kultuuri alustamiseks.

**Rabeliimukas (*Lumbriculus variegatus* (MÜLLER)), sugukond rabeliimuklased (*Lumbriculidae*), alamklass väheharjasussid (*Oligochaeta*)**

Rabeliimukas *Lumbriculus variegatus* (*Lumbriculidae*, *Oligochaeta*), elab samuti mageveesetetes üle kogu maailma ja seda kasutatakse laialdaselt ökotoksikoloogiatsetes. Teavet tema bioloogia, kasvatustingimuste ja tundlikkuse kohta võib saada publikatsioonidest (1, 6, 9, 36). Rabeliimukat võib samuti kasvatada mudatupe jaoks soovitatud tehissetes (8), kuid on teatavad piirangud. Kuna looduses eelistab rabeliimukas jämedamat setet kui mudatupp, võib rabeliimuka kultuur mudatupe puhul kasutatud settes 4–6 kuu pärast välja surra. Praktilised kogemused on näidanud, et rabeliimukat võib kasvatada liivasel põhjal/substraadil (nt kvartslüü, peen kruus) läbivooluga süsteemis, kasutades söödaallikana kalasööta mitu aastat järjest, ilma substraati uuendamata. Rabeliimuka suur eelis muude vee väheharjasussiliikide ees on kiire paljunemine, mille tulemusena laborikultuuri biomass suureneb kiiresti (1, 6, 9, 10).

*Kultuuris pidamise meetodid*

Rabeliimuka kasvatustingimused on üksikasjalikult esitatud järgmistes publikatsioonides: Phipps *et al.* (1993) (10), Brunson *et al.* (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Lühike kokkuvõte neist on esitatud allpool.

Usse saab kasvatada suures akvaariumis (57–80 l) 23 °C juures, valgustusperiood 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust (valgustatus 100–1 000 luksit), kasutades iga päev vahetatavat looduslikku vett (45–50 liitrit akvaariumi kohta). Substraat valmistatakse pleegitamata pruunide paberrätikute lõikamisega ribadeks, mida võib seejärel mõne sekundi jooksul segada kultuuris kasutatava veega, et saada väiksed pabersubstraadi tüki. Seda substraati saab otse kasutada rabeliimuka kasvatamiseks akvaariumis, kui laotada see nõu põhjale, või seda võib säilitada külmutatult deioniseeritud vees hilisemaks kasutamiseks. Uus substraat peab kasvatamisnõus tavaliselt vastu ligikaudu kaks kuud.

Iga ussikultuuri alustatakse 500–1 000 ussiga; söödaks antakse neile 3 korda nädalas 10 ml suspensiooni, mis sisaldab 6 g forelli startersööta; kasutada võib nii uuendatavat kasvukeskkonda kui ka läbivoolukatse tingimusi. Staatilises või poolstaatilises kultuuris tuleb söötmist vähendada, et vältida bakterite või seente kasvu. Sööta ja pabersubstraati tuleks analüüsida ainete suhtes, mida uuritakse bioakumulatsiooni katses.

Sellistel tingimustel kahekordistub isendite arv kultuuris üldiselt ligikaudu 10–14 päevaga.

Rabeliimukat võib kasvatamisnõust välja võtta näiteks substraadi eemaldamisega, kasutades peenesilmalist võrku, või usside väljavõtmisega, kasutades tulel poleeritud laiasuulist (läbimõõt umbes 5 mm) klaaspipetti, et tõsta neid eraldi keeduklaasi. Kui koos ussidega satub sellesse keeduklaasi ka substraati, jäetakse keeduklaas usside ja substraadiga üheks ööks läbivoolu alla; vesi kannab substraadi

▼ **M6**

minema ja ussid jäävad nõu põhjale. Seejärel saab ussid üle viia värskest ettevalmistatud kasvatusnõusse või kasutada neid katse alustamiseks, nagu on kirjeldatud publikatsioonides (1) ja (6). Usside vigastamist või enesekõndistamist tuleks vältida, selleks tuleb nende usside käsitsemiseks kasutada tulet poleeritud otsaga pipette või roostevabast terasest pintsette.

Küsimus, mida tuleb kriitiliselt hinnata rabeliimuka kasutamisel sette bioakumulatsiooni katsetes, on tema paljunemisviis (arhitoomia (jagunemine kaheks fragmentiks), millele järgneb morfallaksis (puuduvate fragmentide moodustamine)). Sellisel mittesugulisel paljunemisel saadakse kaks fragmenti, kes teatava aja jooksul ei toitu, kuni on regenereerinud pea- või sabaosa (näiteks (36, 37)). See tähendab, et sette neelamine ja saasteaine omastamine rabeliimuka poolt võib mitte toimuda pidevalt nagu mudatuplastel, kes ei paljune fragmenteerumisega.

Seepärast tuleks kultuuri sünkroniseerida, et vähendada kontrollimatut paljunemist ja regenereerumist ning selle tõttu katse tulemuste suurt varieeruvust. Selline varieeruvus võib tekkida sellest, kui mõned isendid, kes on jagunenud ja seepärast ei söö teatava ajavahemiku vältel, puutuvad uuritava ainega vähem kokku kui muud isendid, kes katse ajal ei jagune (38). 10–14 päeva enne ainega kokkupuute algust tuleks ussid kunstlikult fragmenteerida (sünkroniseerimine) (65). Tuleks kasutada suuri usse, kellel eelistatavalt ei ole näha hiljutise jagunemise märke. Sellised ussid võib panna objektiklaasile kultuuris kasutatava vee tilga sisse ja lõigata skalpelliga keha keskosas pooleks. Tuleks hoolitseda selle eest, et tagumised otsad oleksid sarnase suurusega. Tagumised otsad tuleks seejärel kuni ainega kokkupuute alguseni jätta regenereerima uusi päid kasvatusnõus, mis sisaldab sama substraati, mida kasutatakse kasvatamisel, ja taastatud vett. Uute, regenereerinud peade olemasolu näitab see, kui sünkroniseeritud ussid kaevuvad substraadisse (regenereerinud pea olemasolu võib tõendada sellega, kui esindavat usside osaproovi vaadeldakse binokulaarmikroskoobiga). Katseorganismid peaksid seejärel olema sarnases füsioloogias seisundis. See tähendab, et kui sünkroniseeritud ussides toimub katse ajal morfallaksise kaudu regenereerimine, peaksid praktiliselt kõik loomad olema ühtmoodi kokkupuutes rikastatud settega. Sünkroniseeritud usse tuleks sööta kohe, kui ussid hakkavad substraadisse kaevuma, või 7 päeva pärast fragmenteerimist. Söötmissrežiim peaks olema võrreldav tavapärase kultuuri söötmisega, kuid sünkroniseeritud usse võib olla soovitatav sööta samast söödaallikast, mida kasutatakse katse ajal. Usse tuleks hoida katse temperatuuril  $20 \pm 2$  °C juures. Pärast regenereerumist tuleks katses kasutamiseks valida terved tervikliku kehaga ussid, kes väikse mehaanilise ärrituse peale hakkavad aktiivselt ujuma või roomama. Usside vigastamist või enesekõndistamist tuleks vältida, selleks tuleb nende usside käsitsemiseks kasutada tulet poleeritud otsaga pipette või roostevabast terasest pintsette.

Kui katses kasutatakse rabeliimukat, peaks seoses selle liigi erilise paljunemisviisiga usside arv katse jooksul suurenema, kui tingimused on sobivad (6). Kui rabeliimukaga tehtava bioakumulatsiooni katse ajal paljunemist ei toimu, tuleks see registreerida ja seda tuleks arvestada katse tulemuste tõlgendamisel.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), *Tubificidae*, *Oligochaeta* (ringkatsega kinnitamata)**

*Branchiura sowerbyi* elutseb mitmesuguse settetüübiga veekogudes – jõgedes, järvedes, tiikides, algselt troopilistel aladel. Neid võib leida ka põhjapoolkera sooja veega veekogudes. Siiski on neid sagedamini mudastes-savistes setetes, mille orgaanilise aine sisaldus on suur. Lisaks elavad need ussid settekihi sees. Isegi usside tagaosa on tavaliselt sisse kaevunud. Kõnealune liik on hästi

▼ **M6**

määratav lõpusekiudude järgi nende tagaosas. Täiskasvanud ussid võivad saavutada pikkuse 9–11 cm ja märgkaalu 40–50 mg. Usside paljunemiskiirus on suur, isendite arv kahekordistub vähem kui kahe nädalaga allpool kirjeldatud temperatuuri- ja söötmistingimustes (Aston *et al.*, 1982, (65)). *B. sowerbyi*'t on kasutatud nii toksilisuse kui ka bioakumulatsiooni uuringutes (vastavalt Marchese ja Brinkhurst 1996, (31), Roghair *et al.* 1996, (67)).

*Kultuuris pidamise meetodid*

Allpool on esitatud kokkuvõtte *Branchiura sowerbyi*' kultuuris pidamise tingimustest (esitanud Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, ja Carla J. Roghair, RIVM, Madalmaad).

Usside kultuuris pidamiseks ei ole vaja järgida üht kindlat meetodit. Usside kasvatamiseks võib kasutada saastamata looduslikku setet (31). Praktilised kogemused on näidanud, et keskkond, mis koosneb looduslikust settest ja liivast, sobib ussidele paremini kui puhas looduslik sete (32, 67). Kultuuri jaoks sobivad 3 l keeduklaasid, mis sisaldavad 1 500 ml sette ja vee süsteemi, milles on 375 ml saastamata looduslikku setet (orgaanilise süsiniku üldsisaldus ligikaudu 10 %; ligikaudu 17 % osakesi suurusega  $\leq 63 \mu\text{m}$ ), 375 ml puhast liiva (M32) ja 750 ml taastatud või dekloritud kraanivett (31, 32, 67). Substraadina võib kasutada ka paberrätikuid, kuid selles kasvab usside arv aeglasemalt kui looduslikus settes. Poolstaatilistes süsteemides aereeritakse keeduklaasis olevat katvat veekihti aeglaselt ja kord nädalas tuleks veekihti uuendada.

Igasse keeduklaasi pannakse alustuseks 25 noort ussi. Kahe kuu pärast nopitakse suured ussid settest pintsettidega välja ja viiakse üle uude keeduklaasi, milles on värskest valmistatud sette-vee kasvukeskkond. Vana keeduklaas sisaldab ka kookoneid ja usside noorjärke. Sellisel viisil saab igast keeduklaasist koguda kuni 400 noort ussi. Täiskasvanud usse saab paljundamiseks kasutada vähemalt üks aasta.

Kasvukultuure tuleks hoida temperatuuril 21–25 °C. Temperatuuri muutumised tuleks hoida alla 2 °C. Aeg, mis kulub embrüonaalseks arenguks, alates munetud munast kuni noore ussi väljumiseni kookonist, on temperatuuril 25 °C umbes kolm nädalat. Munasaagis ühe elusa ussi kohta *B. sowerbyi*' kultuuris oli mudas temperatuuril 25 °C alates 6,36st (31) kuni 11,2ni (30). Munade arv kookonis on vahemikus 1,8–2,8 (66, 69) või kuni 8 (68).

Iga nädal tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, vee karedust, temperatuuri ja pH-d. Kalasööta (nt TetraMin®) võib lisada suspensioonina kaks või kolm korda nädalas *ad libitum*. Usse võib sööta ka ülesulatatud aedslatiga *ad libitum*.

Selle liigi üks peamisi suuri eeliseid on isendi suur biomass (isendi märgmass on 40–50 mg). Seepärast saab seda liiki kasutada radioaktiivse märgiseta uuritava aine bioakumulatsiooni katsetes. Selle liigi puhul võib mudatupe või rabeliimuka puhul kasutatud süsteemides viia uuritava ainega kokkupuutesse üheainsa isendi paralleelkatse kohta (11). Paralleelkatseid tuleb siiski teha rohkem, kui ei kasutata suuremaid katsekambreid (11). Ka usside kaevumiskäitumisega seotud katse nõuetekohasuse kriteeriumi tuleb selle liigi puhul muuta.

▼ **M6**

## KIRJANDUS

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Käesoleva lisa peatükk C.13. Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolumkatse.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Käesoleva lisa peatükk C.27. Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud sette kasutamise kohta.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.



▼ **M6**

- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böbling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Käesoleva lisa järgmised peatükid:
- Peatükk A.4. Aururõhk.
- Peatükk A.5. Pindpinevus.
- Peatükk A.6. Lahustuvus vees.
- Peatükk A.8. Jaotustegur. Loksutamismeetod.
- Peatükk A.24 Jaotuskoefitsient, HPLC meetod.
- Peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine: hüdrolüüsi sõltuvus pHst.
- Käesoleva lisa peatükk C.4 A–F. Kohese biolagunduvuse määramine.
- Käesoleva lisa peatükk C.19. Adsorptsiooniteguri ( $K_{OC}$ ) kindlaksmääramine mullas ja reoveesettes kõrgsurvedelikkromatograafia (HPLC) abil.
- Käesoleva lisa peatükk C.29. Kiire biolagundatavus – CO<sub>2</sub> suletud nõudes (vabaruumi katse).
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.

▼ **M6**

- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): *Bioaccumulation – New Aspects and Developments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Käesoleva lisa peatükk C.I. Äge mürgisus kaladele.
- (34) OECD (1992c). *Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. OECD, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.

▼ **M6**

- (40) Käesoleva lisa peatükk C.8, Toksilisus vihmaussidele – tehismulla test.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.
- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

▼ **M6**

- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.

▼ **M7****C.47. VARASES ARENGUJÄRGUS KALADELE AVALDUVA MÜRGISUSE KATSE****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 210 (2013). Varases arengujärgus kaladega tehtavad katsed on ette nähtud kemikaalide surmava ja subletaalse mõju kindlakstegemiseks katses kasutatavate liikide eri arengujärgus kaladele. Nendest saadakse väärtuslikku teavet asjaomase kemikaali kroonilise, surmava ja subletaalse mõju hindamiseks ka muude kalaliikide puhul.
2. Katsejuhend nr 210 põhineb Ühendkuningriigi ettepanekul, mida arutati OECD ekspertide kohtumisel 1988. aasta novembris Medmenhamis (Ühendkuningriik) ja ajakohastati 2013. aastal, et võtta arvesse katse kasutuselevõtmisega saadud kogemusi ja kaladele avalduva mürgisuse katset käsitleval, 2010. aasta septembris toimunud OECD seminaril koostatud soovitusi (1).

**KATSE PÕHIMÕTE**

3. Varases arengujärgus kalad viiakse kokkupuutesse eri kontsentratsioonides esineva vees lahustunud uuritava kemikaaliga. Soovitatakse kasutada läbivoolutingimusi, ent kui see ei ole võimalik, on vastuvõetavad ka poolstaaatilised tingimused. Sellekohaseid üksikasju tuleks vaadata OECD juhenddokumendist raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (2). Katse alustamiseks pannakse viljastatud marjaterad katsekambrisse ja katset jätkatakse liigist sõltuva pikkusega ajavahemiku vältel, mis on vajalik kontrollrühma kalade jõudmiseks noorjärku. Surmavat ja subletaalset mõju võrreldakse kontrollrühma väärtustega, et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ning: i) täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ja/või ii)  $EC_x$  (nt  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ); viimasel juhul kasutatakse regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul mõõdetav näitaja muutub  $x$  % võrra. Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest ja näitajatest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama  $EC_x$  väärtust, nii et  $EC_x$  leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel (mõisted on määratletud 1. liites).

**TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA**

4. Uuritava kemikaali all peetakse silmas katses kasutatavat kemikaali. On vaja teada uuritava kemikaali lahustuvust vees (vt käesoleva lisa peatükk A.6) ja aururõhku (vt käesoleva lisa peatükk A.4) ning kemikaali sisalduse määramiseks katselahuses peaks olema olemas usaldusväärne analüüsimeetod, mille täpsus ja määramispiir on teada ja avaldatud. Ehkki need ei ole katse läbiviimiseks vajalikud, võivad kasulikke teavet pakkuda tulemused, mis on saadud ägeda mürgisuse hindamise katsest (vt käesoleva lisa peatükk C.1 või C.49) – soovitatavalt sellisest, kus on kasutatud siin kirjeldatud katse jaoks valitud liike.
5. Kui käesolevat katsemeetodit kasutatakse segu analüüsimiseks, peaks selline segu olema võimalikult hästi iseloomustatud, näiteks selle koostisainete keemilise määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja iga koostisaine omaduste (näiteks eespool nimetatud omaduste) suhtes. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused.
6. Asjakohane kasulik teave hõlmab aine struktuurivalemit, puhtust, lahustuvust vees, püsivust vees ja valguse käes,  $pK_a$ -d,  $P_{ow}$ -d ning kiire biolagundatavuse katse tulemusi (nt käesoleva lisa peatükk C.4 või C.29).

▼ **M7****KATSE NÕUETEKOHASUS**

7. Katse vastab nõuetele, kui on täidetud järgmised tingimused:
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema suurem kui 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;
  - vee temperatuur ei tohiks kogu katse vältel eri katsekambrites ja järjestikustel päevadel erineda rohkem kui  $\pm 1,5$  °C ning see tuleks hoida katsealuse liigi jaoks ette nähtud temperatuurivahemikus (2. liide);
  - katsekonsentratsioonide analüütiline mõõtmine on kohustuslik;
  - viljastatud marjaterade üldine elulemus ja koorumisjärgne edukus kontrollrühmas ja vajaduse korral ka lahustiga kontrollrühmas ei tohiks olla väiksem kui 2. liites määratletud alampiir.
8. Kui leitakse väikseid kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katseandmete usaldusväärsusele ja esitada need kaalutlused katseprotokollis. Katseandmete usaldusväärsuse kontekstis tuleks välja tuua lahustiga kontrollrühmas täheldatav mõju elulemusele, koorumisele ja kasvule, võrrelduna negatiivse kontrolliga, ning sellise mõju üle arutleda.

**MEETODI KIRJELDUS****Katsekambrid**

9. Võib kasutada ükskõik milliseid klaasist, roostevabast terasest või muust keemiliselt inertest materjalist nõusid. Kuna on teada, et silikoon on võimeline tugevalt absorbeerima lipofiilseid aineid, tuleks kasutada läbivoolukatses võimalikult vähe silikoonvoolikuid ja minimeerida veega kokku puutuvate silikoonühendite kasutamist, näiteks liitekohtadeta klaasakvaariumi kasutamisega. Nõude mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et oleks tagatud nõuetekohane kasv kontrollrühmas, lahustunud hapniku sisalduse säilimine (nt väikese kalaliigi puhul piisab nõust mahuga 7 l) ja punktis 19 esitatud biomassisisalduse kriteeriumide järgimine. Katsekambrid soovitatakse paigutada katse läbiviimise alal juhuslikult. Eelistatav on selline plokide randomiseeritud paigutus, kus igas plokis on esindatud iga kontsentratsioon; see on parem kui täielikult randomiseeritud paigutus. Katsekambrid peaksid olema kaitstud soovimatu häirimise eest. Katsesüsteemil on soovitatav enne katseorganismide sisseviimist lasta uuritava kemikaaliga eri kontsentratsioonidel piisavalt kohaneda, et veenduda kokkupuutekontsentratsioonide püsivuses.

**Liigi valimine**

10. Soovitavad kalaliigid on esitatud tabelis 1. Võib kasutada ka muid liike, kuid selleks võib olla vaja kohandada katsekorda, et luua sobivad katsetingimused. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

**Sugukalade pidamine**

11. Sugukarja kalade rahuldavates tingimustes pidamise üksikasjad on esitatud 3. liites ja viidetes 3–5.

**Viljastatud marja, embrüote ja vastsete hoidmine**

12. Esialgu võib viljastatud marja, embrüoid ja vastseid hoida põhinõu sees väiksemates klaasist või roostevabast terasest nõudes, mille küljed või otsad on kaetud võrguga, et katselahus saaks nõust läbi voolata. Keeristeta voolu tekitamiseks läbi nende väikeste nõude võib riputada nõud hoova

▼ **M7**

külge, mis võimaldab neid üles ja alla liigutada, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses. Lõhelaste viljastatud marjaterad võib asetada raamile või võrgule, mille avad on piisavalt suured, et vastsed pärast koorumist sealt läbi mahuksid.

13. Kui katse põhinõus kasutatakse marjaterade hoidmiseks marjaterade anumaid, reste või võrke, tuleks need 3. liites esitatud juhendi kohaselt pärast vastsete koorumist eemaldada, välja arvatud vastsete põgenemist takistavad võrgud. Kui vastseid on vaja ümber paigutada, ei tohiks lasta neil õhuga kokku puutuda ega kasutada võrke vastsete väljatõstmiseks marjaterade anumast. Ümberpaigutamise aeg varieerub liigiti ja see tuleks märkida katseprotokollis. Ümberpaigutamine ei pruugi alati olla vajalik.

**Vesi**

14. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga (vt 4. liide). Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Selle tagamiseks, et lahendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava kemikaaliga komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju sugukarja jõudlusele, tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ning ammoniakaasi sisaldus, kloori sisaldavate pestitsiidijääkide üldsisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks kaks korda aastas. Kui vesi on teadaolevalt varieeruva kvaliteediga, tuleb mõõtmisi teha sagedamini; nende sagedus sõltub kvaliteedi varieerumise ulatusest. Nõuetekohase lahendusvee mõned keemilised omadused on loetletud 4. liites.

**Katselahused**

15. Läbivoolukatsete puhul tuleb kasutada süsteemi, kus uuritava kemikaali põhilahust lisatakse ja lahendatakse pidevalt (nt dosaatorpump, proportsionaalse lahendamise seade, küllastusseade), et saavutada katsekambrites rida eri kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahendusvee voolukiirust tuleks katse jooksul kindlate ajavahemike järel kontrollida ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Sobivaks peetakse voolukiirust, millega tagatakse 24 tunni jooksul lahuse vahetumine vähemalt viiekordses katsekambri mahus (3). Punktis 19 sätestatud asutustiheduse järgimise korral võib sööda kiire kõrvaldamise ärahoidmiseks siiski kasutada väiksemat voolukiirust, mille puhul lahus vahetub näiteks kahe- või kolmekordses katsekambri mahus.
16. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahendusvees mehaaniliselt teel (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne) või passiivse doseerimise meetodeid (6). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on siiski vajalik, tuleks katses paralleelselt kasutada lahustiga kontrollrühma, mille puhul lahusti kontsentratsioon on sama kui uuritava kemikaaliga rühmades, st lahusti sisaldus peaks soovitatavalt olema kemikaali iga kontsentratsiooni ja lahustiga kontrollrühma puhul sama. Mõnes lahendussüsteemis võib seda olla tehniliselt raske saavutada; sellisel juhul peaks lahusti sisaldus lahustiga kontrollrühmas olema võrdne lahusti suurima sisaldusega

▼ **M7**

uuritava kemikaaliga rühmades. Raskesti uuritavate ainete puhul tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga nr 23 raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (2). Lahusti kasutamisel määravad lahusti valiku aine keemilised omadused. OECD juhenddokumendi nr 23 kohaselt on suurim soovitatav lahusti kontsentratsioon 100 µl/l. Et hoida ära lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele lõppnäitajatele (7), soovitatakse kasutada võimalikult madalat lahusti kontsentratsiooni.

17. Poolstaatilise katse puhul võib järgida kahte eri uuendamismeetodit. Puhastesse nõudesse võib valmistada uued katselahused ning allesjäänud marjaterad ja vastsed ettevaatlikult uutesse nõudesse üle viia; teise võimalusena jäetakse katseorganismid samasse katsekambrisse ja uuendatakse osa (vähemalt kaks kolmandikku) katselahusest/kontroll-lahusest.

**KATSE KÄIK****Kokkupuutetingimused***Kestus*

18. Katset tuleks alustada võimalikult kiiresti pärast marjaterade viljastamist ning viia marjaterad katselahusesse soovitatavalt enne blastodiski lõigustumise algust või võimalikult kiiresti pärast seda. Katse kestus sõltub kasutatavast liigist. Mõnel puhul soovitatav kestus on esitatud 2. liites.

*Biomassisisaldus*

19. Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks olema statistikanõuetele vastavuse tagamiseks piisav. Marjaterad tuleks jagada katserühmadesse juhuslikkuse alusel ning iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt 80 marjatera, mis jagatakse võrdselt vähemalt nelja paralleelse katsekambri vahel. Biomassisisaldus (biomass katselahuse ruumalaühiku kohta) peaks olema piisavalt väike, et marjaterade ja vastsete staadiumis püsiks lahustunud hapniku sisaldus aereerimiseta tasemel vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist. Läbivoolukatsete puhul soovitatakse biomassisisaldust, mille puhul märgmass ei ole 24 tunni ja liitri lahuse kohta suurem kui 0,5 g ega ühelgi hetkel suurem kui 5 g/l (3).

*Valgus ja temperatuur*

20. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

*Söötmine*

21. Sööt ja söötmine on otsustava tähtsusega ning on oluline, et igal arenguetapil antaks sobivast ajast alates normaalse kasvu tagamiseks piisavas koguses õiget sööta. Sööda kogus peaks olema paralleelrühmades enam-vähem võrdne, kui seda ei kohandata suremuse suhtes. Sööda ülejäägid ja väljaheidet tuleks vastavalt vajadusele eemaldada, et hoida ära jäätmete kogunemist. Üksikasjalikud söötmissrežiimid on esitatud 3. liites, ent sööda ja söötmissrežiimide üksikasju täpsustatakse kogemuste varal pidevalt, et elulemust suurendada ja kasvu optimeerida. Elussööt rikastab keskkonda ja seepärast tuleks seda sobiva liigi ja arengujärgu puhul alati kasutada kuivisööda ja külmutatud sööda asemel või nende täiendamiseks.

*Uuritava kemikaali kontsentratsioonid*

22. Tavaliselt on vaja kasutada uuritavat kemikaali viiel kontsentratsioonil, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 3,2, ning igal kontsentratsioonil vähemalt nelja paralleeli. Katsekonsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks võimaluse korral arvesse võtta soovitatavalt sama liigiga läbi viidud ägeda mürgisuse hindamise katse ja/või kontsentratsioonivahemiku leidmise katse andmeid (1). Kontsentratsioonivahemiku valimisel tuleks siiski kaaluda kõikidest allikatest pärit teavet, sealhulgas näiteks kalaembrüotele avalduva ägeda mürgisuse hindamise katse ülekantavaid tulemusi. Kui nõutakse üksnes täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni empiirilist määramist,



▼ **M7**

võib lõpliku katsena olla vastuvõetav piirsalduskatse või laiendatud piirsalduskatse, kus kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritavat kemikaali ei ole vaja kasutada kontsentratsioonis, mis on suurem kui 96 tunni puhul täheldatav  $LC_{50}$  või 10 mg/l, olenevalt sellest, kumb on väiksem.

*Kontrollid*

23. Lisaks uuritava kemikaali kontsentratsioonide jadale tuleks kasutada paralleelselt ka lahendusveega kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli, mis sisaldab üksnes lahustit (vt punkt 16).

**Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

24. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine kõikides paralleelides (näiteks katsekonsentratsioonide mõõtmise teel). Tuleks kindlaks teha nõutavad analüüsimeetodid, sealhulgas asjakohane määramispiir ja piisav teave aine püsivuse kohta katse-süsteemis. Kokkupuute kirjeldamiseks määratakse katse vältel uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike järel. Tehakse vähemalt viis määramist. Läbivoolusüsteemis tuleks uuritava kemikaali analüütilisel määral vähemalt kord nädalas ühes paralleelrühmas iga kontsentratsiooni kohta ning vahetada paralleele süstemaatiliselt. Täiendavad analüütilised määramised parandavad sageli katsetulemuste kvaliteeti. Proovid võivad olla vaja tahkete osakeste kõrvaldamiseks filtrida (nt läbi filtri, mille pooride läbimõõt on 0,45 µm) või tsentrifuugida, et veenduda, et kemikaali määramine toimub tõelises lahuses. Uuritava kemikaali adsorbeerumise vähendamiseks tuleks filter enne kasutamist küllastada. Kui mõõdetud kontsentratsioon ei ole vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, tuleks toime avaldumise kontsentratsioonide määramisel ja väljendamisel võtta läbivoolukatse puhul aluseks mõõdetud kontsentratsioonide aritmeetiline keskmine (aritmeetilise keskmise arvutamist on kirjeldatud katsemeetodi C.20 (8) 6. liites) ja poolstaatilise katse puhul kontsentratsioonide geomeetriline keskmine (vt raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimist käsitlev OECD juhenddokument (2), 5. peatükk).
25. Katse vältel tuleks kõikides katsenõudes mõõta vähemalt kord nädalas lahustunud hapniku sisaldus, pH ja temperatuur ning vajaduse korral katse alguses ja lõpus soolsus ja karedus. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.

**Vaatlused**

26. **Embrüonaalse arengu staadium:** embrüonaalse arengu staadium uuritava kemikaaliga kokkupuute alguses tuleks teha kindlaks nii täpselt kui võimalik. Selleks võib kasutada sobivalt säilitatud ja puhastatud representatiivset marjaterade proovi.
27. **Koorumine ja ellujäämine:** koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja tulemused üles märkida. Kui varase embrüonaalse arengu ajal (nt esimesel või teisel katsepäeval) täheldatakse marjaterade pinnal seente kasvu, tuleks sellised marjaterad loendada ja eemaldada. Surnud embrüod, vastsed ja noorkalad tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda ja teised kalad võivad need tükkideks kiskuda. Surnud organismide eemaldamisel tuleks olla väga tähelepanelik, et kõrvalolevaid marjateri/vastseid füüsiliselt mitte kahjustada. Surmale viitavad märgid varieeruvad sõltuvalt liigist ja arenguetapist. Näited:

▼ **M7**

- viljastatud marjaterad: eelkõige varastes etappides märkimisväärne läbipaistvuse kadu ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkude koaguleerumisest ja/või sadenemisest ja mille tulemusena marjaterad muutuvad valgeks ja läbipaistmatuks;
  - embrüod, vastsed ja noorkalad: liikumatus ja/või hingamisliigutuste puudumine ja/või südamelöökide puudumine ja/või võimetus reageerida mehaanilisele ärritusele.
28. **Kõrvalekalded välimuses:** ebanormaalse kehakujuga vastsete ja noorkalade arv tuleks registreerida piisava sagedusega, olenevalt katse kestusest ja kirjeldatavast kõrvalekaldest. Tuleks silmas pidada, et kõrvalekaldega vastseid ja noorkalu esineb looduslikult ning nende osakaal võib mõnel liigil olla kontrollrühma(de)s mitu protsenti. Kui väärengut ja sellega seotud ebanormaalsel käitumisel peetakse nii tõsiseks, et see põhjustab asjaomasele organismile märkimisväärseid kannatusi ja organism ei ole võimeline sellisest seisundist enam taastuma, võib sellise organismi katsest kõrvaldada. Asjaomase looma puhul tuleks rakendada halastussurma ja seda tuleks hilisemal andmeanalüüsil käsitleda osana suremusest. Käesoleva katsemeetodi puhul soovitatavatest liikidest enamiku puhul on tavapärase embrüonaalne areng dokumenteeritud (9–12).
29. **Kõrvalekalded käitumises:** käitumuslikud kõrvalekalded, näiteks hüperventileerimine, koordineerimatus ujumisel, ebatüüpiline loidus või ebaharilik toitumine tuleks katse kestusest olenevalt registreerida piisava sagedusega (nt soojaveekalade puhul kord päevas). Ehkki sellist mõju on raske kvantifitseerida, võivad kõnealused tähelepanekud aidata tõlgendada suremuse andmeid.
30. **Kehamass:** katse lõpus kaalutakse kõik ellujäänud kalad vähemalt paralleelrühma tasandil (registreeritakse kalade arv paralleelrühmas ja nende keskmine mass): soovitatavalt leitakse märgmass (kalad kuivatatakse kuivatuspaberiga), ent võib registreerida ka kuivmassi (13).
31. **Pikkus:** katse lõpus mõõdetakse iga kala pikkus. Soovitatavalt mõõdetakse üldpikkus, kuid sabauime mädaniku või uimede erosiooni korral võib mõõta ka standardpikkuse. Kõikide ühes katses kasutatavate kalade puhul tuleks rakendada sama meetodit. Iga kala pikkuse võib mõõta näiteks nihiku, digitaalse fotoaparaadi või kaliibritud okulaarmikromeetri abil. Tüüpilised miinimumpikkused on määratletud 2. liites.

## ANDMED JA ARUANDLUS

**Andmete töötlemine**

32. Katseplaani ja valitud statistiline test peaksid soovitatavalt tagama piisava usaldusväärsuse (vähemalt 80 %), et võimaldada tuvastada bioloogiliselt olulisi lõppnäitaja muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatava toime puudumise kontsentratsioon. Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust.  $EC_x$  esitamise vajaduse korral peaks katseplaani ja valitud regressioonimudel võimaldama hinnata  $EC_x$  väärtust nii, et i)  $EC_x$  puhul leitud usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ei hõlma nulli ega ole ülemäära lai, ii)  $EC_x$ -le vastava hinnangulise keskväärtuse usaldusvahemik usaldusnivool 95 % ei hõlma kontrollrühma keskväärtust ning iii) ei esine märkimisväärset lahknevust regressioonimudeli ja andmete vahel. Kummagi lähenemisviisi puhul on vaja teha kindlaks iga olulise tuvastatava või hinnatava lõppnäitaja protsentuaalne muutus. Katseplaani tuleks sellest lähtuvalt kohandada. Kui eespool esitatud tingimused  $EC_x$  määramiseks ei ole täidetud, tuleks kasutada lähenemisviisi, mille puhul määratakse täheldatava toime puudumise kontsentratsioon. On vähetõenäoline, et kõikide lõppnäitajate puhul täheldatakse sama

▼ **M7**

protsentuaalsed muutust ning et on võimalik koostada selline katseplaani, kus kõnealused kriteeriumid on täidetud kõikide lõppnäitajate puhul; seepärast on tähtis keskenduda nõuetekohase katse kavandamisel lõppnäitajatele, mis on asjaomase katse puhul olulised. Statistilised vooskeemid ja juhendid kummagi lähenemisviisi jaoks on esitatud 5. ja 6. liites, et pakkuda juhiseid andmete töötlemiseks ja sobivaima statistilise testi või mudeli valimiseks. Võib kasutada ka muid statistilisi lähenemisviise, kui need on teaduslikult põhjendatud.

33. Igas paralleelide rühmas on vaja analüüsida varieeruvust dispersioonanalüüsi või sagedustabeli abil ning kasutada selle analüüsi alusel valitud asjakohaseid statistilisi analüüsimeetodeid. Igal eraldi kontsentratsioonil ja kontrollrühmas saadud tulemuste mitmeseks võrdlemiseks soovitatakse pideva tunnuse puhul kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi testi ning binaarse tunnuse puhul, millel täheldatakse monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust ja mille puhul ei esine binoomjaotuse ülehajuvust, muutujate sammuviisilise elimineerimisega Cochran-Armitage'i testi (14). Binoomjaotuse ülehajuvuse korral soovitatakse kasutada Cochran-Armitage'i testi Rao-Scotti modifikatsiooni (15, 16) või Williamsi või Dunnetti (nurkteisenduse järgselt) või Jonckheere'i-Terpstra testi paralleelide osakaalude suhtes. Kui andmed ei väljenda monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, võib pideva tunnuse puhul olla kasu Dunnetti, Dunni või Manni-Whitney meetodist ning binaarse tunnuse puhul Fisher-Yatesi testist (14, 17, 18). Iga statistilise meetodi või mudeli kohaldamisel tuleks olla ettevaatlik ja veenduda, et asjaomasest meetodist või mudelist tulenevad nõuded on täidetud (nt kasutatava katseplaani ja testi või mudeli puhul on hinnatud ja arvesse võetud kambritevahelist varieeruvust). Andmeid hinnatakse normaaljaotuse suhtes ja 5. liites on kirjeldatud, mida tuleks teha dispersioonanalüüsil saadud hälvetega. Regressioonanalüüsiga seotud lisakaalutlused on esitatud 6. liites. Asjakohase statistilise testi nõuetele vastavuse saavutamiseks tuleks kaaluda teisendamist. Regressioonimudeli kohandamist võimaldaval teisendamisel tuleb siiski olla väga hoolikas, kuna näiteks 25 % suurune muutus teisendamata andmete puhul ei vasta 25 % suurusele muutusele teisendatud andmete puhul. Iga analüüsi puhul on analüüsitava üksus ja katseüksus katsekamber, mitte üksikud kalad, ning see peaks kajastuma nii hüpoteesi kontrollimise testides kui ka regressioonanalüüsis (3, 14, 19, 20).

**Katseprotokoll**

34. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalise-keemilised omadused.

*Katsealune liik:*

- teaduslik nimetus, liin, päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

▼ M7*Katsetingimused:*

- kasutatud katserežiim (nt poolstaatiline või läbivoolurežiim, biomassisisaldus);
- valgustusperiood(id);
- katseplaan (nt katsekambrite ja paralleelrühmade arv, marjaterade arv paralleelrühma kohta, katsekambri materjal ja suurus (kõrgus, laius, ruumala), vee kogus katsekambri kohta);
- põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle sisaldus);
- uuritava kemikaali annustamise meetod (nt pump, lahjendussüsteem);
- meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja nominaalsed katsekontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

*Vastavalt vajadusele iga kala kohta (või paralleelrühma tasandil) ning keskväärtuse ja variatsioonikordajana esitatavad andmed järgmiste lõppnäitajate kohta:*

- tõendid selle kohta, et kontrollrühmades vastas elulemus katsealuse liigi puhul üldiselt aktsepteeritavale normile (2. liide);
- andmed suremuse kohta igas staadiumis (embrüo, vastne ja noorkala) ning kumulatiivse suremuse kohta;
- koorumiseni kulunud päevade arv, koorunud vastsete arv igal päeval ja koorumise lõppemise aeg;
- tervete kalade arv katse lõpus;
- ellujäänud kalade pikkuse (täpsustada, kas standardpikkus või üldpikkus) ja massi andmed;
- võimalike morfoloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus, kirjeldus ja arv;
- võimalike käitumuslike kõrvalekallete esinemissagedus, kirjeldus ja arv;
- statistilise analüüsi puhul kasutatud lähenemisviis (regressioonanalüüs või dispersioonanalüüs) ja andmetöötlusviis (kasutatud statistiline test või mudel);
- täheldatava toime puudumise kontsentratsioon iga hinnatud näitaja puhul;

## ▼M7

- vähima tähtsatuva toime avaldumise kontsentratsioon ( $p = 0,05$ ) iga hinnatud näitaja puhul;
- vajaduse korral  $EC_x$  iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 90 % või 95 %) ja graafik selle arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, kontsentratsioonist sõltuvuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga.

Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

Tabel 1

## Katse jaoks soovitatavad kalaliigid

MAGEVEEKALAD	SUUDMEALA- ja MEREKALAD
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	<i>Cyprinodon variegatus</i> Hammaskarp
<i>Pimephales promelas</i> Tüse tõmpnina	<i>Menidia</i> sp. Hõbeateriin
<i>Danio rerio</i> Vöödilise daanio	
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2012). Fish Toxicity Testing Framework. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 171. OECD, Pariis.
- (2) 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. OECD, Pariis.
- (3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. USA Materjalide Katsetamise Ühing, E 1241-88. 26 lk.
- (4) Brauhn, J. L., ja Schoettger, R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W. A. ja Jones, B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. Ecological Research Series, EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici *et al.* (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere* 86: 593–599.
- (7) Hutchinson, T. H., *et al.* (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76: 69–92.
- (8) Käesoleva lisa peatükk C.20 „Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse“.
- (9) Hansen, D. J., ja Parrish, P. R. (1977). Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests. Väljaandes: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (toim. Mayer, F. L., ja Hamelink, J. L.). ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B., *et al.* (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203: 253–310.

▼ M7

- (11) Gonzalez-Doncel, M., *et al* (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae). *J. Appl. Ichthyol.* 20: 1–14.
- (12) Devlin, E. W., *et al.* (1996). Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USA Keskkonnakaitseamet, teadus- ja arendustegevuse büroo, Washington, D. C.
- (13) Oris, J. T., Belanger, S. C., ja Bailer, A. J. (2012). Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2): 370–376.
- (14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariis.
- (15) Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.
- (16) Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Stat. Med.* 18: 1373–1385.
- (17) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.
- (18) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
- (19) Rand, G. M., ja Petrocelli, S. R. (1985). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J. T., Sullivan, J. H., ja Pearson, J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼ **M7**

## 1. liide

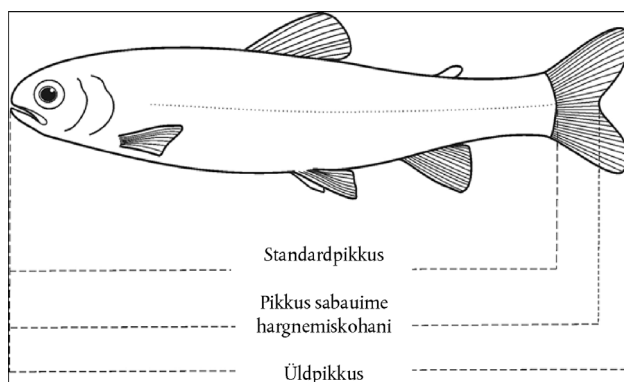
**MÕISTED**

**Pikkus sabauime hargnemiskohani** – kala pikkus ninamiku tipust kui sabauime keskmiste kiirte otsani; kasutatakse kalade puhul, kelle selgroo lõppemiskohta on keeruline kindlaks teha (www.fishbase.org).

**Standardpikkus** – kala pikkus ninamiku tipust viimase selgroolüli tagaotsani või hüpuraalplaadi külje keskosa tagaotsani. Lihtsamalt öeldes ei hõlma see pikkus sabauime pikkust (www.fishbase.org).

**Üldpikkus** – kala pikkus ninamiku tipust sabauime pikema hõlma tipuni; tavaliselt surutakse hõlmad mõõtmiseks keskjoonele kokku. Seda pikkust mõõdetakse sirgjooneliselt, mitte keha kumeruse järgi (www.fishbase.org).

## Joonis 1

**Kasutatavate eri pikkuste kirjeldus**

**Kemikaal** – aine või segu.

**EC<sub>x</sub>** (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC<sub>50</sub> on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

**Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon** – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist kõrgematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 5. ja 6. liites.

**Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon** – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**IUPAC** – International Union of Pure and Applied Chemistry (Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit).

**SMILES** – Simplified Molecular Input Line Entry Specification (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

## KATSETINGIMUSED, KATSE KESTUS JA ELULEMUSKRITEERIUMID SOOVITATAVATE LIIKIDE JAOKS

LIIK	KATSETINGIMUSED			SOOVITATAV KATSE KESTUS	Kontrollrühma kalade tavapärase minimaalne keskmine üldpikkus katse lõpus (mm) <sup>(1)</sup>	ELULEMUS KONTROLLRÜHMAS (minimaalne)	
	Temperatuur (°C)	Soolsus (‰)	Valgustusperiood (tundides)			Koorumise edukus	Koorumisjärgne elulemus
<b>Mageveekalad</b>							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	10 ± 1,5 <sup>(2)</sup>		12–16 <sup>(3)</sup>	2 nädalat alates hetkest, mil kontrollrühma kalad hakkavad vabalt toituma (või koorumisjärgselt 60 päeva)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Tüse tõmpnina	25 ± 1,5		16	32 päeva katse algusest (või koorumisjärgselt 28 päeva)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Vöödiline daanio	26 ± 1,5		12–16 <sup>(4)</sup>	Koorumisjärgselt 30 päeva	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	25 ± 2		12–16 <sup>(5)</sup>	Koorumisjärgselt 30 päeva	17	80 %	80 %
<b>Suudmeala- ja merekalad</b>							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Hammaskarp	25 ± 1,5	15–35 <sup>(5)</sup>	12–16 <sup>(4)</sup>	32 päeva katse algusest (või koorumisjärgselt 28 päeva)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Hõbeateriin	22–25	15–35 <sup>(5)</sup>	13	28 päeva	20	80 %	60 %

*Selgitus*

- <sup>(1)</sup> Tavapärast minimaalset keskmist üldpikkust ei käsitata nõuetekohasuse kriteeriumina, kuid esitatud väärtusest väiksema näitaja korral tuleks seda asjaolu katses vaadeldavast tundlikkusest lähtuvalt põhjalikult uurida. Minimaalne keskmine üldpikkus põhineb valikul praegu kättesaadavatest andmetest.
- <sup>(2)</sup> Katses kasutatava konkreetse vikerforelliliini puhul võib olla vaja kasutada muud temperatuuri. Sugukarja tuleb hoida samal temperatuuril kui marja saamiseks kasutatavaid kalu. Pärast marjaterade saamist marja tootvast ettevõttest on vaja kohandada neid saabumise järel lühiajaliselt (nt 1–2 tundi) katsetemperatuuriga.
- <sup>(3)</sup> Vastseid hoitakse koorumisjärgselt nädal aega pimedas, välja arvatud nende kontrollimise ajal, ning seejärel kasutatakse kogu katse vältel vähest valgustust (valgustusperiood 12–16 tundi) <sup>(4)</sup>.
- <sup>(4)</sup> Konkreetsete katsetingimuste puhul peaks valgustusrežiim olema muutumatu.
- <sup>(5)</sup> Seda näitajat järgitakse igas konkreetses katses täpsusega ± 2 ‰.



## SOOVITATAVATE LIIKIDE SUGUKALADE JA KATSEALUSTE ISENDITE SÖÖTMISE JA KÄITLEMISE JUHISED

LIIK	SÖÖT (*)				KOORUMISJÄRGSE ÜLEVIIMISE AEG	ESIMESE SÖÖTMISE AEG
	Sugukalad	Äsja koorunud vastsed	Noorkalad			
			Sööda liik	Sagedus		
<b>Magaveekalad</b>						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	Forellisööt	Puudub <sup>(a)</sup>	Forelli noorkalade sööt, BSN	2–4 söötmiskorda päevas	14–16 päeva pärast koorumist või pinnale ujumisel (ei ole vajalik)	19 päeva pärast koorumist või pinnale ujumisel
<i>Pimephales promelas</i> Tüse tõmpnina	BSN, helvessööt, FBS	BSN	BSN48, helvessööt	2–3 korda päevas	Kui koorumise määr on 90 %	2 päeva pärast koorumist
<i>Danio rerio</i> Vöödiline daanio	BSN, helvessööt	Kaubanduslik vastse-sööt, algloomad <sup>(b)</sup> , valk <sup>(c)</sup>	BSN48, helvessööt	BSN – kord päevas; helvessööt – kaks korda päevas	Kui koorumise määr on 90 %	2 päeva pärast koorumist
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	Helvessööt	BSN, helvessööt (või algloomad või keriloomad)	BSN48, helvessööt (või keriloomad)	BSN – kord päevas; helvessööt – kaks korda päevas või helvessööt ja keriloomad – kord päevas	Ei kohaldata	6–7 päeva pärast kudemist
<b>Suudmeala- ja merekalad</b>						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Hammaskarp	BSN, helvessööt, FBS	BSN	BSN48	2–3 söötmiskorda päevas	Ei kohaldata	1 päev pärast koorumist või pinnale ujumist
<i>Menidia sp.</i> Hõbeateriin	BSN48, helvessööt	BSN	BSN48	2–3 söötmiskorda päevas	Ei kohaldata	1 päev pärast koorumist või pinnale ujumist

*Selgitus*

(\*) Sööta tuleks anda küllastumiseni. Sööda ülejäägid ja väljaheidet tuleks vajaduse korral kõrvaldada, et vältida jäätmete kogunemist.

FBS külmutatud soolase vee krevetid; *Artemia* sp. täiskasvanud isendid.

BSN soolase vee krevettide noorjärgus isendid, äsja koorunud.

BSN48 soolase vee krevettide noorjärgus isendid, 48 tunni vanused.

<sup>(a)</sup> Rebukotiga vastsed ei vaja toitu.

<sup>(b)</sup> Segakultuurist filtritud.

<sup>(c)</sup> Käärimisprotsessist saadavad graanulid.

▼ **M7**

## 4. liide

**MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED**

Koostisosa	Piirsaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼ **M7**

## 5. liide

**STATISTIKAJUHISED TÄHELDATAVA TOIME PUUDUMISE KONTSENTRATSIOONI MÄÄRAMISEKS****Üldosa**

Analüüsiüksus on paralleelnõu. Seega tuleks pideva tunnuse, näiteks suuruse puhul arvutada paralleelrühma keskvärtus või mediaanvärtus ja kasutada analüüsimiseks seda paralleelrühma väärtust. Kasutatava testi võimsus peaks olema tõendatud, soovitatavalt igas laboris varem saadud piisavate andmete varal. Iga lõppnäitaja puhul tuleks esitada selline suurusele avalduva mõju väärtus, mida on võimalik tuvastada tõenäosusega 75–80 %, ning teave kasutatava statistilise testi kohta.

Soovitatava statistilise meetodi puhul saavutatav võimsus põhineb andmebaasidel, mis olid käesoleva katsemeetodi väljatöötamise ajal kättesaadavad. Igas laboris tuleks tõendada sellise nõutava võimsuse saavutamise võimekust kas laboris tehtava võimsusanalüüsi kaudu või selle kaudu, et tõendatakse, et ühegi näitaja variatsioonikordaja ei ole suurem kui katsejuhendi koostamisel kasutatud variatsioonikordajate 90. protsentiil. Kõnealused variatsioonikordajad on esitatud tabelis 1. Kui on teada üksnes paralleelrühma keskvärtus või mediaanvärtus, võib paralleelrühma sisese variatsioonikordaja kõrvale jätta.

Tabel 1

**Valitud mageveeliikide variatsioonikordajate 90. protsentiilid**

Liik	Näitaja	Paralleelrühmade vaheline variatsioonikordaja	Paralleelrühma sisene variatsioonikordaja
Vikerforell	Pikkus	17,4	9,8
	Kehamass	10,1	28
Tüse tõmpnina	Pikkus	16,9	13,5
	Kehamass	11,7	38,7
Vöödiline daanio	Pikkus	43,7	11,7
	Kehamass	11,9	32,8

Peaaegu kõikide statistiliste testide puhul, mida kasutatakse laboris tehtavate toksikoloogiliste uuringute hindamiseks, soovitakse võrrelda katserühmasid kontrollrühmaga. Seepärast ei ole asjakohane nõuda olulisuse tuvastamisel dispersioonanalüüsi F-testi kasutamist enne Dunnetti või Williamsi testi või Kruskali-Wallis testi kasutamist enne Jonckheere'i-Terpstra, Manni-Whitney või Dunni testi (Hochberg ja Tamhane, 1987; Hsu, 1996; Dunnett, 1955, 1964; Williams, 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.*, 1988; Jonckheere, 1954; Dunn, 1964).

Dunnetti test hõlmab kohandust mitmese võrdluse suhtes ning F-testi eelnev kasutamine kontrolltestina mõjutab negatiivselt Dunnetti testiga saadavate valedpositiivsete ja valenegatiivsete tulemuste määra. Samamoodi säilib muutujate sammuviihilise elimineerimisega Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testis olulisusnivool 0,05 igas etapis valedpositiivsete tulemuste üldmäär 5 % ning F-testi või Kruskali-Wallis testi eelnev kasutamine kontrolltestina mõjutab seda määra ja asjaomase testi võimsust negatiivselt. Manni-Whitney ja Dunni testi on vaja kohandada mitmese võrdluse jaoks ning selleks soovitatakse kasutada Bonferroni-Holmi kohandust.

Valdavalt osa kõnealuste testide aluseks olevate eelduste kontrollimist ja hüpoteesi testimist käsitlevatest soovitudest on põhjalikult kirjeldatud viidatud dokumendis OECD (2006), mis sisaldab ka ulatuslikku kirjanduse loetelu.

▼ **M7****Kontrollrühmade andmete töötlemine lahusti kasutamise korral**

Lahusti kasutamise korral tuleks katses kasutada nii lahendusveega kontrolli kui ka lahustiga kontrolli. Nimetatud kahte kontrollrühma tuleks iga näitaja puhul võrrelda ja kui nende vahel olulist erinevust ei tuvastata, siis nende andmed statistilise analüüsi jaoks ühte koondada. Vastasel juhul tuleks täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks või  $EC_x$  hindamiseks kasutada lahustiga kontrolli ning lahendusveega kontroll kõrvale jätta. Tutvuge nõuetekohasuse kriteeriumidest (punkt 7) tuleneva piiranguga.

Pikkuse, kehamassi, koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu, vastsete suremuse, kõrvalekaldega vastsete osakaalu ning esimese ja viimase koorumispäeva ja pinnale ujumise päeva puhul tuleks lahendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli võrdlemiseks olulisusnivool 0,05 kasutada T-testi või Manni-Whitney testi ning kõik uuritava kemikaaliga rühmad kõrvale jätta. Sellise testi tulemused tuleks esitada katseprotokollis.

**Suurust (pikkus ja kehamass) käsitlevad andmed**

Iga kala puhul mõõdetud pikkuse ja massi andmed võivad olla normaaljaotusega või lognormaalse jaotusega. Kummalgi juhul on paralleelrühmade keskväärtused üldjuhul normaaljaotusega, nagu nähtub tsentraalsest piirteoreemist ja nagu kinnitavad kolme mageveeliigi varases arengujärgus isenditega tehtud enam kui 100 uuringu andmed. Teise võimalusena võib juhul, kui katseandmed või andmebaasides olevad varasemad andmed viitavad iga kala puhul mõõdetud suuruseandmete lognormaalsele jaotusele, arvutada iga üksiku kala andmete põhjal paralleelrühma keskväärtuse logaritmi ja võtta analüüsitavateks andmeteks nende paralleelrühma keskväärtuse logaritmid.

Tuleks hinnata andmete vastavust normaaljaotusele ja andmete hajuvuse homogeensust. Selleks tuleks kasutada sellise dispersioonanalüüsi mudeliga saadud hälbeid, milles ainus sõltumatu muutuja on kontsentratsioon. Võib kasutada hajuvusdiagrammi, tulpdiagrammi või tüvi-leht-diagrammi visuaalset hindamist. Teise võimalusena võib kasutada formaalset testi, näiteks Shapiro-Wilki või Andersoni-Darlingi testi. Hajuvuse homogeensuse hindamiseks võib kasutada hajuvusdiagrammi visuaalset analüüsi või formaalset Levene'i testi. Normaaljaotust ja hajuvuse homogeensust on vaja hinnata üksnes parameetrilise (nt Williamsi või Dunnetti) testi puhul.

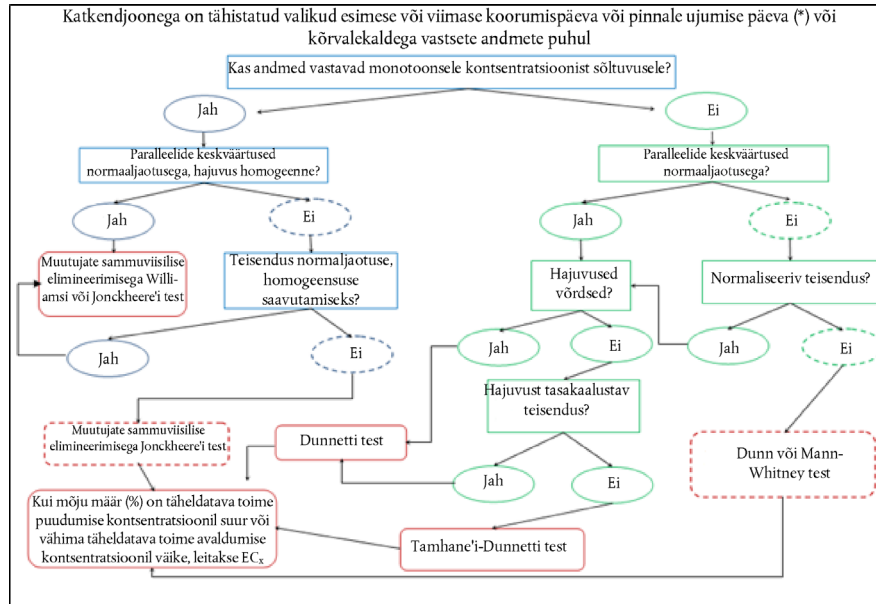
Tuleks pöörata tähelepanu võimalikele võõrväärtustele ja nende mõjule analüüsitulemustele. Võib kasutada Tukey võõrväärtuste testi ja eespool kirjeldatud hälbediagrammide visuaalset hindamist. Tuleks silmas pidada, et vaatlused põhinevad paralleelrühmal tervikuna, mistõttu võõrväärtus tuleks analüüsist välja jätta üksnes pärast hoolikat kaalumist.

Katseplaani eripära ja bioloogiliste eeldustega sobivad statistilised testid on muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditestid, näiteks Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra test. Nende testid eeldavad monotoonsust kontsentratsioonist sõltuvust ning tuleks hinnata andmete vastavust sellele eeldusele. Seda võib teha visuaalselt hajuvusdiagrammi alusel, mis väljendab paralleelrühmade keskväärtuste sõltuvust katsekonsentratsioonidest. On kasulik kanda sellise hajuvusdiagrammi peale sirgjoon segmentidena, mis ühendavad omavahel igale kontsentratsioonile vastavaid keskväärtusi, mida on kaalutud paralleelrühma suurusega. Sellise segmentidest koosneva sirgjoone suur kõrvalekalle monotoonsusest võib osutada muu testi kui trenditesti kasutamise vajadusele. Teise võimalusena võib kasutada formaalset testi. Lihtsa formaalse testina võib arvutada igale kontsentratsioonile vastavate keskväärtuste lineaarsed ja ruutkontrastid. Kui ruutkontrast on statistiliselt oluline, ent lineaarne kontrast mitte, viitab see võimalikule monotoonsusega seotud probleemile, mida tuleks diagrammide alusel täiendavalt analüüsida. Normaaljaotuse või hajuvuse homogeensusega seotud võimalike probleemide korral võib kõnealused kontrastid leida astakteisendatud andmete põhjal. Võib kasutada muid meetodeid, näiteks Bartholomew' testi monotoonsuse suhtes, kuid need muudavad analüüsi keerukamaks.

## ▼ M7

## Joonis 2

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramise vooskeem suurust (pikkus ja kehmass) käsitlevate andmete puhul



(\*) Nende näitajate puhul ei ole parameetrilise analüüsi või mudeli eeldused kunagi täidetud.

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testi astmelist rakendamist, välja arvatud juhul, kui andmed ei vasta sellise testi nõuetele. Neid meetodeid on üksikasjalikult kirjeldatud viites OECD (2006). Andmete puhul, mis ei vasta muutujate sammuviihilise elimineerimisega trenditesti nõuetele, võib kasutada Dunnetti või Tamhane'i-Dunnetti (T3) testi; kumbki neist hõlmab kohandust mitmese võrdluse võimaldamiseks. Nende testide puhul eeldatakse normaaljaotust ning Dunnetti testi puhul ka hajuvuse homogeensust. Kui need tingimused ei ole täidetud, võib kasutada Dunni mitteparameetrilist testi. Kõiki nimetatud teste on üksikasjalikult kirjeldatud viites OECD (2006). Joonisel 2 on esitatud ülevaade sellest, kuidas valida sobiv test.

### Marjaterast koorumine ja vastsete elulemus

Analüüsitavad andmed väljendavad koorumiseni jõudnud marjaterade või ellujäänud vastsete osakaalu igas paralleelrühmas. Kõnealust osakaalu tuleks hinnata binomijaotuse ülehajuvuse suhtes, mis on selliste mõõtmiste puhul tavaline, kuid mitte universaalne. Sobiva testi valimise juhised on esitatud joonisel 3 vooskeemina; vastav üksikasjalik kirjeldus on esitatud tekstis.

Tavaliselt kasutatakse kahte testi. Need on Tarone'i  $C(\alpha)$ -test (Tarone, 1979) ja hii-ruut-test; kumbagi neist rakendatakse eraldi iga katsekonsentratsiooni puhul. Kui isegi vaid ühe katsekonsentratsiooni puhul täheldatakse binomijaotuse ülehajuvust, tuleks kasutada meetodeid, mis võimaldavad seda arvesse võtta.

### Valem 1

Tarone'i  $C(\alpha)$ -test (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

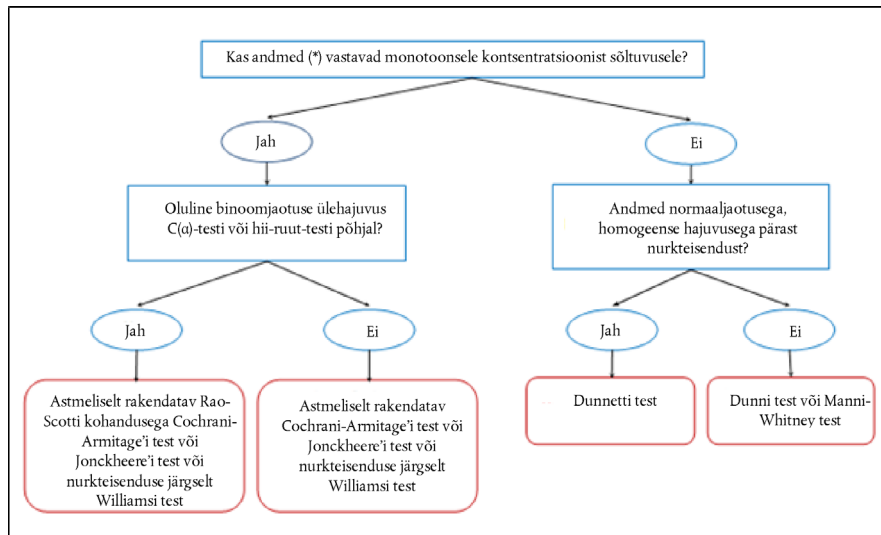
Selles valemis on konkreetsel kontsentratsioonil saadud keskmine osakaal,  $m$  on paralleelnõude arv,  $n_j$  on isendite arv paralleelrühmas  $j$  ja  $x_j$  on selles paralleelrühmas kemikaalist mõjutatud, st koorumata jäänud või surnud isendite arv. Testi

## ▼ M7

rakendatakse eraldi iga kontsentratsiooni puhul. Seda testi võib vaadelda kohandatud hii-ruut-testina, kuid testi võimsust käsitlevatest Tarone'i tehtud piiratud simulatsioonidest nähtub, et selle võimsus ületab hii-ruut-testi oma.

## Joonis 3

Täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramise vooskeem marjaterast koorumise ja vastsete suremuse andmete puhul



(\*) Andmed väljendavad osakaalu paralleelrühmas.

Kui ei leita olulisi tõendeid binoomjaotuse ülehajuvuse kohta, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Cochrani-Armitage'i testi. Selle testi puhul ei võeta arvesse paralleelide olemasolu, mistõttu kõnealuste tõendite esinemise korral soovitatakse kasutada Rao-Scotti kohandusega Cochrani-Armitage'i testi, mille puhul võetakse arvesse nii paralleelide olemasolu, paralleelrühmade suurus kui ka binoomjaotuse ülehajuvust. Muu võimaliku testina võib kasutada näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Williamsi või Jonckheere'i-Terpstra testi või Dunnetti testi, nagu on kirjeldatud suurust käsitlevate andmete puhul. Neid teste võib rakendada sõltumata sellest, kas binoomjaotuse ülehajuvust täheldatakse või mitte, kuid nende võimsus on mõnevõrra väiksem (Agresti, 2002; Morgan, 1992; Rao ja Scott, 1992, 1999; Fung *et al.*, 1994, 1996).

### Esimene ja viimane koorumispäev ja pinnale ujumise päev

Asjaomane näitaja on täisarv, mis väljendab päevade arvu katse algusest kuni konkreetsele paralleelrühmale asjaomase vaatluse tegemise päevani. Sellise näitaja väärtused on üldjuhul väga piiratud ulatusega ja seotud väärtuste osakaal on sageli suur, näiteks täheldatakse, et esimene koorumispäev on kõikides kontrollrühma paralleelides ja võib-olla ühel või kahel väikesel katsekontsentratsioonil sama. Selliste andmete puhul ei ole parameetiline test, näiteks Williamsi või Dunnetti test asjakohane. Kui ei ole tõendeid olulise monotoonsusest kõrvalekalandumise kohta, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi, mille võimsus uuritava kemikaali mõju tuvastamisel on väga suur. Muul juhul võib kasutada Dunni testi.

### Kõrvalekaldega vastsed

Asjaomane näitaja on selliste vastsete arv, kellele leitakse mõni kõrvalekalle. Seda näitajat iseloomustab sageli madal esinemissagedus ja mõned sellega seotud probleemid on samad kui esimese koorumispäeva puhul; peale selle täheldatakse mõnikord selle näitaja korrapärase kontsentratsioonist sõltuvust. Kui andmed väljendavad vähemalt ligikaudselt monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, võib kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi, mille võimsus mõju tuvastamisel on suur. Muul juhul võib kasutada Dunni testi.

▼ M7

## VIITED

- Agresti, A. (2002). *Categorical Data Analysis*. Teine väljaanne. Wiley, Hoboken.
- Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.
- Dunn, O. J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6: 241–252.
- Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
- Fung, K. Y., Krewski, D., Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1994). Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data. *Risk Anal.* 14: 639–648.
- Fung, K. Y., Krewski, D., ja Smythe, R. T. (1996). A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay. *Can. J. Stat.* 24: 431–454.
- Hochberg, Y., ja Tamhane, A. C. (1987). *Multiple Comparison Procedures*. Wiley, New York.
- Hsu, J. C. (1996). *Multiple Comparisons: Theory and Methods*. Chapman and Hall / CRC Press, Boca Raton.
- Jonckheere, A. R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. *Biometrika* 41: 133.
- Morgan, B. J. T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, London.
- OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577–585.
- Rao, J. N. K., ja Scott, A. J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Stat. Med.* 18: 1373–1385.
- Robertson, T., Wright, F. T., ja Dykstra, R. L. (1988). *Order restricted statistical inference*. Wiley.
- Tarone, R. E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. *Biometrika* 66: 585–590.
- 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.
- Williams D. A. (1975). The analysis of binary responses from toxicological experiments involving reproduction and teratogenicity. *Biometrics* 31: 949–952.
- Williams, D. A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. *Biometrika* 64: 9–14.

## ▼ M7

## 6. liide

STATISTIKAJUHISED ANDMETE HINDAMISEKS REGRESSIOONI  
TEEL

## Üldosa

Mudeli sobitamisel vaatlusandmetega kasutatakse paralleelrühma keskvärtust (pikkuse ja massi puhul) või osakaalu paralleelrühmas (marjaterast koorumise ja vastsete suuremise puhul) (OECD, 2006).

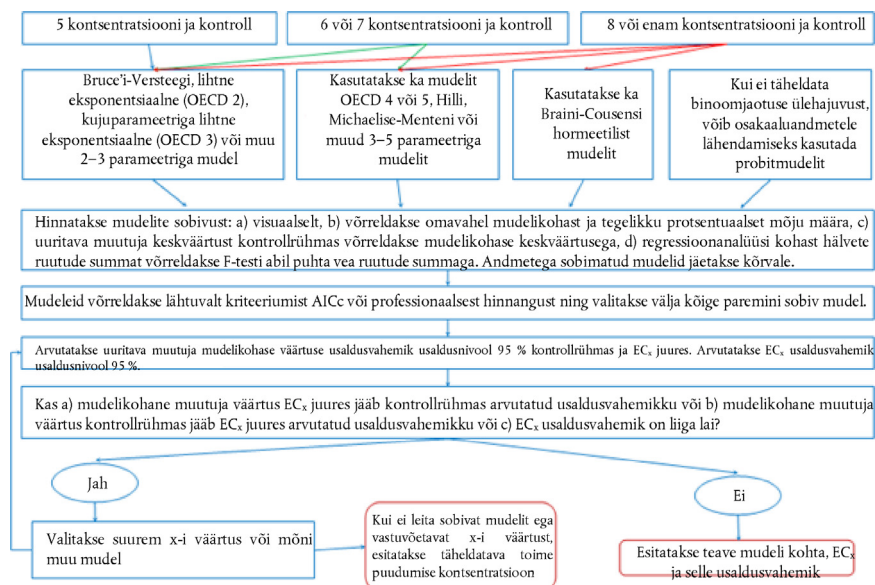
Üldjuhul on soovitatav kasutada paralleelrühma suurusega kaalutud regressioonanalüüsi. On võimalik kasutada ka muud kaalumismeetodid, näiteks kaalumist hinnangulise keskvärtusega või nii sellega kui ka paralleelrühma suurusega. Kaalumine sama kontsentratsiooniga proovide andmete hajuvuse pöördväärtusega ei ole soovitatav (Bunke *et al.*, 1999; Seber ja Wild, 2003; Motulsky ja Christopoulos, 2004; Huet *et al.*, 2003).

Analüüsile eelneval andmete teisendamisel tuleks alati säilitada vaatluste sõltumatus ning  $EC_x$  ja selle usaldusvahemikku tuleks väljendada algsetes, mitte teisendatud mõõtühikutes. Näiteks ei ole pikkuse logaritmi 20 % suurune muutus sama kui pikkuse 20 % suurune muutus (Lyles *et al.*, 2008; Draper ja Smith, 1999).

Joonisel 4 kujutatud vooskeem annab ülevaate  $EC_x$  hindamisest. Üksikasjalik kirjeldus on esitatud allpool tekstis.

Joonis 4

**Vooskeem  $EC_x$  hindamiseks paralleelrühmas täheldatava keskmise pikkuse või massi või koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu või vastsete suuremise puhul (üksikasjad on esitatud tekstis)**

**Kaalutlused marjaterast koorumise ja vastsete suuremise andmete puhul**

Marjaterast koorumise ja vastsete suuremise andmete puhul saadakse üldjuhul parim tulemus väärtuse vähenemisel põhineva mudeli sobitamisega, juhul kui ei kasutata probitmudelit, nagu on kirjeldatud allpool. See tähendab, et mudelis ei tohiks kasutada koorumata jäänud marjaterade või surnud vastsete osakaalu. Selle põhjuseks on asjaolu, et  $EC_x$  väljendab kontsentratsiooni, mille juures täheldatakse  $x$  % suurst muutust kontrollrühma keskvärtusega võrreldes. Kui kontrollrühmas jääb koorumata 5 % marjateradest ja mudeliga hinnatakse koorumata jäänud marjaterade osakaalu, väljendab  $EC_{20}$  kontsentratsiooni, mille juures täheldatakse 20 % suurst muutust koorumata jäänud marjaterade osakaalus, mis



▼ **M7**

on kontrollrühmas 5 %, see tähendab muutust väärtusega  $0,2 \times 0,05 = 0,01$  ehk 1 protsendipunkt, mis vastab koorumata jäänud marjaterade osakaalu suurenemisele 6 protsendini. Nii väikest muutust ei ole võimalik olemasolevate andmete alusel mõistlikult hinnata ja see ei ole bioloogiliselt oluline. Kui aga mudelis kasutatakse koorumiseni jõudnud marjaterade osakaalu, on see kirjeldatud näite puhul kontrollrühmas 95 % ning selle vähenemine 20 % kontrollrühma keskväärtusega võrreldes tähendab muutust väärtusega  $0,95 \times 0,2 = 0,18$  ehk koorumise edukuse vähenemist 95 protsendilt 77 protsendini (=  $95 - 18$ ); sellisel juhul on toime avaldumise kontsentratsiooni võimalik hinnata ja see pakub eeldatavalt suuremat huvi. Kõnealust probleemi ei teki suurust väljendavate mõõtmisandmete puhul, ehkki negatiivne mõju suurusele tähendab tavaliselt suuruse vähenemist.

**Mudelid suuruse (pikkus ja kehamass) ning marjaterast koorumise edukuse ja vastsete elulemuse hindamiseks**

Kõiki käsitletud mudeleid, välja arvatud Braini-Cousensi hormeetiline mudel, on kirjeldatud ja soovitatud viites OECD (2006). OECD mudeleid 2–5 on seoses ökotoksilisuse katsetega käsitletud ka viites Slob (2002). Loomulikult on palju muidki mudeleid, mis võivad kasulikud olla. Bunke *et al.* (1999) esitavad rea mudeleid, mida ei ole siin käsitletud, samuti leidub palju viiteid muudele mudelitele. Allpool loetletud mudeleid soovitatakse kui ökotoksilisuse katsete puhul iseäranis sobivaid mudeleid ning need on laialdaselt kasutusel.

*5 katsekontsentratsiooni lisaks kontrollrühmale*

- Bruce'i-Versteegi mudel
- Lihtne eksponentsiaalne mudel (OECD 2)
- Kujuparameetriga eksponentsiaalne mudel (OECD 3)
- Alampiiriga lihtne eksponentsiaalne mudel (OECD 4)

*6 katsekontsentratsiooni lisaks kontrollrühmale*

- Kujuparameetri ja alampiiriga eksponentsiaalne mudel (OECD 5)
- Michaelise-Menteni mudel
- Hilli mudel

Hormeesile viitavate visuaalsete tõendite olemasolu korral (marjaterast koorumise edukuse ja vastsete elulemuse puhul ebatõenäoline, kuid suurusega seotud vaatlusandmete puhul mõnikord täheldatav):

- Braini-Cousensi hormeetiline mudel (Brain ja Cousens, 1989).

**Alternatiivsed mudelid koorumata jäänud marjaterade osakaalu ja vastsete suremuse hindamiseks**

- Nende näitajate puhul võib suurenemisel põhinevate mudelite sobitamisel kasutada probit- või logistilisi mudeleid, kui ei ole tõendeid binoomjaotuse ülehajuvuse kohta ja mudeli sobitamisel hinnatakse kontrollrühma asjaomast näitajat. See meetod ei ole eelistatud, kuna selle puhul käsitletakse analüüsiüksusena mitte paralleelnõud, vaid üksikisendit (Morgan, 1992; O'Hara Hines ja Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

**Konkreetsed mudeli sobivus andmetega**

- Vaatlusandmete kohast ja mudelile vastavat hinnangulist protsentuaalset vähenemist igal katsekontsentratsioonil võrreldakse visuaalselt (Motulsky ja Christopoulos, 2004; Draper ja Smith, 1999).
- F-testi abil võrreldakse regressioonianalüüsi kohast vea ruutkeskmist puhta vea ruutkeskmisega (Draper ja Smith, 1999).
- Veendutakse, et mudeli kõik argumendid erinevad oluliselt nullist (st tehakse kindlaks, kas mudeli kõik argumendid on olulised) (Motulsky ja Christopoulos, 2004).

▼ **M7**

- Koostatakse diagramm, mis väljendab regressioonanalüüsi teel saadud hälvete sõltuvust katsekonsentratsioonist ja kus kontsentratsiooni puhul võib kasutada logaritmskaalat. Sellest diagrammist ei tohiks nähtuda mingit sõltuvust; punktid peaksid olema nullkõrgusel asuva horisontaaljoone suhtes juhuslikult hajutatud.
- Andmete vastavust normaaljaotusele ja nende hajuvuse homogeensust tuleks hinnata samal viisil, nagu on kirjeldatud 5. liites.
- Peale selle tuleks regressioonimudeli kohaste hälvete vastavust normaaljaotusele hinnata samade meetoditega, mida on kirjeldatud 5. liites seoses dispersioonanalüüsil saadavate hälvetega.

**Mudelite võrdlemine**

- Kasutatakse Akaike informatsioonikriteeriumi (AICc). Väiksem AICc väärtus tähistab paremat sobivust ning kui  $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$ , siis on mudel A peaaegu kindlalt parem kui mudel B (Motulsky ja Christopoulos, 2004).
- Kahte mudelit võrreldakse omavahel visuaalselt; hinnatakse, kui hästi kumbki mudel vastab eespool kirjeldatud sobivuse kriteeriumidele.
- Soovitatakse rakendada parsimoonia põhimõtet, mille kohaselt kasutatakse lihtsaimat mudelit, mis sobib andmetega piisavalt hästi (Ratkowsky, 1993; Lyles *et al.*, 2008).

**Hinnangulise EC<sub>x</sub> usaldusväärsus**

EC<sub>x</sub> usaldusvahemik ei tohiks olla liiga lai. Kasutuskõlbliku EC<sub>x</sub> usaldusvahemiku suurima laiuse üle otsustamiseks tuleb kasutada statistilist hindamist. Simulatsioonidest regressioonimudelite sobitamiseks marjaterast kooremise ja suuruse andmetega nähtub, et EC<sub>x</sub> (x = 10, 20 või 30) usaldusvahemikest umbes 75 % ei hõlma üle kahe katsekonsentratsiooni. See annab üldise ettekujutuse sellest, milline väärtus on aktsepteeritav, ning praktilise ettekujutuse sellest, mis on saavutatav. Paljud autorid kinnitavad vajadust esitada usaldusvahemik mudeli kõikide parameetrite puhul ning toonitavad, et mudeli parameetri lai usaldusvahemik viitab vastuvõetamatule mudelile (Ott ja Longnecker, 2008; Alvord ja Rossio, 1993; Motulsky ja Christopoulos, 2004; Lyles *et al.*, 2008; Seber ja Wild, 2003; Bunke *et al.*, 1999; Environment Canada, 2005).

EC<sub>x</sub> (või mudeli mõne muu parameetri) usaldusvahemik ei tohiks hõlmata nulli (Motulsky ja Christopoulos, 2004). See on regressioonanalüüsis samaväärne minimaalse olulise erinevusega, millele hüpoteesi kontrollimiseks kasutatavate lähenemisviiside puhul tihti viidatakse (nt Wang *et al.*, 2000). Ühtlasi vastab see vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioonil saadud keskvaertuse usaldusvahemikule, mis ei hõlma kontrollrühma keskvaertust. Tuleks hinnata, kas parameetri hinnanguline väärtus on teaduslikult usutav. Näiteks kui usaldusvahemik väärtusel  $y = 0 \pm 20\%$ , ei ole EC<sub>10</sub> hinnanguline väärtus usutav. Kui mudeli põhjal peaks kontsentratsioonil C avalduva mõju ulatus olema 20 % ning sellel ja madalamal kontsentratsioonil täheldatav suurim mõju on 10 %, ei ole EC<sub>20</sub> väärtus usutav (Motulsky ja Christopoulos, 2004; Wang *et al.*, 2000; Environment Canada, 2005).

EC<sub>x</sub> puhul ei tohiks olla vajadust rakendada ekstrapoleerimist kasutatud kontsentratsioonide vahemikust väljapoole (Draper ja Smith, 1999; OECD, 2006). Näiteks võiks EC<sub>x</sub> väärtus olla üldjuhul kõige rohkem umbes 25 % väiksem kui madalaim katses kasutatud kontsentratsioon või umbes 25 % suurem kui kõrgeim kasutatud kontsentratsioon.

**VIITED**

Alvord, W. G., ja Rossio, J. L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. *J. Immunol. Methods* 157: 155–163.

Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29: 93–96.

▼ M7

- Bunke, O., Droge, B., ja Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33: 197–240.
- Collett, D. (2002). *Modelling Binary Data*. Teine väljaanne. Chapman and Hall, London.
- Collett, D. (2003). *Modelling Survival Data in Medical Research*. Teine väljaanne. Chapman and Hall, London.
- Draper, N. R., ja Smith, H. (1999). *Applied Regression Analysis*. Kolmas väljaanne. New York: John Wiley & Sons.
- Environment Canada (2005). *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*; aruanne EPS 1/RM/46.
- Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., ja Jolivet, E. (2003). *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*. Springer Series in Statistics, New York.
- Lyles, R. H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., ja Cooper, C. R. (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp. Clin. Trials* 29 (6): 878–886.
- Morgan, B. J. T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, London.
- Motulsky, H., ja Christopoulos, A. (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, USA.
- O'Hara Hines, R. J., ja Lawless, J. F. (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics* 49: 107–121.
- OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*. Series on Testing and Assessment No. 54. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- Ott, R. L., ja Longnecker, M. T. (2008). *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. Kuues väljaanne. Brooks-Cole, Belmont, CA.
- Ratkowsky, D. A. (1993). Principles of nonlinear regression. *J. Ind. Microbiol.* 12: 195–199.
- Seber, G. A. F., ja Wild, C. J. (2003). *Nonlinear Regression*. Wiley.
- Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298–312.
- Wang, Q., Denton, D. L., ja Shukla, R. (2000). Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 113–117.

## ▼ M7

## C.48. Lühiajaline kalade paljunemise katse

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 229 (2012). Vajadus töötada välja ja valideerida kaladega tehtav katse, millega saab välja selgitada endokriinsüsteemi mõjutavaid kemikaale, tuleneb murest, et kemikaalid võivad keskkonnas esinevas kontsentratsioonis avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka loomadele, kuna nad mõjutavad endokriinsüsteemi. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate juhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et selgitada sõeluuringutega välja võimalikud endokriinsüsteemi kahjustajad ja teha nendega katseid. Üks selle tegevuse eesmärk oli töötada välja katsejuhend sõeluuringu tegemiseks, et selgitada välja kalade endokriinsüsteemi mõjutavad kemikaalid. Lühiajaline kalade paljunemise katse on läbinud ulatusliku valideerimisprogrammi, mis hõlmas teatavate kemikaalide laboritevahelisi uuringuid ja millega tõendati, et katse annab asjakohaseid ja usaldusväärseid tulemusi selliste kemikaalide kindlakstegemisel, mis eri mehhanismide, sealhulgas endokriinse toime kaudu mõjutavad kalade paljunemist (1–5). Kõik OECD katsejuhendi kohased lõppnäitajad on valideeritud tüseda tõmpnina puhul ning osa lõppnäitajatest on valideeritud ka Jaapani riisikala puhul (vitellogeniin ja teisesed sootunnused) ja võõdilise daanio puhul (vitellogeniin). Valideerimine on vastastikuse eksperdi hinnangu korras osaliselt läbi vaadanud OECD katsejuhendite programmi riiklike koordinaatorite määratud eksperdirühm (6), samuti on selle läbi vaadanud Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseameti volitatud sõltumatu eksperdirühm (29). Katse eesmärk ei ole kindlaks teha konkreetset hormonaalse häire mehhanismi, kuna katseloomadel on töökorras hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg, mis võib reageerida seda telge mõjutavatele kemikaalidele eri tasanditel.
2. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* sõeluuringus hoitakse suguküpsid isaskalu ja marja heitvaid emaskalu üheskoos ning nende elutsükli piiratud perioodi (21 päeva) jooksul kokkupuutes uuritava kemikaaliga. Kõnealuse 21-päevase kokkupuuteperioodi lõpus mõõdetakse isas- ja emaskaladel kahte bioloogilist lõppnäitajat, mille põhjal tehakse järeldused uuritava kemikaali endokriinse toime kohta; need lõppnäitajad on vitellogeniin ja teisesed sootunnused. Vitellogeniini määratakse nii tüseda tõmpnina, jaapani riisikala kui ka võõdilise daanio puhul, ent teiseid sootunnuseid mõõdetakse üksnes tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul. Peale selle jälgitakse katse vältel iga päev kvantitatiivselt sigivust. Samuti säilitatakse sugunäärmed, mille histopatoloogilise analüüsi alusel saab hinnata katseloomade paljunemisvõimet ja koguda seeläbi tõendusmaterjali muudel lõppnäitajatel põhinevate järelduste toetuseks.
3. Käesolevat bioloogilist katsemeetodit kasutatakse *in vivo* paljunemise sõeluuringuks ja selle rakendamist tuleks vaadelda endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku (30) osana. Lühiajalist kalade paljunemise katset käsitletakse selles kontseptuaalses raamistikus 3. tasandi *in vivo* katsena, millest saadakse teavet teatud kindla(te) endokriinse(te) mehhanismi(de) või raja/radade kohta.

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Vitellogeniini sünteesitakse tavaliselt ovipaarsete selgroogsete emasloomade maksas vastuseks veres ringlevale endogeensele östrogeenile. See on munarebu valkude eelkäija ja pärast sünteesimist maksas liigub see vere kaudu munasarjadesse, kus arenevad munarakud seda seovad ja modifitseerivad. Vitellogeniin on peaaegu tuvastamatu isaskalade ja ebaküpsete emaskalade vereplasmas, kuna sellistel kaladel ei ole vereringes piisavalt östrogeeni, kuid eksogeense östrogeeniga stimuleerimise korral on nende maks võimeline vitellogeniini sünteesima ja verre eritama.

▼ M7

5. Vitellogeniini mõõtmise kaudu tehakse kindlaks kemikaalid, millel on eri viisidel avaldud östrogeenne mõju. Östrogeense mõjuga kemikaale on võimalik tuvastada vitellogeniini mõõtmisega isaskaladel ja see on eelretsenseeritud teaduskirjanduses hästi tõendatud (nt viide 7). Samuti on tõendatud, et vitellogeniini toodetakse pärast kokkupuudet aromatiseeritavate androgeenidega (8, 9). Kui emaskalade veres langeb östrogeeni tase, näiteks seepärast, et inhibeeritakse ensüüm aromataasi, mis muundab endogeense androgeeni looduslikuks östrogeeniks  $17\beta$ -östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise; seda kasutatakse aromataasi inhibeerivate kemikaalide tuvastamiseks (10, 11). Östrogeense mõjuga kemikaaliga või aromataasi inhibiitoriga kokkupuutele järgneva vitellogeniinitaseme muutumise bioloogiline olulisus on hästi tõendatud. Siiski on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus.
6. Välja on töötatud ja tavakasutamiseks edukalt standarditud mitu mõõtmismeetodit. Nende hulgas on liigispetsiifilised ensüümimmunosorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid, mille puhul kasutatakse immunokeemiat vitellogeniini mõõtmiseks üksikisenditelt saadud väikestes vere- või maksaproovides (12–18). Vitellogeniini mõõtmiseks võetakse tüseda tõmpnina vereproov, vöödilise daanio vereproov või pea-saba homogenaat ja jaapani riisikala maks. Jaapani riisikala puhul on vitellogeniini verest ja maksast määramise tulemused omavahel heas korrelatsioonis (19). Soovitavad proovivõtumeetodid vitellogeniini määramiseks on esitatud 6. liites. Vitellogeniini mõõtmise komplektid on laialdaselt kättesaadavad; sellised komplektid peaksid põhinema valideeritud liigispetsiifilisel ELISA meetodil.
7. Teatavate liikide isaskalade teised sootunnused on väliselt nähtavad ja mõõdetavad ning sõltuvad endogeensete androgeenide tasemest vereringes; see on nii tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala puhul, kuid mitte vöödilise daanio puhul, kellel ei ole mõõdetavaid teiseid sootunnuseid. Emaskaladel säilib võime omandada isaskalale iseloomulikud teised sootunnused, kui nad puutuvad kokku vees olevate androgeensete kemikaalidega. Teaduskirjandusest võib leida mitu uuringut, milles on tõendatud tüseda tõmpnina (20) ja jaapani riisikala (21) selline reageerimine androgeensetele kemikaalidele. Teiste sootunnuste vähenemist isaskaladel tuleks tõlgendada ettevaatusega, kuna selliste andmete statistiline võimsus on väike; tõlgendamisel tuleks toetuda eksperdiarvamusele ja võtta arvesse tõendite kaalukust. Vöödilise daanio kasutamisele selles katses on piiranguid, kuna sellel kalal puuduvad mõõdetavad teised sootunnused, mille kaudu hinnata reaktsiooni androgeense mõjuga kemikaalidele.
8. Tüseda tõmpnina puhul on eksogeensete androgeenidega kokkupuute peamine näitaja pulmarüü kõbrukeste arv emaskala ninamikul. Jaapani riisikala puhul on nn papillaarjätke arv peamine tunnus, mis viitab emaskala kokkupuutele eksogeensete androgeensete kemikaalidega. Soovitavad meetodid tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala sootunnuste hindamiseks on esitatud vastavalt 5A ja 5B liites.
9. Kõnealuse 21-päevase kaladega tehtava katse käigus hinnatakse kvantitatiivselt marja tootmist ning säilitatakse sugunäärmed, et teha neile vajaduse korral histopatoloogiline analüüs. Mõni reguleeriv asutus võib nõuda selle täiendava lõppnäitaja hindamist katseloomade paljunemisvõimest täielikuma ülevaate saamiseks või juhul, kui kokkupuute kemikaaliga ei mõjuta vitellogeniinitaset ja teiseid sootunnuseid. Ehkki mõni lõppnäitaja (nt vitellogeniini süntees isaskalades ja kõbrukeste moodustumine emaskaladel) võib olla suure diagnostilise väärtusega, ei ole muude lõppnäitajate puhul (nt sigivus ja sugunäärmete histopatoloogiline analüüs tulemused) eesmärk teha üheselt kindlaks konkreetset toimemehhanismid raku tasandil. Pigem võimaldavad kasutatavad lõppnäitajad koos teha järeldusi võimalike endokriinsete häirete kohta ja kavandada selle põhjal täiendavaid katseid. Ehkki sigivus ei sõltu üksnes endokriinsest toimest, on selle lõppnäitaja kasutamine oluline, kuna selle tundlikkus teadaoleva endokriinse toimega kemikaalide

▼ M7

suhtes on tõendatud (5) ning kui mõju sellele ja muudele lõppnäitajatele puudub, võib suurema kindlusega väita, et asjaomane kemikaal ei ole tõenäoliselt endokriinselt aktiivne. Kui aga mõju sigivusele on olemas, on see kaalukas lisatõend endokriinse toime kohta. Juhised andmete tõlgendamiseks ja katsetulemuste vastuvõetavaks lugemise kohta on esitatud allpool käesoleva katsemeetodi kirjelduses.

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

11. Katses viiakse paljunemisvõimelised isas- ja emaskalad katsenõudes kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kuna kalad on täiskasvanud ja paljunemiseas, on kumbagi sugu kerge eristada; seega on võimalik iga lõppnäitaja määramisel sugu arvesse võtta ning on tagatud kalade tundlikkus eksogeensete kemikaalide suhtes. Katse lõpus määratakse kala sugu sugunäärmete makroskoopilise vaatlusega pärast seda, kui kõht on kääridega lahti lõigatud. Vastavate biokatse tingimuste ülevaade on esitatud 2. liites. Katset alustatakse tavaliselt kaladega, kes on võetud kudemisvalmis populatsioonist; vanu kalu ei tohiks kasutada. Juhised seoses kalade vanuse ja paljunemisvõimega on esitatud kalade valimist käsitlevas jaotises. Katses kasutatakse kemikaali kolmes kokkupuutekontsentratsioonis ning veega kontrollrühma ja vajaduse korral ka lahustiga kontrollrühma. Võõdilise daanio puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt kahte nõud, millest kummaski on 5 isaskala ja 5 emaskala. Tüsedä tömpnina puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt nelja nõud, igas nõus 2 isaskala ja 4 emaskala. Sellega võetakse arvesse isase tüsedä tömpnina territoriaalset käitumist, kuid säilitatakse samal ajal katse piisav statistiline võimsus. Jaapani riisikala puhul kasutatakse iga kontsentratsioonipunkti kohta paralleelselt nelja nõud, igas nõus 3 isaskala ja 3 emaskala. Kalu hoitakse kemikaaliga kokkupuutes 21 päeva ja kalade proovid võetakse kokkupuute 21. päeval. Sigivust hinnatakse iga päev kvantitatiivselt.
12. Proovivõtmisel 21. päeval surmatakse kõik kalad humaanselt. Tüsedä tömpnina ja jaapani riisikala puhul mõõdetakse teised sootunnused (vt 5A ja 5B liide); võõdilisel daaniolt ja tüsedalt tömpninalt võetakse vereproovid vitellogeniini määramiseks; võõdilisel daaniolt võib selle asemel koguda vitellogeniini määramiseks pea ja saba (6. liide); jaapani riisikalalt võetakse vitellogeniini määramiseks maks (6. liide); sugunäärmed fikseeritakse koos terve organismiga või eraldi, et neid vajaduse korral histopatoloogiliselt analüüsida (22).

## KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITERIUMID

13. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised tingimused:
- suremus veega (või lahustiga) kontrollrühmas ei tohiks kokkupuuteperioodi lõpuks olla suurem kui 10 %;
  - lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu kokkupuuteperioodi jooksul olema vähemalt 60 % õhu küllastuskontsentratsioonist;
  - vee temperatuur ei tohiks kogu kokkupuuteperioodi jooksul katsenõudes erineda rohkem kui  $\pm 1,5$  °C ja see tuleks hoida vahemikus  $\pm 2$  °C katsealuse liigi puhul ette nähtud temperatuurist (2. liide);
  - tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus  $\pm 20$  % mõõtmistulemuste keskvaärtusest;

▼ **M7**

- tuleks esitada tõendid selle kohta, et kalad koevad katse vältel enne kemikaaliga kokkupuudet aktiivselt kõikides paralleelnõudes, sealhulgas kontrollrühmas.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

14. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:
  - a. hapnikumõõtur ja pH-meeter;
  - b. seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;
  - c. asjakohased temperatuuri reguleerimise ja soovitatavalt selle pideva jälgimise seadmed;
  - d. soovitatava biomassisalduse ja asustustiheduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist mahutid (vt 2. liide);
  - e. tüseda tõmpnina ja vöödilise daanio kudemissubstraat; vajalikud üksikajad on esitatud 4. liites;
  - f. sobiva täpsusega kaal (st täpsusega  $\pm 0,5$  mg).

**Vesi**

15. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui  $\pm 0,5$  pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (näiteks põhjustades uuritava kemikaali komplekseerumise), tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimeetriteks veeproov. Kui lahendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ning pestitsiidide sisaldus (näiteks fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus), orgaanilise süsiniku üldsisaldus ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kolme kuu järel. Kui on tõendatud, et vee kvaliteet on vähemalt ühe aasta jooksul püsiv, võib sellist määramist teha harvem (näiteks iga kuue kuu järel). Lahendusvee mõned nõutavad keemilised omadused on esitatud 3. liites.

**Katselahused**

16. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahus tuleks soovitatavalt valmistada lihtsalt uuritava kemikaali segamise või loksutamise lahendusvees; selleks tuleks kasutada mehaanilist töötlust (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahusti kasutamine ei ole soovitatav. Kui lahusti on siiski vajalik, tuleks katses paralleelselt kasutada lahustiga kontrolli, milles lahusti kontsentratsioon on sama kui uuritava kemikaaliga nõudes. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahusti olla tehniliselt parim lahendus; sel juhul tuleks tutvuda OECD juhenddokumendiga (23) raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta. Lahusti valiku määravad aine või segu keemilised omadused. OECD juhenddokumendis soovitatakse kontsentratsiooni kuni 100  $\mu\text{l/l}$ , millest tuleks kinni pidada. Ühes hiljutises ülevaates (24) on aga esile tõstetud täiendavad probleemid, mis tekivad, kui endokriinse toime uurimisel kasutatakse lahustit. Seepärast soovitatakse, et kui lahusti on vajalik, peaks selle kontsentratsioon olema tehnilisest teostatavusest lähtuvalt minimaalne (sõltuvalt uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest).

▼ **M7**

17. Katses kasutatakse läbivoolusüsteemi. Sellises süsteemis lisatakse ja lahjendatakse uuritava kemikaali põhilahust pidevalt (nt dosaatorpumba, proportsionaalse lahjendamise seadme või küllastamissüsteemiga), et tekitada katsekambrites rida eri kontsentratsioone. Põhilahuste ja lahjendusvee voolukiirust tuleks kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, soovitatavalt iga päev, ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Tuleks hoiduda kasutamast ebakvaliteetseid plasttorusid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale. Materjali valimisel läbivoolusüsteemi jaoks tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist.

**Kalade pidamine**

18. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboripopulatsioonist, soovitatavalt samast parvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katsset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele tingimustele. On oluline, et biomassisisaldus ja asustustihedus (mõisted on määratletud 1. liites) oleksid katses kasutatavale liigile sobivad (vt 2. liide).
19. Pärast 48-tunnist harjumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:
- kui suremus on populatsioonis seitsme päeva jooksul suurem kui 10 %, jätakse kogu partii kõrvale;
  - kui suremus populatsioonis on 5–10 %, lastakse kaladel kohaneda veel seitse päeva; kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jätakse kogu partii kõrvale;
  - kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.
20. Kohanemise ajal, kokkupuutele eelneval perioodil ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida.

**Kokkupuute-eelne periood ja kalade valimine**

21. Soovitatakse kasutada ühe kuni kahe nädala pikkust kokkupuute-eelset perioodi, mille vältel kalad on paigutatud tegelikus katses kasutatavatega sarnastesse nõudesse. Kalu tuleks sööta kogu pidamisperioodi ja kokkupuuteperioodi vältel *ad libitum*. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnustega kummastki soost täiskasvanud kaladega (nt nende teisesed sootunnused peaksid olema tüsedä tõmpnina ja jaapani riisikala puhul selgelt nähtavad), kes pärinevad labori suguküpsete kalade varudest ja koevad aktiivselt. Üksnes üldise ettekujutuse loomiseks tuleb öelda (ja seejuures ei tohi jätta arvestamata konkreetse kalapartii tegelikku paljunemisvõimet), et tüsedä tõmpnina vanus peaks olema ligikaudu 20 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Jaapani riisikala vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 25 ± 2 °C. Vöödilise daanio vanus peaks olema ligikaudu 16 (± 2) nädalat eeldusel, et neid kalu on kogu nende elu jooksul peetud temperatuuril 26 ± 2 °C. Kokkupuute-eelsel perioodil tuleks marja tootmist hinnata iga päev. Soovitatavalt peaks kudemine olema enne kokkupuuteperioodi algust tähteldav kõikides paralleelnõudes. Siinkohal ei ole võimalik esitada soovitatavat marjaterade arvu päevas, kuid iga kõnealuse liigi puhul on üsna tavaline, et emaskala kohta koetakse päevas keskmiselt üle 10 marjatera. Et tagada paralleelnõude tasakaalustatud jaotus eri katsekonsentratsioonide vahel, tuleks kasutada sellist plokkide randomiseeritud paigutust, mille aluseks on marja tootmise tase.



▼ **M7****KATSEPLAAN**

22. Katses kasutatakse uuritavat kemikaali kolmes kontsentratsioonis, ühte (veega) kontrollrühma ja vajaduse korral ühte lahustiga kontrollrühma. Andmeid võib analüüsida, et teha kindlaks statistiliselt olulised erinevused kemikaaliga kokku puutunud rühma ja kontrollrühma näitajate vahel. Kõnealusest analüüsist ilmneb, kas uuritava kemikaaliga saadud andmeid võib kasutada riskihindamisel või oleks vaja teha täiendav pikemaajaline katse kemikaali kahjuliku mõju (st elulemusele, arengule, kasvule ja paljunemisele avalduv mõju) väljaselgitamiseks (25).
23. Võõdilise daanio puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (5 isas- ja 5 emaskala kummastki paralleelnõust) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase. Jaapani riisikala puhul võetakse katse 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (3 isas- ja 3 emaskala igast paralleelnõust, mida on kokku neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase ja teisesed sootunnused. Tüseda tõmpnina puhul võetakse kokkupuute 21. päeval isas- ja emaskalad igale kontsentratsioonile vastavast rühmast (2 isas- ja 4 emaskala igast paralleelnõust, mida on kokku neli) ja kontrollrühma(de)st, et mõõta vitellogeniini tase ja teisesed sootunnused. Tuleb hinnata kvantitatiivselt sigivust ning sugunäärmed tuleks koos terve organismiga või eraldi fikseerida, et neid saaks vajaduse korral histopatoloogiliselt hinnata.

**Katsekonsentratsioonide valimine**

24. Käesoleva katsemeetodi puhul peaks suurim katsekonsentratsioon olema maksimaalne talutav kontsentratsioon, mis tehakse kindlaks kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega või muude mürgisuse andmete põhjal, 10 mg/l või vees lahustuvuse piirkonsentratsioon, olenevalt sellest, milline neist on väiksem. Uuritava kemikaali maksimaalne talutav kontsentratsioon on suurim kontsentratsioon, mille puhul suremus on väiksem kui 10 %. Sellise lähenemisviisi puhul eeldatakse, et on olemas empiirilised andmed ägeda mürgisuse kohta või muud mürgisuse andmed, mille põhjal saab tuletada maksimaalse talutava kontsentratsiooni. Sellise kontsentratsiooni hindamine võib olla ebatäpne ja nõuab tavaliselt erialateadmisi.
25. Katses tuleb kasutada kolme kontsentratsiooni, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 10, ning lahjendusveega kontrolli (ja vajaduse korral ka lahustiga kontrolli). Kontsentratsioonide jada teguri puhul soovitatav vahemik on 3,2–10.

**KATSE KÄIK****Katsealuste kalade valimine ja kaalumine**

26. On tähtis tagada, et kalade kehamassi erinevused katse alguses oleksid minimaalsed. Käesolevas katsemeetodis eri liikide puhul soovitatavad suurusevahemikud on esitatud 2. liites. Katses kasutatavas kalade partiiis peaks kõikide isas- ja emaskalade kehamass jääma katse alguses võimaluse korral vahemikku  $\pm 20\%$  samasooliste kalade massi aritmeetilisest keskmisest. Soovitatav on kaaluda enne katset samast kalade populatsioonist osaproov, et leida hinnanguline keskmine kehamass.

**Kokkupuutetingimused***Kestus*

27. Katse algab kokkupuute-eelse perioodi lõppemisel ja kestab 21 päeva. Soovitatav kokkupuute-eelne periood on üks kuni kaks nädalat.

*Söötmine*

28. Kalu tuleks sööta sobiva söödaga (2. liide) *ad libitum* ja piisavalt tihti, et tagada nende organismi hea seisund. Tuleb kanda hoolt mikroobide kasvu ja vee hädgustumise ärahoidmise eest. Üldreeglina võib paevaratsiooni jagada

▼ **M7**

kaheks või kolmeks võrdseks osaks ja sööta kalu mitu korda päevas vähemalt kolmetunniste vaheaegadega. Suurem ühekordne söödakogus on samuti lubatav, eelkõige nädalalõpul. Kalu ei tohiks sööta 12 tunni jooksul enne proovivõtmist/lahkamist.

29. Kalasööda kohta peaks olema teada saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliiliste aroomaatsete süsivesinike ja polüklooritud bifenüülide sisaldus. Suure fütoöstrogeenisaldusega sööta, mis maskeeriks kalade reaktsiooni teadaolevale östrogeeni agonistile (nt 17β-östradiol), ei tohiks kasutada.
30. Sööda ülejäägid ja väljaheidet tuleks eemaldada katsenõudest vähemalt kaks korda nädalas, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil.

*Valgus ja temperatuur*

31. Valgustusperiood ja veetemperatuur peaksid olema katseliigile sobivad (vt 2. liide).

**Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus**

32. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Tuleks kindlaks teha kõik vajalikud analüüsimeetodid, sealhulgas peaks olema piisavalt teavet uuritava kemikaali püsivuse kohta katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid korrapäraste ajavahemike järel järgmiselt: lahjendusvee ja kemikaali põhilahuse voolukiirust tuleks katse jooksul kontrollida soovitatavalt iga päev, kuid vähemalt kaks korda nädalas, ja see ei tohiks kogu katse vältel varieeruda rohkem kui 10 %. Uuritava kemikaali tegelik kontsentratsioon soovitatakse määrata kõikides nõudes katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega.
33. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nominaalsest kontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda kas nominaalsetel või mõõdetud väärtustel.
34. Proove võib olla vaja filtrida (nt läbi 0,45 µm suuruste pooridega filtri) või tsentrifuugida. Sellise vajaduse korral tuleks eelistada tsentrifuugimist. Kui uuritav aine ei adsorbeeru filtril, võib siiski olla vastuvõetav ka filtrimine.
35. Katse ajal mõõdetakse lahustunud hapniku sisaldust, temperatuuri ja pH-d kõigis katsenõudes vähemalt kord nädalas. Üldkaredust ja leelisust tuleks mõõta kontrollnõudes ja ühes kemikaali suurima kontsentratsiooniga katsenõus vähemalt kord nädalas. Temperatuuri tuleks soovitatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katsenõus.

**Vaatlused**

36. Katse käigus või katse lõpus hinnatakse mitut üldist näitajat (nt elulemus) ja bioloogilist näitajat (nt vitellogeniini tase). Sigivust on vaja hinnata kvantitatiivselt iga päev. Allpool on kirjeldatud nende lõppnäitajate mõõtmist ja hindamist ning nende kasulikkust.

*Elulemus*

37. Kalad tuleks katseperioodi jooksul iga päev üle vaadata; kõik surmajuhtumid tuleks registreerida ja surnud kalad võimalikult kiiresti eemaldada. Surnud kalu ei tohiks asendada ei kontrollnõudes ega ka kemikaaliga nõudes. Katse kestel surnud kalade sugu tuleks määrata sugunäarmete makroskoopilise hindamise teel.

▼ **M7***Käitumine ja välimus*

38. Igasugune ebatavaline käitumine (võrreldes kontrollrühmaga) tuleks registreerida; see võib hõlmata üldise mürgisuse ilminguid, sealhulgas hingeldamist, koordineerimata ujumist, tasakaalu kaotamist ja ebatüüpilist liikumatust või söömist. Lisaks tuleks registreerida välised anomaaliad (näiteks veritsus, värvimuutus). Selliseid mürgisuse nähte tuleks andmete tõlgendamisel hoolikalt kaaluda, kuna need võivad ilmneda kemikaali sellisel kontsentratsioonil, mille juures endokriinse toime biomarkerid ei ole usaldusväärsed. Kõnealune käitumise vaatlemine võib samuti anda kasulikku kvalitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks kaladega tehtavate katsete puhul edaspidi kohaldada. Näiteks on tüseda tõmpnina puhul täheldatud normaalsetel isaskaladel ja maskuliniseerunud emaskaladel androgeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel territooriumiga seotud agressiivsust; vöödilise daanio puhul on tavaline paaritumis- ja kudemiskäitumine koidikul pärast valgeks minemist östrogeense või antiandrogeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel takistatud või ilmneb vähem.
39. Kuna mõned välistunnused (eelkõige värvus) võivad kala käsitlemise käigus kiiresti muutuda, on oluline registreerida kvalitatiivsed tähelepanekud enne kalade katsesüsteemist eemaldamist. Tüseda tõmpnina saadud seniste kogemuste kohaselt võivad mõned endokriinse toimega kemikaalid esialgu tekitada muutusi järgmistes välistes tunnustes: keha värvus (hele või tume), värvimuster (vertikaalsete vöötide olemasolu) ja kehakuju (pea ja rinnaosa). Seepärast tuleks kogu katse jooksul ja katse lõpus vaadelda kalade füüsilist välimust.

*Sigivus*

40. Kudemist käsitlevad igapäevased vaatlusandmed tuleks registreerida paralleelrühma tasandil. Marja tootmise andmete puhul tuleks paralleelrühma tasandil registreerida marjaterade arv elus emaskala kohta päevas. Marjaterad eemaldatakse iga päev katsekambrist. Tüseda tõmpnina ja vöödilise daanio puhul tuleks paigutada katsekambrisse kudemissubstraat, et kalad saaksid kudedada tavapärastes tingimustes. Soovitavaid kudemissubstraate on üksikasjalikumalt kirjeldatud 4. liites (vöödilise daanio puhul 4A liites ja tüseda tõmpnina puhul 4B liites). Jaapani riisikala puhul ei peeta kudemissubstraadi lisamist vajalikuks.

*Kalade humaanne surmamine*

41. Kalad tuleks 21. päeval, st kemikaaliga kokkupuute lõpetamisel humaanselt surmata vajaliku koguse trikaiiniga (trikaiinmetaansulfonaat, metakaiin, MS-222 (CASi nr 886-86-2), 100–500 mg/l), mis on limaskestast ärrituse vähendamiseks puhverdatud NaHCO<sub>3</sub>-ga (naatriumvesinikkarbonaat (CASi nr 144-55-8), 300 mg/l); seejärel võetakse vere- või koeproov vitellogeniini määramiseks, nagu on selgitatud jaotises „Vitellogeniin“.

*Teiseste sootunnuste vaatlemine*

42. Mõned endokriinse toimega kemikaalid võivad põhjustada muutusi spetsiifilistes teistes sootunnustes (pulmarüü kõbrukeste arv isasel tüsedal tõmpninal, papillaarjätmete arv isasel jaapani riisikalal). Teatava toimemehhanismiga kemikaalid võivad põhjustada teiseste sootunnuste ebanormaalselt ilmumist vastassoost isenditel; näiteks võivad sellised androgeenireseptori agonistid nagu trenboloon, metüültestosteroon ja dihidrotestosteroon põhjustada silmapaistvate pulmarüü kõbrukeste tekkimise emasel tüsedal tõmpninal või papillaarjätmete väljaarenemise emasel jaapani riisikalal (11, 20, 21). Samuti on leitud, et östrogeenireseptori agonistid võivad vähendada täiskasvanud isase tüseda tõmpnina pulmarüü kõbrukeste arvu ja turjapadjandi

▼ M7

suurust (26, 27). Sellised üldised morfoloogilised vaatlused võivad samuti anda kasulikku kvalitatiivset ja kvantitatiivset teavet selle kohta, milliseid nõudeid tuleks kaladega tehtavate katsete puhul edaspidi järgida. Tüsedä tömpnina pulmarüü kõbrukeste ning jaapani riisikala papillaarjätete arvu ja suurust saab mõõta kas otse või fikseeritud isenditel; viimane variant on mugavam. Tüsedä tömpnina ja jaapani riisikala teiste sootunnuste hindamise soovitatav kord on esitatud vastavalt 5A ja 5B liites.

*Vitellogeniin*

43. Veri võetakse sabaarterist või -veenist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartoruga või teise võimalusena süstla abil tehtava südamepunktsiooniga. Sõltuvalt kala suurusest on kogutava vere kogus tüsedä tömpnina isendi puhul üldiselt vahemikus 5–60 µl ja vöödilise daanio isendi puhul 5–15 µl. Plasma eraldatakse verest tsentrifugimisega ja seda hoitakse koos proteaasiinhibiitoritega – 80 °C juures kuni vitellogeniini määramiseni. Teise võimalusena kasutatakse vitellogeniini määramiseks kudede allikana jaapani riisikala maksa või vöödilise daanio pea-saba homogeneaati (6. liide). Vitellogeniin tuleks määrata valideeritud homoloogse ELISA meetodiga, kasutades homoloogset vitellogeniini standardit ja homoloogseid antikehi. Soovitatav on kasutada meetodit, millega on võimalik tuvastada vitellogeniini nii väikeses koguses kui mõni nanogramm plasma milliliitri (või koe milligrammi) kohta, mis on taustsisaldus isaskalal, kes ei ole kemikaaliga kokku puutunud.
44. Vitellogeniini määramise kvaliteedi kontrollimiseks kasutatakse standardeid ja negatiivseid kontrolle ning tehakse vähemalt kaks paralleelmõõtmist. Iga ELISA meetodi puhul tuleks teha maatriksiefekti (proovi lahjendamise mõju) hindamise katse, et määrata proovi minimaalne lahjendustegur. Iga ELISA plaat, mida kasutatakse vitellogeniini määramiseks, peaks sisaldama järgmisi kvaliteedikontrolli proove: vähemalt 6 kaliibrimisstandardit, mille kontsentratsioonivahemik hõlmab vitellogeniini kontsentratsiooni eeldatavat vahemikku, ja vähemalt üks negatiivne kontroll mittespetsiifilise seondumise hindamiseks (kaks paralleelproovi). Nende negatiivsete kontrollide puhul peaks neeldumine olema väiksem kui 5 % kaliibrimisstandardi puhul täheledatavast maksimaalsest neeldumisest. Igast proovi lahjendusest analüüsitakse vähemalt kahte alikvooti (paralleelkannudes). Kui tulemused paralleelkannudes erinevad rohkem kui 20 %, tuleks teha kordusanalüüs.
45. Kaliibrimiskõvera korrelatsioonikordaja ( $R^2$ ) peaks olema suurem kui 0,99. Hea korrelatsioon ei ole siiski piisav, et tagada ennustatavate väärtuste õigsus kõigis kontsentratsioonivahemikes. Lisaks kaliibrimiskõvera piisavalt heale korrelatsioonile peab ka standardi iga kontsentratsioon, mis arvutatakse kaliibrimiskõvera põhjal, jääma vahemikku 70–120 % vastavast nominaalsest kontsentratsioonist. Kui nominaalsed kontsentratsioonid kalduvad kaliibrimise regressioonisirgest eemale (nt madalatel kontsentratsioonidel), võib olla vajalik jagada kaliibrimiskõver madalale ja kõrgele kontsentratsioonile vastavateks osadeks või kasutada neeldumisandmete lähendamiseks mitte-lineaarset mudelit, mis neid õigesti kirjeldaks. Kui sirge jagatakse kaheks osaks, peaks kummaski osas olema  $R^2 > 0,99$ .
46. Avastamispiir on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon ning määramispiir on määratletud kui madalaim analüüsistandardi kontsentratsioon, mis on korrutatud väikseima lahjendusteguriga.
47. Igal vitellogeniini määramise päeval analüüsitakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga (7. liide). Selle standardi eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

*Sugunäärmete histopatoloogiline hindamine*

48. Reguleerivad asutused võivad nõuda sugunäärmete kui hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete teljel paikneva sihtorgani histopatoloogilist hindamist pärast kokkupuudet kemikaaliga. Sel põhjusel fikseeritakse sugunäärmed koos terve organismiga või eraldi. Kui histopatoloogiline analüüs on nõutav, vaadeldakse uuritava kemikaali endokriinse toime hindamisel spetsiifilist endokriinsüsteemiga seotud mõju sugunäärmetele. Kõnealuste diagnostiliste näitajatena tuleb muu hulgas hinnata munarakkude esinemist seemnesarjas,

▼ **M7**

Leydigi rakkude hüperplaasiat, rebutootmise vähenemist, spermatogoonide arvu suurenemist ja perifollikulaarset hüperplaasiat. Muudel sugunäärmete kahjustustel, näiteks munarakkude atreesial, seemnesarja taandarengul ja sugurakkude arenguga seotud muutustel võib olla mitu tekkepõhjust. Kalade sugunäärmete histopatoloogilist analüüsi käsitlevas juhenddokumendis on sätestatud kord, mida tuleb järgida sugunäärmete eraldamisel, fikseerimisel, koelõikude valmistamisel ja histopatoloogilisel hindamisel (22).

**ANDMED JA ARUANDLUS****Biomarkerite põhjal mõju hindamine dispersioonanalüüsiga**

49. Kemikaali võimaliku endokriinse toime tuvastamiseks võrreldakse kemikaaliga rühmades saadud näitajaid kontrollrühmade vastavate näitajatega; selleks kasutatakse dispersioonanalüüsi. Lahustiga kontrolli kasutamise korral tuleks iga lõppnäitaja puhul teha asjakohane statistiline test lahjendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli võrdlemiseks. Juhised lahjendusveega kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete kasutamise kohta edasises statistilises analüüsis on esitatud viites OECD (2006c) (28). Kõikide bioloogiliste näitajate andmeid tuleks analüüsida ja need esitada kummagi soo puhul eraldi. Kui parameetriliste meetodite vajalikud eeldused ei ole täidetud – tegemist on normaalkaotusest erineva kaotusega (nt Shapiro-Wilki test) või heterogeense hajuvusega (Bartletti test või Levene'i test) –, tuleks kaaluda andmete teisendamist, et muuta hajuvus enne dispersioonanalüüsi tegemist homogeenseks, või kaalutud dispersioonanalüüsi kasutamist. Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist ei ole monotoonne, võib kasutada Dunnetti testi (parameetiline) mitmeseks paariviisiliseks võrdlemiseks või Manni-Whitney testi Bonferroni parandusega (mitteparameetiline). Kui toime sõltuvus kontsentratsioonist on ligikaudu monotoonne, võib kasutada muid statistilisi teste (nt Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi test). Sobivaima statistilise testi leidmist hõlbustav statistilise analüüsi valimise vooskeem on esitatud 8. liites. Täiendav teave on kättesaadav ka OECD dokumendis, milles käsitletakse praegusi meetodeid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks (28).

**Katsetulemuste esitamine**

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist.

*Uurimislabor:*

- vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringus;
- iga labori pädevus peaks olema mitmesuguste representatiivsete kemikaalide kasutamise kaudu tõendatud.

*Uuritav kemikaal:*

- uuritava kemikaali iseloomustus;
- füüsikalised ja asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- katses kasutatud kontsentratsiooniga lahuste valmistamise meetod ja sagedus;
- teave püsivuse ja biolagundatavuse kohta.

*Lahusti:*

- lahusti iseloomustus (kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon);
- lahusti valimise põhjendus (kui see on muu kui vesi).

**▼ M7***Katseloomad:*

- liik ja liin;
- tarnija ja tema konkreetne käitis;
- kalade vanus katse alguses ja nende paljunemisvõime/kudemis seisund;
- kalade kohandamise meetodi üksikasjad;
- kalade kehamass kemikaaliga kokkupuute alguses (kalaparvest võetud osaproovi põhjal).

*Katsetingimused:*

- kasutatud katsemeetod (katse tüüp, biomassisaldus, asustustihedus jne);
- põhilahuse valmistamise meetod ja voolukiirus;
- nominaalsed katsekonsentratsioonid, igal nädalal mõõdetud katselahuste kontsentratsioonid ja kasutatud analüüsimeetod, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused (pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus, hõljuvaine sisaldus ja kõik muud mõõdetud näitajad);
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus ning asjakohaste saasteainete (nt polüklooritud bifenüülid, polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid) määramise korral sellise analüüsi tulemused).

*Tulemused:*

- tõendid selle kohta, et kontrollid vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele;
- andmed suremuse kohta iga katsekonsentratsiooni ja kontrolli puhul;
- kasutatud statistilise analüüsi meetodid, teave andmete töötlemise kohta ja selleks kasutatud meetodite valimise põhjendus;
- bioloogiliste vaatluste andmed üldiste morfoloogiliste muutuste, sealhulgas teiseste sootunnuste kohta, samuti marja tootmise ja vitellogeniini kohta;
- andmete analüüsi tulemused, soovitatavalt tabelite ja graafikute kujul;
- kalade ebatavaliste reaktsioonide esinemissagedus ja kõik uuritava kemikaali põhjustatud nähtavad ilmingud.

▼ M7

## KATSETULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

51. Käesolevas jaotises on esitatud mõned kaalutlused, mida tuleb arvesse võtta katses mõõdetavate eri lõppnäitajate puhul saadud tulemuste tõlgendamisel. Kui uuritav kemikaal näib põhjustavat ilmset mürgistust või mõjutavat katseloomade üldist seisundit, tuleks tulemuste tõlgendamisel olla ettevaatlik.
52. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks jälgida, et ei ületataks maksimaalset talutavat kontsentratsiooni; vastasel juhul ei ole võimalik andmeid mõistlikult tõlgendada. On oluline, et vähemalt ühe kontsentratsiooni juures ei täheldataks mingeid mürgisuse nähte. Haiguse ja mürgise toime ilminguid tuleks põhjalikult hinnata ja esitada need katseprotokollis. Näiteks on võimalik, et vitellogeniini sünteesi emaskalades võib mõjutada ka kemikaali üldine mürgisus ja muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduv mürgisus, näiteks hepatotoksilisus. Mõju tõlgendamist võivad hõlbustada sellistel kontsentratsioonidel saadud andmed, mille juures tulemusi ei moonuta süsteemne mürgisus.
53. Katsetulemuste kehtivaks tunnistamisel tuleb arvesse võtta mitut aspekti. Tuleks juhinduda sellest, et vitellogeniini tase kontrollrühmades peaks isas- ja emaskaladel olema erinev ning see erinevus peaks olema tüsedä tõmpnina ja võõdilise daanio puhul umbes kolm suurusjärku ning jaapani riisikala puhul umbes üks suurusjärk. Näited kontrollrühmades ja uuritava kemikaaliga rühmades saadud väärtuste vahemiku kohta on esitatud valideerimisaruannetes (1–4). Kõrge vitellogeniinitase kontrollrühma isaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ja nõrkade östrogeeni agonistide tuvastamise võimet. Madal vitellogeniinitase kontrollrühma emaskaladel võib negatiivselt mõjutada meetodi tundlikkust ning aromataasi inhibiitorite ja östrogeeni antagonistide tuvastamise võimet. Kõnealuseid valideerimisuuringuid kasutati käesolevate juhiste väljatõõtamiseks.
54. Marja tootmise kvantitatiivse hindamise puhul tuleb silmas pidada, et see varieerub suurel määral (vastav variatsioonikordaja võib olla 20–60 %); see piirab võimalust tuvastada katses marja tootmise olulist vähenemist, kui see jääb alla 70 % ja variatsioonikordaja on ligi 50 % või suurem. Kui variatsioonikordaja väärtus on väiksem (umbes 20–30 %), on meetodi võimsus piisav (80 %), et tuvastada marja tootmise vähenemine 40–50 % võrra. Tüsedä tõmpnina puhul kasutatakse katseplaani, millega nähakse muu hulgas ette neli paralleeli iga kontsentratsiooni kohta, peaks võimaldama määrata kõnealuse sigivust iseloomustava lõppnäitaja suurema võimsusega kui üksnes kahe paralleeliga katseplaani.
55. Kui laboris ei ole asjaomast katset varem läbi viidud või seal on tehtud olulisi muudatusi (nt on muutunud kalade liin või tarnija), on soovitatav teha tehnilise pädevuse katse. Soovitatavalt tuleks kasutada kemikaale, mille puhul täheldatakse kõigi kemikaalide lõikes rida eri toimemehhanisme või mõju mitmele katses kasutatavale lõppnäitajale. Praktikas kutsutakse iga laborit üles looma varasemate kontrollrühmi käsitlevate andmete põhjal oma andmestikku isas- ja emaskalade kohta ning tegema positiivse kontrolli katse östrogeense toimega kemikaaliga (nt 17 $\beta$ -õstradiool kontsentratsioonis 100 ng/l või mõni teadaolev nõrk agonist), mille mõjul tõuseb vitellogeniini tase isaskalades, positiivse kontrolli katse aromataasi pärssiva kemikaaliga (nt fadrosool või prokloraas kontsentratsioonis 300  $\mu$ g/l), mille toimel väheneb vitellogeniinisaldus emaskalades, ning positiivse kontrolli katse androgeense toimega kemikaaliga (nt 17 $\beta$ -trenboloon kontsentratsioonis 5  $\mu$ g/l), mis põhjustab emastel tüsedatel tõmpninadel ja jaapani riisikaladel isaskalade teiseste sootunnuste ilmumist. Labori pädevuses veendumiseks võib kõiki neid andmeid võrrelda valideerimisuuringute (1–3) kättesaadavate andmetega.
56. Üldiselt tuleks vitellogeniini määramise tulemused lugeda positiivseks, kui vähemalt suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil tuvastatakse kontrollrühmaga võrreldes vitellogeniinitaseme statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) tõus isaskalades või statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) langus emaskalades, kui samas

▼ M7

ei ilmne üldise mürgisuse nähte. Positiivset tulemust toetab täiendavalt kontsentratsiooni ja toime vahelise bioloogiliselt usutava sõltuvuse tuvastamine. Nagu eespool märgitud, ei pruugi vitellogeniinisalduse vähenemine olla tingitud üksnes endokriinsest toimest, kuid positiivset tulemust tuleks üldjuhul tõlgendada tõendina endokriinse toime kohta *in vivo* ja sellist toimet tuleks selguse saamiseks tavaliselt täiendavalt uurida.

57. Reguleerivad asutused võivad nõuda sugunäärmete histopatoloogilist hindamist, mis võimaldab teha kindlaks katseloomade paljunemisevõime ja hinnata katsetulemuste kaalukust. Sugunäärmete histopatoloogiline analüüs ei pruugi olla vajalik juhul, kui vitellogeniini või teiseste sootunnuste määramise tulemused on positiivsed (st täheldatakse vitellogeniinisalduse suurenemist või vähenemist või vastassoo teiseste sootunnuste ilmumist).

## KIRJANDUS

- (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). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 60. Pariis.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1B). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 61. Pariis.
- (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. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 78. Pariis.
- (4) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. Endokriinset toimet käsitlev CEFIC LRI projekt. <http://www.cefic-iri.org/index.php?page=projects> (vaadatud 18.9.2008).
- (5) USA Keskkonnakaitseamet (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15. detsember 2007. USA Keskkonnakaitseamet, Washington, D. C. 104 lk.
- (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. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 94. Pariis.
- (7) Sumpter, J. P., ja Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.* 103, Suppl. 7: 173–178 (ülevaateartikkel).
- (8) Pawlowski, S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.* 68 (3): 277–291.
- (9) Andersen, L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 76 (3–4): 343–352.
- (10) Ankley, G. T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67 (1): 121–130.



▼ M7

- (11) Panter, G. H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquat. Toxicol.* 70 (1): 11–21.
- (12) Parks, L. G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Phys. C* 123 (2): 113–125.
- (13) Panter, G. H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG uuringuaruanne AQ001. CEFIC, Brüssel, Belgia.
- (14) Fenske, M., *et al.* (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., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Phys. C* 130: 119–131.
- (16) Rose, J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.* C 131: 531–539.
- (17) Brion, F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1699–1708.
- (18) Yokota, H., *et al.* (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., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *J. Health Sci.* 50: 301–308.
- (20) Ankley, G. T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 $\beta$ -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (6): 1350–1360.
- (21) Seki, M., *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (3): 774–781.
- (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 123. Paris.
- (23) 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.
- (24) Hutchinson, T. H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76: 69–92.
- (25) Hutchinson, T. H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish – biomarkers as „signposts,“ not „traffic lights,“ in risk assessment. *Environ. Health Persp.* 114, Suppl. 1: 106–114.

**▼ M7**

- (26) Miles-Richardson, S. R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 $\beta$ -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47: 129–145.
- (27) Martinovic, D., *et al.* (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.
- (28) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- (29) USA Keskkonnakaitseamet (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay. 30. jaanuar 2008. USA Keskkonnakaitseamet, Washington, D. C. 110 lk.
- (30) OECD (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150. OECD, Paris.

▼ **M7**

*1. liide*

LÜHENDID JA MÕISTED

**Kemikaal** – aine või segu.

**ELISA** – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

**Biomassisisaldus** – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

**Maksimaalne talutav kontsentratsioon** – kontsentratsioon, mis on ligikaudu 10 % LC<sub>50</sub> väärtusest.

**Asustustihedus** – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Vitellogeniin** – fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

▼M7

## 2. liide

## KALADE ENDOKRIINSÜSTEEMI MÕJUTAVATE KEMIKAALIDE SÕELUURINGU TINGIMUSED

1. Soovitav liik	Tüse tõmpnina ( <i>Pimephales promelas</i> )	Jaapani riisikala ( <i>Oryzias latipes</i> )	Vöödiline daanio ( <i>Danio rerio</i> )
2. Katse tüüp	Läbivoolukatse	Läbivoolukatse	Läbivoolukatse
3. Vee temperatuur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)	Luminofoorlambid (laia spektriga)
5. Valgustihedus	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1 000 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)
6. Valgustusperiood (koidu/hämariku üleminekuid võib korraldada, kuid neid ei peeta vajalikuks)	16 tundi valgust, 8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust	12–16 tundi valgust, 12–8 tundi pimedust
7. Biomassisisaldus	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Katsekambri suurus	10 l (miinimum)	2 l (miinimum)	5 l (miinimum)
9. Katselahuse ruumala	8 l (miinimum)	1,5 l (miinimum)	4 l (miinimum)
10. Katselahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses	Vähemalt 6 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas	Vähemalt 5 korda päevas
11. Katseloomade vanus	Vt punkt 21	Vt punkt 21	Vt punkt 21
12. Täiskasvanud kala ligikaudne märgmass (g)	Emased: 1,5 ± 20 % Isased: 2,5 ± 20 %	Emased: 0,35 ± 20 % Isased: 0,35 ± 20 %	Emased: 0,65 ± 20 % Isased: 0,4 ± 20 %
13. Kalade arv katsenõu kohta	6 (2 isaskala ja 4 emaskala)	6 (3 isaskala ja 3 emaskala)	10 (5 isaskala ja 5 emaskala)
14. Kontsentratsioonipunktide arv	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)	= 3 (pluss vajalikud kontrollid)
15. Nõude arv kontsentratsioonipunkti kohta	Vähemalt 4	Vähemalt 4	Vähemalt 2
16. Kalade arv katsekonsentratsiooni kohta	16 täiskasvanud emast ja 8 isast (4 emast ja 2 isast igas paralleelnõus)	12 täiskasvanud emast ja 12 isast (3 emast ja 3 isast igas paralleelnõus)	10 täiskasvanud emast ja 10 isast (5 emast ja 5 isast igas paralleelnõus)
17. Söötmissrežiim	Elus või külmutatud soolase vee krevettide täiskasvanud või noorjärgus isendid 2–3 korda päevas ( <i>ad libitum</i> ), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas ( <i>ad libitum</i> ), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon	Soolase vee krevettide noorjärgus isendid 2–3 korda päevas ( <i>ad libitum</i> ), müügilolev kalasööt või nende kombinatsioon

## ▼M7

18. Aereerimine	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist	Üksnes siis, kui lahustunud hapnikku on alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
19. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi
20. Kokkupuute-eelne periood	Soovitavalt 7–14 päeva	Soovitavalt 7–14 päeva	Soovitavalt 7–14 päeva
21. Kemikaaliga kokkupuute kestus	21 päeva	21 päeva	21 päeva
22. Bioloogilised lõppnäitajad	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Elulemus</li> <li>— Käitumine</li> <li>— Sigivus</li> <li>— Teisesed sootunnused</li> <li>— Vitellogeniin</li> <li>— Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Elulemus</li> <li>— Käitumine</li> <li>— Sigivus</li> <li>— Teisesed sootunnused</li> <li>— Vitellogeniin</li> <li>— Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Elulemus</li> <li>— Käitumine</li> <li>— Sigivus</li> <li>— Vitellogeniin</li> <li>— Vajaduse korral sugunäärmete histopatoloogiline hinnang</li> </ul>
23. Katse nõuetekohasus	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $25 \pm 2$ °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekonsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõtmistulemuste keskväärtest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $25 \pm 2$ °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekonsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõtmistulemuste keskväärtest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapniku sisaldus > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur $26 \pm 2$ °C; kalade elulemus kontrollrühma(de)s vähemalt 90 %; mõõdetud katsekonsentratsioonid vahemikus $\pm 20$ % mõõtmistulemuste keskväärtest igal kontsentratsioonil

▼ M7

## 3. liide

**MÕNED LAHJENDUSVEE NÕUTAVAD KEEMILISED OMADUSED**

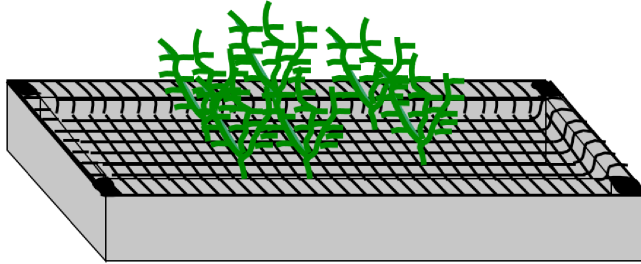
KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOON
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Kloorijäägid	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

▼ M7

## 4A liide

## VÕÖDILISE DAANIO KUDEMISUBSTRAAT

**Kudemisalus:** üleni klaasist instrumendinõu, näiteks mõõtmetega  $22 \times 15 \times 5,5$  cm (pikkus  $\times$  laius  $\times$  sügavus), mis on kaetud eemaldatava roostevabast terastraadist võrega (võresilma suurus 2 mm). Võre peaks katma instrumendinõu valendiku allpool nõu äärt.



Võre peale tuleks kinnitada kudemissubstraat. Selle struktuur peaks olema selline, et kalad saavad substraati siseneda. Sobivad näiteks rohelisest plastmaterjalist kunstlikud akvaariumitaimed (NB: tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali võimalikku adsorbeerumist plastmaterjalile). Plastmaterjali tuleb leostada piisava koguse sooja veega piisavalt kaua, et hoida ära kemikaalide leostumine vette katse ajal. Klaasmaterjali kasutamisel tuleks tagada, et kalad ei saaks vigastusi ega peaks oma aktiivse tegevuse käigus taluma ruumikitsikust.

Vahemaa aluse ja kambri klaasseinte vahel peaks olema vähemalt 3 cm, et kudemist ei toimuks väljaspool alust. Alusele koetud marjaterad langevad läbi võre ja need võib koguda 45–60 minutit pärast valgustuse sisselülitamist. Läbipaistvad marjaterad ei ole kleepuvad ja on külvalguses kergesti loendatavad. Kui ühe nõu kohta kasutatakse viit emaskala, võib marjaterade arvu kuni 20 ühe päeva kohta pidada väikeseks, kuni 100 – keskmiseks ja üle 100 – rikkalikuks saagiseks. Kudemisalus tuleks eemaldada, marjaterad kokku koguda ja kudemisalus uuesti katsenõusse tagasi panna kas võimalikult hilja õhtul või väga vara hommikul. Aeg kudemisaluse tagasipanekuni ei tohiks olla pikem kui üks tund, sest vastasel juhul võib kudemissubstraadi ilmumine mõjutada kalu ebatavalisel ajal individuaalselt paarituma ja kudema. Kui olukord tingib kudemisaluse hilisema tagasipaneku, tuleks seda teha vähemalt 9 tundi pärast valgustuse sisselülitamist. Sellisel hilisel kellaajal kudemist enam ei toimu.

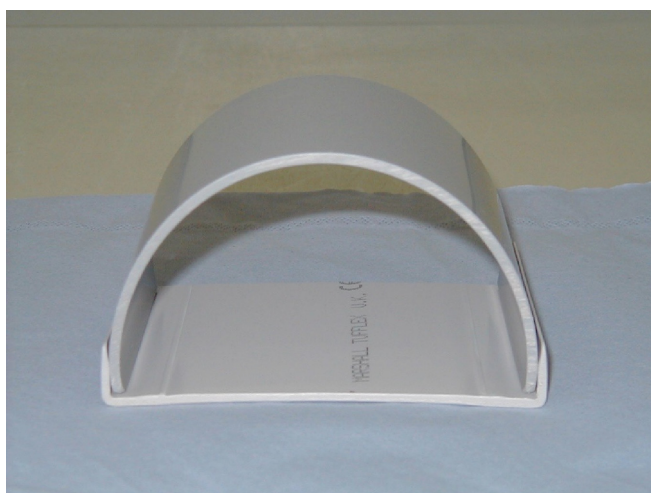
▼ M7

4B liide

**TÜSEDA TÖMPNINA KUDEMISSUBSTRAAT**

Igasse katsekambrisse pannakse kaks või kolm plastist, klaasist, roostevabast terasest või keraamilist kudemisvõlvi ja alust (nt 80 mm pikkune hall poolkäärkujulise ristlõikega vihmaveerenni jupp, mis asub 130 mm pikkusel servadega alusel) (vt joonis). Korralikult vanandatud polüvinüülkloriidist või keraamilised võlvid on tõendatult sobiv kudemissubstraat (Thorpe *et al.*, 2007).

Võlvid on soovitatav nakkuvuse parandamiseks karestada. Alus tuleks ühtlasi varustada kaitsevõrega, et takistada kalade juurdepääsu koetud marjale, välja arvatud juhul, kui marjaterade tõhus nakkuvus kasutatava kudemissubstraadiga on tõendatud.



Aluse ülesanne on pidada kinni kõik marjaterad, mis ei naku kudemisvõlvi pinnaga ja kukuksid aluse puudumisel kambri põhja, samuti marjaterad, mis on koetud otse lamedale plastalusele. Kõiki kudemissubstraate tuleks enne kasutamist vähemalt 12 tundi lahjendusveega leostada.

Thorpe, K. L., Benstead, R., Hutchinson, T. H., ja Tyler, C. R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquat. Toxicol.* 81: 90–98.



▼ M7

## 5A liide

**TÜSEDA TÖMPNINA TEISESTE SOOTUNNUSTE HINDAMINE  
ENDOKRIINSE TOIMEGA KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS****Ülevaade**

Täiskasvanud tüseada tõmpnina välistunnused, mis võivad olla endokriinse toimega kemikaalide tuvastamiseks olulised, hõlmavad järgmist: värvus (st hele/tume), värvimuster (st vertikaalsete vöötide olemasolu või puudumine), kehakuju (st pea ja rinnaosa kuju, kõhu laienemine) ja spetsiifilised teisesed sootunnused (st pulmarüü kõbrukeste arv ja suurus, turjapadjandi ja muneti suurus).

Pulmarüü kõbrukesed asuvad tüseada tõmpnina suguliselt aktiivse isaskala pea peal (turjapadjandil) ja paiknevad tavaliselt bilateraalsümmeetriliselt (Jensen *et al.*, 2001). Kontrollrühma emaskaladel ning noortel isas- ja emaskaladel kõbruke ei ole (Jensen *et al.*, 2001). Isaskala silmade ümber ja sõõrmete vahel võib olla kuni kaheksa eraldi kõbrukest. Suurim arv kõbrukesti ja suurimad kõbrukesed asuvad kahel paralleelsel joonel vahetult sõõrmete all ja suu kohal. Paljudel kaladel esinevad kõbrukeste rühmad alalõua all; suule kõige lähemaid kõbrukesti on tavaliselt üks paar, kõhupoolsemas rühmas võib neid aga olla kuni neli. Kõbrukeste tegelik arv on harva suurem kui 30 (vahemik 18–28; Jensen *et al.*, 2001). Suurem osa kõbrukesti kujutab endast võrdlemisi ümmargust eraldi moodustist, mille kõrgus on ligikaudu võrdne selle raadiusega. Enamikul suguliselt aktiivsetel isaskaladel on vähemalt mõned kõbrukesed sedavõrd suurenenud ja silmapaistvad, et neid ei ole võimalik eraldiseisvana eristada.

Endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide hulgas võivad teatavat liiki kemikaalid põhjustada teatavate vastassoo teiseste sootunnuste ebanormaalse ilmumise. Näiteks võivad sellised androgeenireseptori agonistid nagu 17 $\alpha$ -metüültestosteron ja 17 $\beta$ -trenboloon põhjustada emasel tüsedal tõmpninal pulmarüü kõbrukeste ilmumise (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), samal ajal kui östrogeenireseptori agonistid võivad vähendada isaskaladel pulmarüü kõbrukeste arvu või suurust (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

Allpool on esitatud tüseada tõmpnina pulmarüü kõbrukeste kirjeldamise meetod, mida kasutatakse Minnesota osariigis Duluthis asuvas USA Keskkonnakaitseametis laboris. Konkreetsete tooted ja/või seadmed võib asendada võrreldavate kättesaadavate materjalidega.

Kõbrukesti on kõige parem vaadelda valgustusega suurendusklaasi või valgustusega (3X) anatoomilise mikroskoobiga. Kala vaadeldakse selja poolt ja esitsast (peaga vaatleja poole).

— Kala pannakse väikesele Petri tassile (läbimõõduga nt 100 mm) esitsastiga vaatleja poole ja kõhuga allapoole. Suurendusklaasi või objektiivivi fookus seatakse nii, et oleks võimalik vaadelda kõbrukesti. Kala pööratakse ettevaatlikult ja aeglaselt küljelt küljele, et tuvastada kõbrukeste piirkonnad. Kõbrukesed loendatakse ja neid hinnatakse.

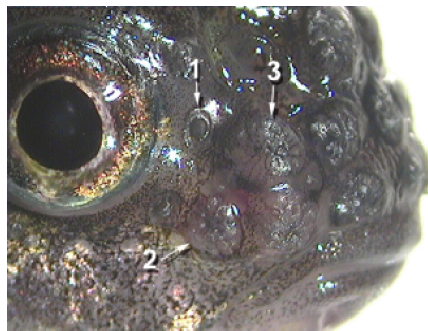
— Vaatlust korratakse pea kõhupoolel; selleks pannakse kala Petri tassil selili esitsastiga vaatleja poole.

— Iga kala vaatlus tuleks viia lõpule kahe minutiga.

▼ **M7****Köbrukeste arv ja hindamine**

Täiskasvanud tüseda tõmpnina köbrukeste olemasolu ja suuruse hindamiseks on määratletud kuus konkreetset piirkonda. Olemasolevate köbrukeste asukohta ja arvu kaardistamiseks on välja töötatud vorm (vt käesoleva liite lõpus). Registreeritakse iga kala köbrukeste arv ja hinnatakse kvantitatiivselt nende suurust järgmiselt: 0 – puudub, 1 – olemas, 2 – suurenenud ja 3 – silmapaistev (joonis 1).

0 punkti – köbruke puudub. 1 punkt – köbruke on olemas ja sellel on üks kõrgeim tipp, mille kõrgus on ligikaudu võrdne köbrukeste raadiusega. 2 punkti – suurenenud köbruke, mille kude meenutab kujult täрни ja millel on tavaliselt lai alus keskelt algavate radiaalsete vagudega. Köbrukeste tipp on sageli ebakorrapärase, kuid võib vahel olla veidi ümardunud. 3 punkti – silmapaistev köbruke, tavaliselt üsna suur ja ümmargune, ebaselgema struktuuriga. Sellised köbrukesed on mõnikord kokku kasvanud ja moodustavad üht massi, mis paikneb ühel või mitmel köbrukeste alal (allpool kirjeldatud piirkonnad B, C ja D). Värvus ja muster on sarnased 2 punktile vastava köbrukeste omaga, kuid on mõnikord raskesti eristatavad. Selle hindamissüsteemi kasutamise korral on normaalsel kontrollrühma isasel, kelle köbrukeste arv on 18–20, köbrukeste punktide üldsumma tavaliselt < 50 (Jensen *et al.*, 2001).

**Joonis 1**

Tegelik köbrukeste arv võib mõnel kalal olla suurem, kui on vormil asjaomases hindamiskiirkonnas lahtreid. Sellisel juhul võib täiendada hindeid märkida lahtri sisse või lahtrist paremale või vasakule. Vormi täitmisel ei pea seega järgima sümmeetriat. Selliste köbrukeste kaardistamiseks, mis paiknevad piki suu horisontaaltasapinda vertikaalselt paaris või ühendatuna, võib kummagi köbrukeste hinde märkida samasse lahtrisse.

**Kaardistamispiirkonnad**

A – silmade ümber paiknevad köbrukesed. Kaardistatakse selja poolt kõhu poole piki silma eesmist äärt. Tavaliselt on kontrollrühma isaskaladel neid mitu, kontrollrühma emaskaladel need puuduvad; androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel esinevad need üldjuhul paaris (üks kummagi silma juures) või ka üksikult.

B-sõõrmete (haistmiselundi avade) vahel paiknevad köbrukesed. Kontrollrühma isaskaladel esinevad need tavaliselt paaris ja on rohkem välja arenenud (2 – suurenenud või 3 – silmapaistvad). Kontrollrühma emaskaladel need puuduvad; androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel võib neid esineda ja need võivad olla teataval määral arenenud.

C – sõõrmetest vahetult eespool suuga paralleelselt paiknevad köbrukesed. Kontrollrühma suguküpsel isaskaladel on need tavaliselt suurenenud või silmapaistvad. Vähem arenenud isaskaladel ja androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel on need olemas või suurenenud.

▼ **M7**

D – kõbrukesed, mis paiknevad paralleelselt piki suujoont. Kontrollrühma isaskaladel hinnatakse need üldjuhul väljaarenekuks. Kontrollrühma emaskaladel need puuduvad, kuid androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel on need olemas.

E – alalõual suu kõrval paiknevad kõbrukesed, tavaliselt väikesed ja paarikaupa. Kontrollrühma isaskaladel ning kemikaaliga kokku puutunud isaskaladel ja emaskaladel võivad need olla mitmesugused.

F – kõbrukesed, mis paiknevad piirkonnast E kõhu pool. Tavaliselt väikesed ja paaris. Need on olemas kontrollrühma isaskaladel ja androgeense kemikaaliga kokku puutunud emaskaladel.

## VIITED

- (1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1276–1290.
- (2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C., ja Gray, E. L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 $\beta$ -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1350–1360.
- (3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., ja Tyler, C. R. (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, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., ja Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 128: 127–141.
- (5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., ja Ankley, G. T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J. Fish Biol.* 59: 515–523.
- (6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., ja Giesy, J. P. (1999). Effects of waterborne exposure to 17 $\beta$ -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47: 129–145.
- (7) Smith, R. J. F. (1974). Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.* 52: 1031–1038.

## Kõbrukeste hindamise vorm

Identimistunnus \_\_\_\_\_

Kuupäev \_\_\_\_\_

Üldsumma \_\_\_\_\_

## Numbriline hinnang

1 – olemas

2 – suurenenud

3 – silmapaistev

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1		
	F	X1	X1	X1	X1

▼ M7

## 5B liide

**JAAPANI RIISIKALA TEISESTE SOOTUNNUSTE HINDAMINE  
ENDOKRIINSE TOIMEGA KEMIKAALIDE TUVASTAMISEKS**

Allpool on kirjeldatud papillaarjätmete (<sup>1</sup>) mõõtmist; nimetatud jätked on jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) teisesed sootunnused.

- 1) Pärast maksa väljalõikamist (6. liide) pannakse rümp (pea ülespoole, saba allapoole) koonilisse katseklaasi, mis sisaldab umbes 10 ml neutraalset puhverdatud 10 % formaliinilahust. Kui sugunäärmed fikseeritakse muu lahusega kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus, tehakse pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga ristilõige läbi rümba; seejuures jälgitakse, et suguava ja sugunäärmed ise ei saaks vigastada (joonis 3). Kala keha peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks fikseerimislahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, nagu on kirjeldatud eespool.
- 2) Pärast seda, kui kala keha on pandud neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse, võetakse pärakuuime eesosast pintsettidega kinni ja tõmmatakse seda umbes 30 sekundit, et pärakuuime lahti hoida. Pärakuuimest kinnivõtmisel võetakse pintsettide vahele mõned uimekiired uime eesosas ja jälgitakse, et papillaarjätked ei saaks kriimustada.
- 3) Pärast seda, kui pärakuuime on umbes 30 sekundit lahti hoitud, säilitatakse kala keha kuni papillaarjätmete mõõtmiseni neutraalses puhverdatud 10 % formaliinilahuses toatemperatuuril (jätkeid tuleks mõõta pärast vähemalt 24 tunni pikkust fikseerimist).

## Mõõtmine

- 1) Pärast kala keha fikseerimist neutraalses puhverdatud 10 % formaliinilahuses vähemalt 24 tundi võetakse kala rümp koonilisest katseklaasist välja ja pühitakse formaliin filterpaberisse (või paberrätikusse).
- 2) Kala asetatakse kõhuga ülespoole. Seejärel lõigatakse väikeste lahkamiskäärdega pärakuuim ettevaatlikult ära (parem on lõigata uim ära koos väikese koguse seda toestava koega).
- 3) Äralõigatud pärakuuime eesosast võetakse pintsettidega kinni ja see pannakse alusklaasile, millel on mõni tilk vett. Seejärel kaetakse pärakuuim katteklasisiga. Tuleb olla ettevaatlik, et pintsettidega pärakuuimest kinni võtmisel ei saaks papillaarjätked kriimustada.
- 4) Bioloogilise mikroskoobi (tavaline või invertmikroskoop) ja loenduri abil loendatakse papillaarjätketega kiirelülide arv. Papillaarjätketeks loetakse väikest rühma jätkeid kiirelülil tagumisel serval. Iga uimekiire papillaarjätketega lülide arv kirjutatakse töölehele (nt esimene uimekiir: 0, teine uimekiir: ...).

(<sup>1</sup>) Papillaarjätked esinevad tavaliselt ainult täiskasvanud isaskaladel ja paiknevad pärakuuime tagumisest otsast lugedes teisel kuni seitsmendal või kaheksandal uimekiirel (joonised 1 ja 2). Mõnikord harva esineb selliseid jätkeid siiski ka pärakuuime tagumisest otsast lugedes esimesel uimekiirel. Käesolev standardne töökord hõlmab jätmete mõõtmist ka esimesel uimekiirel (käesoleva töökorra puhul saadakse uimekiire järjekorranumber pärakuuime tagumisest otsast loendades).

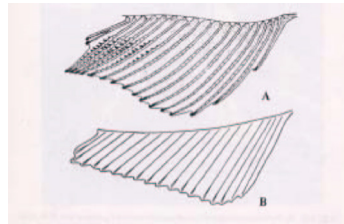
▼ **M7**

10, kolmas uimekiir: 12 jne) ning nende arvude summa iga kala kohta sisetatakse Exceli tabelisse. Vajaduse korral tehakse pärakuuimest pilt ja loendatakse papillaarjätketega kiirelülide arv fotolt.

- 5) Pärast mõõtmist pannakse pärakuuim punktis 1 kirjeldatud koonilisse katseklaasi ja hoitakse see alles.

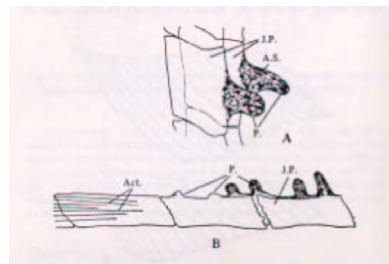
*Joonis 1.*

**Pärakuuime kuju ja suuruse soolised erinevused. A. Isaskala. B. Emaskala. 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., Univ. Tokyo, IV, 2: 209–218.***



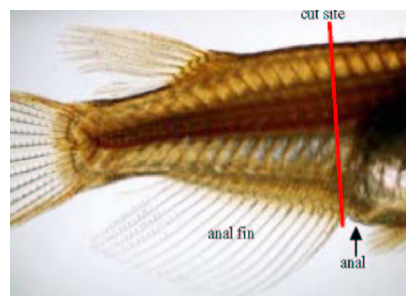
*Joonis 2. A.*

**Jätked pärakuuime kiire lülidel. J. P. (joint plate) – kiirelülili; A. S. (axial space) – telgedevaheline ruum; P. (process) – jätke. B. Uimekiire distaalne ots. Otsas paiknevad aktinotrihhiumid (Act.). 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., Univ. Tokyo, IV, 2: 209–218.***



*Joonis 3.*

**Foto kala kehast, millel on näidatud lõikamiskoht, kui sugunäärmed fikseeritakse muus lahuses kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus. Sellisel juhul lõigatakse keha pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga läbi (punane joon); peapoolne osa pannakse sugunäärmete fikseerimiseks ette nähtud lahusesse ja sabapoolne osa neutraalsesse puhverdatud 10 % formaliinilahusesse.**



▼ **M7**

## 6. liide

**SOOVITATAV PROOVIVÕTMISE KORD VITELLOGENIINI MÄÄRAMISE PUHUL**

Tuleks olla hoolikas, et hoida ära isas- ja emaskalade vitellogeniiniproovide ristsaastumist.

**Meetod 1A: tüseda tõmpnina vere võtmine sabaveenist/-arterist**

Pärast tuimastamist lõigatakse sabavars skalpelliteraga osaliselt läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Kui veri on kogutud, eraldatakse kiiresti plasma tsentrifuugimisega 3 minuti jooksul 15 000 g juures (või selle asemel 10 minuti jooksul 15 000 g ja 4 °C juures). Soovi korral võib määrata pärast tsentrifuugimist hematokriti. Plasmaosa eemaldatakse seejärel hematokriti määramiseks ette nähtud mikrokapillaartorust ja säilitatakse tsentrifuugitopsis 0,13 ühiku aprotiniini (proteaasiinhibiitor) juuresolekul – 80 °C juures, kuni on võimalik määrata vitellogeniini. Olenevalt tüseda tõmpnina suurusest (see sõltub soost), on ühelt kalalt kogutava plasma maht tavaliselt vahemikus 5–60 mikrolitrit (Jensen *et al.*, 2001).

**Meetod 1B: tüseda tõmpnina vere võtmine südamest**

Teise võimalusena võib vere koguda südamepunktsiooniga; selleks kasutatakse hepariniseeritud süstalt (1 000 ühikut hepariini ml kohta). Veri viiakse jääl hoitavaesse Eppendorfi katsutisse ja seejärel tsentrifuugitakse (5 minutit 7 000 g juures toatemperatuuril). Plasma kantakse üle puhastesse Eppendorfi katsutisesse (alikoovotidena, kui plasma maht seda võimaldab) ja külmutatakse viivitamata – 80 °C juures, kus seda säilitatakse kuni analüüsimiseni (Panter *et al.*, 1998).

**Meetod 2A: jaapani riisikala maksa väljalõikamine**

*Katses kasutatavate kalade eemaldamine katsekambrist*

- 1) Katses kasutatavad kalad tuleks katsekambrist eemaldada väikese kahvaga. Tuleb olla hoolikas, et mitte pillata kalu teise katsekambrisse.
- 2) Üldjuhul tuleks katses kasutatavad kalad eemaldada järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahustiga kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll. Peale selle tuleks ühest katsekambrist eemaldada kõigepealt kõik isaskalad ja seejärel allesjäänud emaskalad.
- 3) Iga kala sugu tehakse kindlaks väliste teiseste sootunnuste (nt pärakuuime kuju) järgi.
- 4) Uuritavad kalad paigutatakse transpordimahutisse ja viiakse maksa väljalõikamiseks töölauale. Kontrollitakse katsekambri ja transpordimahuti märgistuse õigsust ning veendutakse, et katsekambrist võetud kalade arv ja katsekambrisse jäänud kalade arv vastavad eeldustele.
- 5) Kui kalade sugu ei ole võimalik tuvastada välise vaatlusega, eemaldatakse katsekambrist kõik kalad. Sellisel juhul tuleks nende sugu määrata sugunäarmete või teiseste sootunnuste vaatlemisega stereomikroskoobi abil.

*Maksa väljalõikamine*

- 1) Kala viiakse väikese kahvaga transpordimahutist üle tuimastilahusesse.

**▼ M7**

- 2) Pärast tuimastamist tõstetakse kala tavaliste pintsettidega filterpaberile (või paberrätikule). Kala haaratakse pintsettidega pea külgedelt, et saba ära ei murduks.
- 3) Vesi pühitakse kala pealt filterpaberisse (või paberrätikusse).
- 4) Kala asetatakse kõhuga ülespoole. Seejärel tehakse lahkamiskääridega kõhupoolse kaelaosa ja kõhu keskosa vahele väike ristilõige.
- 5) Lahkamiskäärid viiakse väikesesse sisselõikesse ja kõht lõigatakse piki keskjoont lahti lõpusekattest saba pool asuvast punktist kuni päraku peapoolse servani. Tuleb jälgida, et kääre ei viidaks liiga sügavale ning maks ja suguäärmed ei saaks vigi.
- 6) Järgmised toimingud tehakse stereomikroskoobi all.
- 7) Kala asetatakse paberrätikule (või klaasist Petri tassile või alusklaasile) kõhuga ülespoole.
- 8) Kõhuõõne seinad venitatakse täppispintsettidega laiali ja siseelundid tõmmatakse välja. Vajaduse korral võib siseelundite väljatõmbamiseks eemaldada kõhuõõne ühe seina.
- 9) Teise paari täppispintsettide abil tuuakse esile maksa ja sapipõie ühenduskoht. Haaratakse kinni sapijuhast ja lõigatakse sapipõis ära. Tuleb olla ettevaatlik, et sapipõis ei läheks katki.
- 10) Haaratakse kinni söögitorust ja lõigatakse seedekulgla samal viisil maksast lahti. Tuleb jälgida, et seedekulgla sisu ei voolaks välja. Seedekulgla saba-poolne osa lõigatakse päraku küljest lahti ja seedekulgla eemaldatakse kõhuõõnest.
- 11) Kärbitakse maksaga külgnevat rasvkude ja muid kudesid. Tuleb olla ettevaatlik, et maks ei saaks kriimustada.
- 12) Täppispintsettidega haaratakse kinni maksa väratipiirkonnast ja maks eemaldatakse kõhuõõnest.
- 13) Maks asetatakse alusklaasile. Vajaduse korral eemaldatakse täppispintsettidega maksa pinnalt kogu rasv ja muu kude (nt kõhukelme).
- 14) Maks kaalutakse elektroonilise analüütilise kaaluga; taarana kasutatakse 1,5 ml mikrokatsutit. Maksa mass märgitakse töölehele (täpsusega 0,1 mg). Kontrollitakse mikrokatsuti etiketil oleva identifitseerimisnumbriga õigsust.
- 15) Maksa sisaldav mikrokatsuti suletakse korgiga. Mikrokatsuti paigutatakse jahutavasse (või jääl olevasse) hoidjasse.
- 16) Pärast ühe maksa väljalõikamist puhastatakse lahkamisriistad või asendatakse need puhastega.

▼ **M7**

- 17) Eespool kirjeldatud viisil eemaldatakse maks kõikidelt transpordimahutis olevatelt kaladelt.
- 18) Pärast seda, kui maks on kõikidelt transpordimahutis olnud kaladelt (st kõigilt katsekambris olnud isas- ja emaskaladelt) eemaldatud, pannakse kõik maksaproovid katsutihoidjasse, mis on varustatud identimisandmetega etiketiga, ja säilitatakse seda sügavkülmikus. Kui maksa hakatakse eeltöötlemata varsti pärast väljalõikamist, viiakse proovid jahutavas (või jääl olevas) katsutihoidjas järgmisele töölauale.

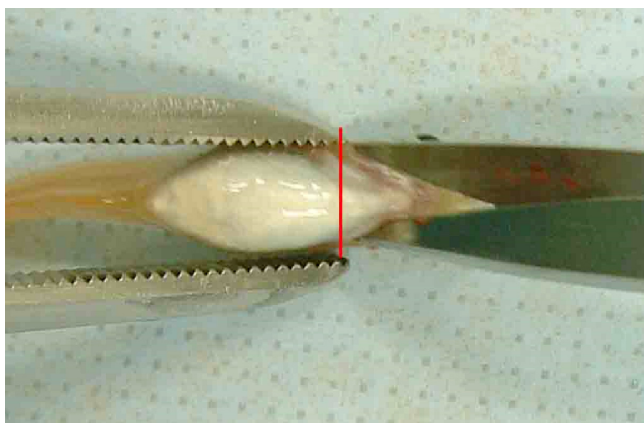
Pärast kalalt maksa väljalõikamist on rümp valmis sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks ja teiseste sootunnuste mõõtmiseks.

*Proov*

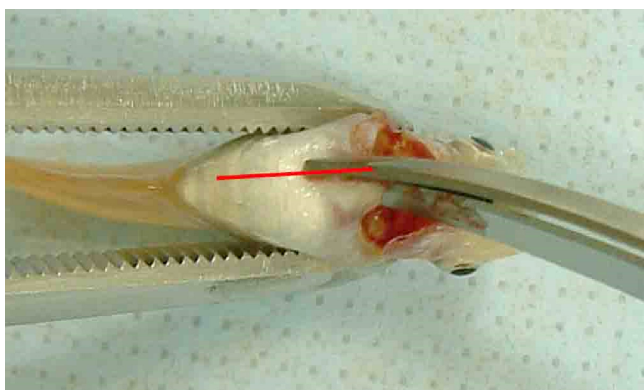
Kui maksaproove ei hakata eeltöötlemata vahetult pärast väljalõikamist, säilitatakse neid temperatuuril  $\leq -70$  °C.

*Joonis 1*

**Lõige kääridega tehakse vahetult rinnauimedest eespool.**

*Joonis 2*

**Kõht lõigatakse kääridega keskjooant mööda lahti punktini, mis asub umbes 2 mm pärakest pealt pool.**





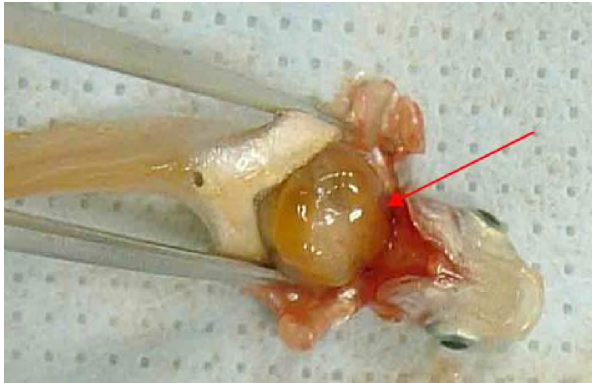
▼ M7

*Joonis 3*

**Kõhuõõne seinad tõmmatakse pintsettidega laiali, et paljastada maks ja muud siseelundid.**

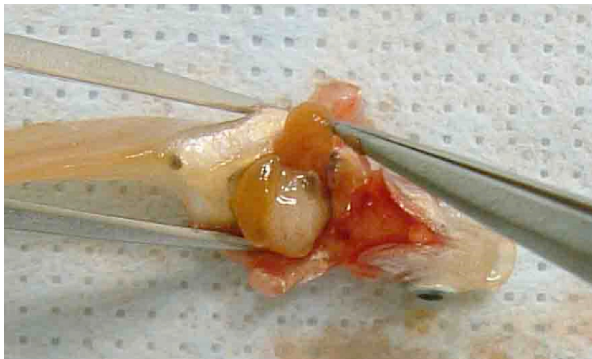
(Teise võimalusena võib kõhuõõne seinad küljele lahti tõmmatult kinnitada nõeltega.)

Nool näitab maksa.



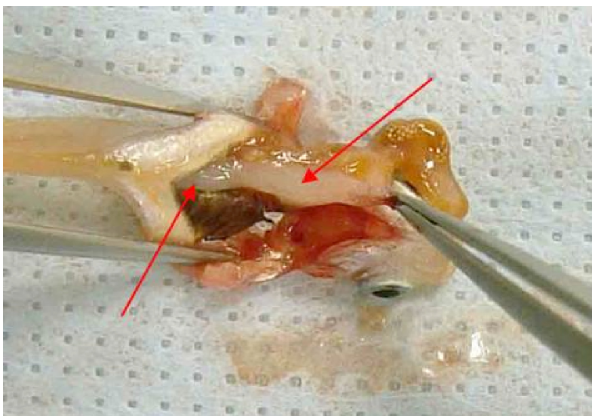
*Joonis 4*

**Maks eraldatakse pintsettide abil ümbritsevatest kudedest ja lõigatakse välja.**



*Joonis 5*

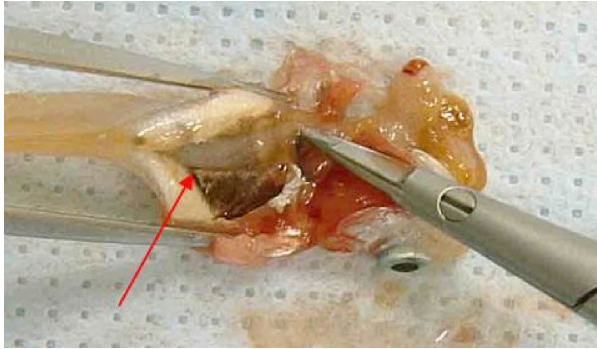
**Sooled tõmmatakse pintsettidega ettevaatlikult eemale.**



▼ M7

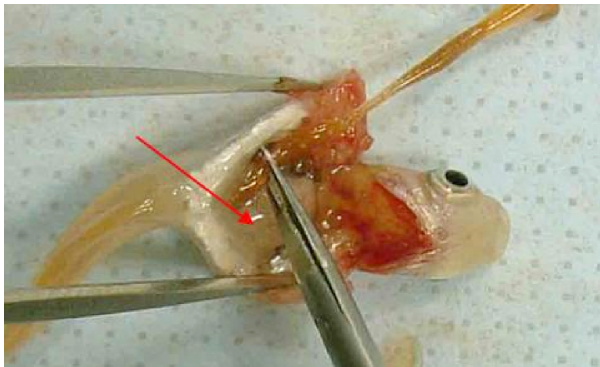
*Joonis 6*

**Soolestiku kumbki ots ja soolekinnistid lõigatakse kääridega lahti.**



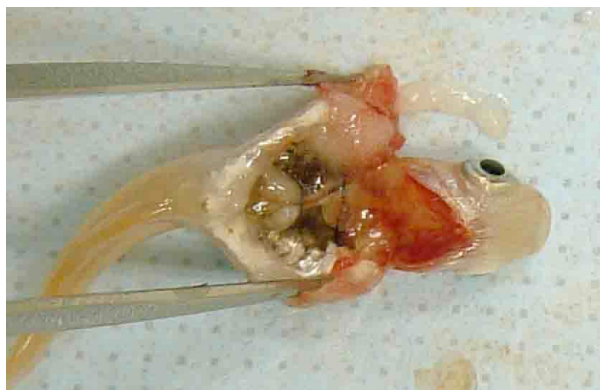
*Joonis 7 (emaskala)*

**Emaskala puhul toimitakse samal viisil.**



*Joonis 8*

**Lõpule viidud lahkamine.**



▼ **M7****Meetod 2B: jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) maksa eeltöötlemine vitellogeniini määramiseks**

ELISA komplekti kuuluv pudel homogeniseerimispuhvriga jahutatakse purustatud jää abil maha (lahuse temperatuurini  $\leq 4$  °C). Kui kasutatakse EnBio ELISA süsteemi homogeniseerimispuhvrit, sulatatakse lahus toatemperatuuril ja jahutatakse seejärel purustatud jääga maha.

Maksa massi põhjal arvutatakse vajalik homogeniseerimispuhvri kogus (maksa mg kohta võetakse 50 µl homogeniseerimispuhvrit). Kui maksa mass on näiteks 4,5 mg, on vaja 225 µl homogeniseerimispuhvrit. Koostatakse homogeniseerimispuhvri koguste loetelu kõikide maksade jaoks.

*Maksa ettevalmistamine eeltöötlemiseks*

- 1) Maksa sisaldav 1,5 ml mikrokatsuti võetakse sügavkülmikust välja vahetult enne eeltöötlemist.
- 2) Isaskalade maksa eeltöötlus peaks toimuma enne emaskalade maksa eeltöötlust, et hoida ära vitellogeniiniga saastumist. Peale selle peaks katses kasutatavate rühmade maksade eeltöötlemine toimuma järgmises järjekorras: kontrollrühm, lahustiga kontrollrühm (vajaduse korral), madalaima kontsentratsiooniga rühm, keskmise kontsentratsiooniga rühm, kõrgeima kontsentratsiooniga rühm ja positiivne kontroll.
- 3) Sügavkülmikust ei tohiks korraga välja võtta rohkem maksaprooviga 1,5 ml mikrokatsuteid, kui on võimalik üheaegselt tsentrifuugida.
- 4) Maksaprooviga 1,5 ml mikrokatsutid asetatakse jääl olevasse hoidjasse proovi numbril põhinevas järjekorras (maksa ei ole vaja üles sulatada).

*Eeltöötluste tegemine*

- 1) Homogeniseerimispuhvri lisamine

Homogeniseerimispuhvri koguste loetelust vaadatakse, milline kogus puhvrit tuleb konkreetsele maksaproovile lisada, ning mikropipett (mahuvahemikuga 100–1 000 µl) seatakse vajalikule mahule. Mikropipeti otsa kinnitatakse puhas otsik.

Reaktiivipudelist võetakse vajalik kogus homogeniseerimispuhvrit ja lisatakse maksa sisaldavasse 1,5 ml mikrokatsutisse.

Homogeniseerimispuhver lisatakse samal viisil kõikidesse maksa sisaldavatesse 1,5 ml mikrokatsutitesse. Mikropipeti otsikut ei ole seejuures vaja vahetada. Kui otsik saastub või tekib saastumise kahtlus, tuleks otsik siiski välja vahetada.

- 2) Maksa homogeniseerimine

— Mikrokatsutis homogeniseerimise seadmele pannakse uus nui.

— Nui viiakse 1,5 ml mikrokatsutisse. Mikrokatsutis homogeniseerimise seadet hoitakse nii, et maks oleks pressitud nui ja 1,5 ml mikrokatsuti seina vahele.

— Homogenisaatoril lastakse töötada 10–20 sekundit. Homogeniseerimise ajal jahutatakse 1,5 ml mikrokatsutit purustatud jääga.

**▼M7**

- Nui tõstetakse 1,5 ml mikrokatsutist välja ja segul lastakse umbes 10 sekundit seista. Seejärel vaadeldakse suspensiooni.
- Kui suspensioonis on näha maksatükikesi, korratakse kolmandat ja neljandat toimingut, et saada rahuldav maksahomogenaat.
- Maksasuspensiooni hoitakse jahutatult jääl olevas katsutihoidjas kuni tsentrifuugimiseni.
- Enne iga homogeniseerimist vahetatakse homogenisaatori nui uue vastu.
- Kõik maksad homogeniseeritakse homogeniseerimispuhvriga vastavalt eespool kirjeldatud korrale.

**3) Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugimine**

- Kontrollitakse, et jahutatud tsentrifuugikambri temperatuur on  $\leq 5$  °C.
- Homogeniseeritud maksasuspensiooniga 1,5 ml mikrokatsutid pannakse jahutatud tsentrifuugi (vajaduse korral tsentrifuug tasakaalustatakse).
- Homogeniseeritud maksasuspensiooni tsentrifuugitakse 13 000 g juures 10 minutit temperatuuril  $\leq 5$  °C. Kui supernatant eraldub korralikult, võib tsentrifugaaljõudu ja kestust vastavalt vajadusele muuta.
- Pärast tsentrifuugimist kontrollitakse, et supernatant on piisaval määral eraldunud (pinnal – lipiidid, keskel – supernatant, põhjakihis – maksakude). Kui eraldumine ei ole piisav, tsentrifuugitakse suspensiooni samades tingimustes uuesti.
- Kõik proovid võetakse jahutatud tsentrifuugist välja ja pannakse proovi numbril põhinevas järjekorras jääl olevasse katsutihoidjasse. Tuleb olla ettevaatlik, et tsentrifuugimisel eraldunud kihte mitte uuesti suspendeerida.

**4) Supernatandi kogumine**

- Katsutihoidjasse pannakse neli supernatandi säilitamiseks ette nähtud 0,5 ml mikrokatsutit.
- Mikropipetiga võetakse 30 µl supernatanti (keskmine kiht) ja viiakse see ühte 0,5 ml mikrokatsutisse. Tuleb jälgida, et ei võetaks pinnakihist lipiide ega põhjakihist maksakude.
- Eespool kirjeldatud viisil võetakse veel supernatanti ja viiakse see kahte teise 0,5 ml mikrokatsutisse.
- Mikropipetiga kogutakse ka ülejäänud supernatant (võimaluse korral  $\geq 100$  µl), mis pannakse viimasesse 0,5 ml mikrokatsutisse. Tuleb jälgida, et ei võetaks pinnakihist lipiide ega põhjakihist maksakude.
- 0,5 ml mikrokatsuti suletakse korgiga ja supernatandi maht märgitakse etiketile. Seejärel jahutatakse mikrokatsutid jääl olevas katsutihoidjas viivitamata maha.
- Iga kord enne uue supernatandi võtmist vahetatakse mikropipeti otsik uue vastu. Kui otsiku külge kleepub suur kogus lipiide, vahetatakse see kohe uue vastu, et hoida ära maksakstrakti saastumist rasvaga.

**▼ M7**

- Kõikide tsentrifuugitud proovide supernatant viiakse eespool kirjeldatud korra kohaselt nelja 0,5 ml mikrokatsutisse.
- Pärast supernatandi viimist 0,5 ml mikrokatsutitesse pannakse kõik katsutid identimisetiketiga katsutihoidjasse ja külmutatakse seejärel viivitamata sügavkülmutikus. Kui vitellogeniini kontsentratsiooni mõõdetakse kohe pärast eeltöötlemist, hoitakse ühte 30 µl supernatanti sisaldavat 0,5 ml mikrokatsutit jahutatult katsutihoidjas ja viiakse see töölauale, kus tehakse ELISA. Sellisel juhul pannakse ülejäänud mikrokatsutid katsutihoidjatesse ja külmutatakse need sügavkülmutikus.
- Pärast supernatandi kogumist kõrvaldatakse ülejäänud materjal nõuetekohaselt.

*Proovide säilitamine*

Maksahomogenaadi supernatandiga 0,5 ml mikrokatsuteid säilitatakse temperatuuril  $\leq -70$  °C kuni ELISA tegemiseni.

**Meetod 3A: vöödilise daanio vere võtmine sabaveenist/-arterist**

Kohe pärast tuimastamist lõigatakse sabavars risti läbi ja veri kogutakse sabaveenist/-arterist hematokriti määramiseks ette nähtud hepariniseeritud mikrokapillaartorusse. Võetava vere kogus on kala suurusest sõltuvalt 5–15 µl. Mikrokapillaartorusse lisatakse võrdne kogus aprotiniiniga puhvrit (6 µg/ml fosfaadiga puhverdatud soolalahuses (PBS)) ja plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (5 minutit 600 g juures). Plasma kogutakse katsutitesse ja säilitatakse temperatuuril  $-20$  °C kuni vitellogeniini või muude huvipakkuvate valkude määramiseni.

**Meetod 3B: vöödilise daanio vere võtmine südamepunktsiooniga**

Vere hüübimise ja valkude lagunemise takistamiseks võetakse proovid PBSi, mis sisaldab hepariini (1 000 ühikut/ml) ja proteaasiinhibiitorit aprotiniini (2 trüpsüüsiinhibiitori ühikut (TIU) / ml). Puhvri koostisainetena soovatakse kasutada hepariini ammooniumisoola ja lüofiliseeritud aprotiniini. Vereproovi võtmiseks soovatakse kasutada fikseeritud peene nõelaga 1 ml süstalt (nt Braun Omnikan-F). Süstlasse tuleks eelnevalt võtta puhverlahust (ligikaudu 100 µl), et iga kala väike verekogus süstlast täielikult kätte saada. Vereproovid võetakse südamepunktsiooniga. Kõigepealt tuleks kala tuimastada MS-222-ga (100 mg/l). Nõuetekohane tuimastus võimaldab proovivõtjal eristada vöödilise daanio südameelõõke. Südame punkteerimisel hoitakse süstla kolbi nõrga tõmbe all. Kogutava vere maht on vahemikus 20–40 mikrolitrit. Pärast südamepunktsiooni tuleks vere ja puhvri segu viia katsutisse. Plasma eraldatakse verest tsentrifuugimise teel (20 minutit 5 000 g juures) ja seda tuleks säilitada  $-80$  °C juures kuni analüüsi tegemiseni.

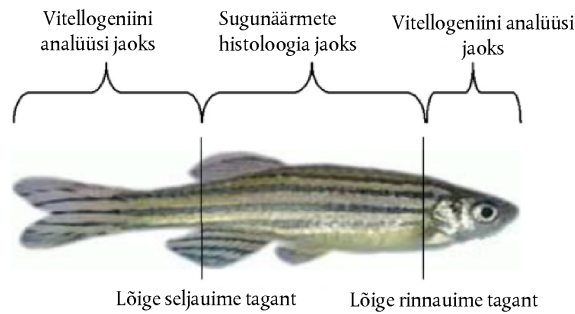
**Meetod 3C: standardne töökord vöödilise daanio pea ja saba homogeniseerimiseks**

1. Kalad tuimastatakse ja surmatakse humaansel viisil vastavalt katsemeetodi kirjeldusele.
2. Kala pea ja saba lõigatakse ära nii, nagu on näidatud joonisel 1.

*Oluline märkus: kõik lõikeriistad ja lõikelaud tuleks enne iga kala lõikamist loputada ja korralikult puhastada (näiteks 96 % etanooliga), et hoida ära kemikaaliga mitte kokku puutunud isaskalade saastumist emaskalade ja kemikaaliga kokku puutunud isaskalade vitellogeniiniga.*

▼ M7

Joonis 1



3. Iga kala pea ja saba kaalutakse koos ja nende summaarne mass määratakse milligrammi täpsusega.
4. Pärast kaalumist pannakse need kehaosad sobivasse katsutisse (nt 1,5 ml Eppendorfi katsuti) ja säilitatakse külmutatult – 80 °C juures kuni homogeniseerimiseni või homogeniseeritakse kohe jää peal kahe plastvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeniseerimine toimub jää peal ja saadakse homogeenne mass.) Oluline märkus: *katsutid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on seostatavad kala sugunäärmete histoloogiliseks uurimiseks kasutatava kehatükiga.*
5. Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koe massi neljakordselt ületav kogus jääkülma **homogeniseerimispuhvrit** <sup>(1)</sup>. Jätkatakse varrastega töötlemist, kuni segu on homogeenne. Oluline märkus: *iga kala puhul kasutatakse uusi vardaid.*
6. Proovid pannakse jääle kuni tsentrifuugimiseni (30 minutit 4 °C ja 50 000 g juures).
7. Pipetiga pannakse vähemalt kahte katsutisse 20 µl supernatanti; pipeti ots viiakse allapoole pindmist rasvakihti ja supernatant eemaldatakse nii, et rasva- ja sademefraktsioon kaasa ei tuleks.
8. Katsuteid säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni proovide kasutamiseni.

<sup>(1)</sup> Homogeniseerimispuhver:

— 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 % proteaasiinhibiitorite segu (Sigma): 12 ml Tris-HCl, pH 7,4 + 120 µl proteaasiinhibiitorite segu;

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), näiteks Taani firmalt Bie & Berntsen;

— proteaasiinhibiitorite segu: Sigma, tootenumber P8340 (imetajate kudede jaoks).

**MÄRKUS:** homogeniseerimispuhver peaks olema valmistatud proovide töötlemise päeval. Puhvrit hoitakse kasutamise ajal jää peal.

**▼M7**

## 7. liide

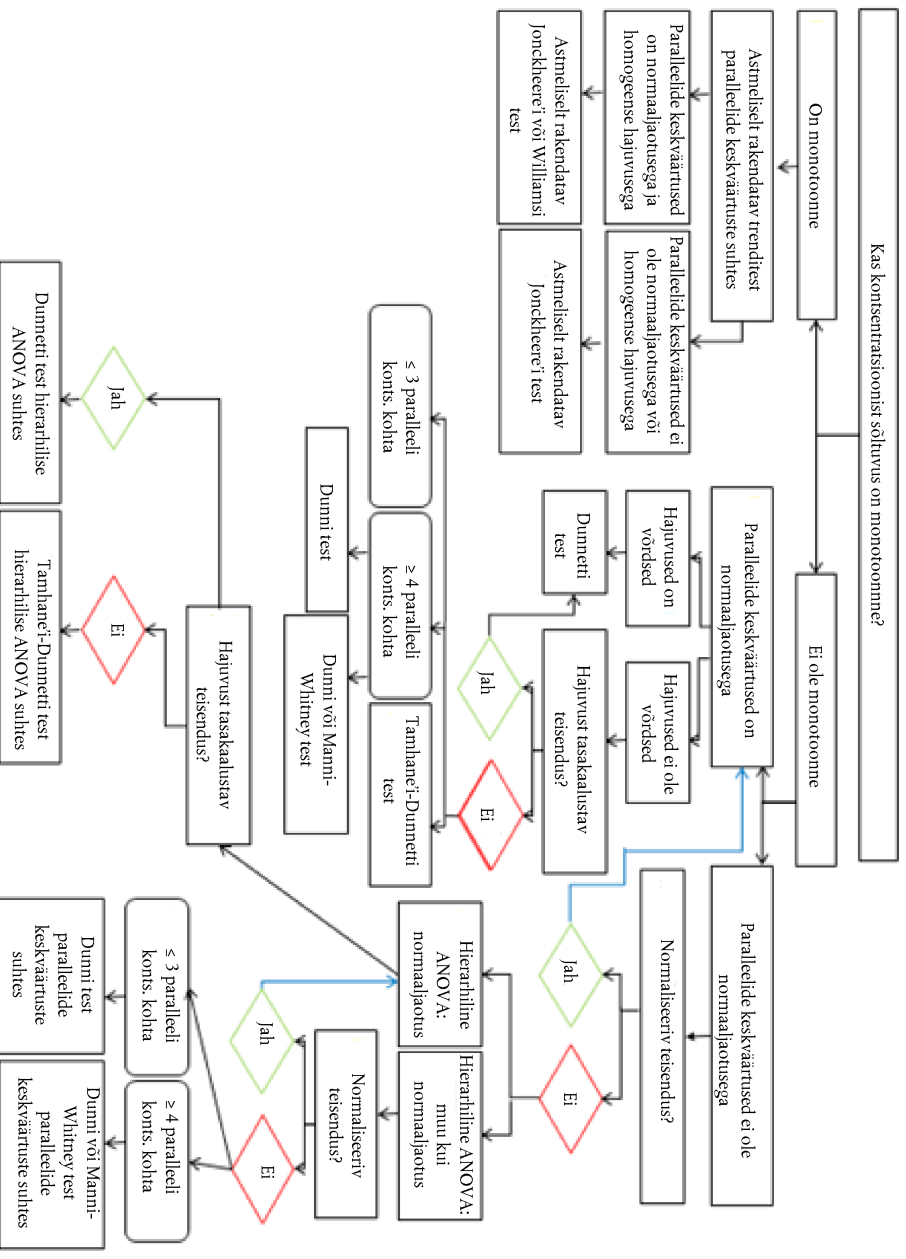
**VITELLOGENIINIGA RIKASTATUD PROOVID JA ERI KATSETES  
KASUTATAV VÕRDLUSSTANDARD**

Igal vitellogeniinianalüüsi tegemise päeval mõõdetakse ka rikastatud proovi, mis on valmistatud eri katsetes kasutatava võrdlusstandardiga. Vitellogeniin, millest valmistatakse eri katsetes kasutatav võrdlusstandard, peab olema muust partiist kui see, mida kasutatakse asjaomase katse kaliibrimisstandardite tegemiseks.

Rikastud proovi valmistamiseks lisatakse teadaolev kogus võrdlusstandardit kontrollrühma isaskalade plasmaproovile. Proovi rikastatakse nii, et saavutatav vitellogeniini kontsentratsioon on 10–100 korda suurem kui kontrollrühma isaskalade plasma eeldatav vitellogeniinisisaldus. Rikastatav kontrollrühma isaskalade plasma võib pärineda kas ühelt või mitmelt kalalt.

Kontrollrühma isaskalade rikastamata plasma osaproovi analüüsitakse vähemalt kahes paralleelkannus. Rikastatud plasmat analüüsitakse samuti vähemalt kahes paralleelkannus. Eeldatava kontsentratsiooni arvutamiseks liidetakse plasma rikastamiseks lisatud arvutuslikule vitellogeniinikogusele kontrollrühma isaskalade kahes rikastamata proovis mõõdetud vitellogeniinikoguste keskväärus. Saadud eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos iga samal päeval tehtud katse tulemustega.

STATISTILISE ANALÜÜSI VALIMISE VООSKЕМ





▼ M7

## C.49. Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 236 (2013). Selles kirjeldatakse vöödilise daanio (*Danio rerio*) embrüotele avalduva ägeda mürgisuse katset. Käesolev meetod on ette nähtud kemikaalide ägeda mürgisuse määramiseks embrüonaalses arengujärgus kaladel. See põhineb vöödilise daanioga tehtud uuringutel ja valideerimistel (1–14). Käesolevat katsemeetodit on edukalt kasutatud paljude eri kemikaalide puhul, millel on erinev toimemehhanism, lahustuvus, lenduvus ja hüdrofoobsus (vastav ülevaade on esitatud viidetes 15 ja 16).
2. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## KATSE PÕHIMÕTE

3. Vöödilise daanio äsja viljastatud marjaterad viiakse 96 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Iga 24 tunni järel registreeritakse letaalsuse näitajatenähtena kuni nelja järgmise lõppnäitaja vaatluse tulemused (6): i) viljastatud marjaterade koaguleerumine, ii) somiitide moodustumata jäämine, iii) sabaalgme rebukotist eraldumata jäämine ja iv) südamelöökide puudumine. Kokkupuuteperioodi lõpus määratakse äge mürgisus positiivsete tulemuste alusel, mis saadakse ükskõik millises nimetatud neljast lõppnäitaja vaatlusest, ning arvutatakse LC<sub>50</sub>.

## LÄHTEKAALUTLUSED

4. Iga aine kohta on muu hulgas kasulik teada selle struktuurivalemit, molekulmassi, puhtust, püsivust vees ja valguse käes, pK<sub>s</sub>-d, K<sub>ow</sub>-d, lahustuvust vees ja aururõhku, samuti kiire biolagundatavuse katse tulemusi (katsemeetod C.4 (17) või C.29 (18)). Lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas katse ajal võib esineda uuritava kemikaali kadu aurustumise tõttu. Aine kvantifitseerimiseks katselahuses peaks olema olemas olema usaldusväärne teadaoleva dokumenteeritud täpsuse ja avastamispiiriga analüüsimeetod.
5. Kui käesolevat katsemeetodit kasutatakse segu analüüsimiseks, peaks selline segu olema võimalikult hästi iseloomustatud, näiteks selle koostisainete keemilise määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja iga koostisaine omaduste kaudu (vt punkt 4). Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks kohustuslikus korras tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava regulatiivse eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused.
6. Ainete puhul, mis võidakse aktiveerida metabolismi teel, on leitud tõendeid selle kohta, et vöödilise daanio embrüod on võimelised neid biomuundama (19–22). Metabolism kalaembrüos ei ole siiski alati sarnane noorjärgus või täiskasvanud kalade metabolismiga. Näiteks ei ole kalaembrüotega tehtud ägeda mürgisuse katsetes suudetud tuvastada mürkaine lähteaine allüülalkoholi (9) mürgisust. Seepärast soovitatakse juhul, kui on alust arvata, et kemikaali metaboliidid või muud asjakohased muundamissaadused võivad olla lähteühendist mürgisemad, vaadelda katsetes ka selliseid metaboliite/muundamissaadusi ja võtta saadud tulemusi uuritava kemikaali mürgisuse üle otsustamisel arvesse või teha teise võimalusena eraldi katse metabolismi täiendavaks arvessevõtmiseks.
7. Ainete puhul, mille molekulmass on  $\geq 3$  kDa, millel on väga ulatuslik molekulaarstruktuur või mis põhjustavad koorumise hilinemist, nii et koorumisjärgne kokkupuude ainega võib puududa või toimuda väiksemal määral, ei eeldata embrüote tundlikkust neile, kuna sellise aine biosaadavus on piiratud; sel juhul võib olla sobivam kasutada mõnda muud mürgisuse hindamise meetodit.

▼ **M7****KATSE NÕUETEKOHASUS**

8. Katsetulemused on nõuetekohased, kui on täidetud järgmised kriteeriumid:
- a) viljastamise üldmäär kõikide kogutud marjaterade seas peaks katsealuses partiis olema  $\geq 70$  %;
  - b) veetemperatuur katsekambrites peaks katse mis tahes hetkel olema  $26 \pm 1$  °C;
  - c) embrüote üldine elulemus peaks negatiivse (lahjendusveega) kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli puhul olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks  $\geq 90$  %;
  - d) kokkupuutel positiivse kontrolliga (nt võõdilise daanio puhul 3,4-dikloroaniliin kontsentratsioonis 4,0 mg/l) peaks suremus olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks vähemalt 30 %;
  - e) koorumise määr negatiivse kontrolli (ja vajaduse korral lahustiga kontrolli) puhul peaks olema 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks  $\geq 80$  %;
  - f) lahustunud hapniku sisaldus negatiivse kontrolli ja suurima katses kasutatud kontsentratsiooni puhul peaks 96 tunni pikkuse kokkupuute lõpuks olema  $\geq 80$  % küllastuskontsentratsioonist.

**MEETODI KIRJELDUS**

9. Soovitavate pidamis- ja katsetingimuste ülevaade on esitatud 2. liites.

**Seadmed**

10. On vaja järgmisi seadmeid:
- a) soovitatava biomassisalduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist (nt klaasist) akvaariumid (vt punkt 14 „Sugukalade pidamine“);
  - b) invertmikroskoop ja/või binokulaarmikroskoop suurendusvõimega vähemalt 80 korda. Kui vaatluste registreerimise ruumis ei ole võimalik saavutada temperatuuri  $26 \pm 1$  °C, on vaja kasutada reguleeritava temperatuuriga liigutatavat preparaadihoidjat või mõnda muud temperatuuri hoidmiseks sobivat meetodit;
  - c) katsekambriid, nt standardsed 24 kannuga plaadid sügavusega umbes 20 mm (vt punkt 11 „Katsekambriid“);
  - d) materjal 24-kannulise plaadi katmiseks, nt isekleepuv foolium;
  - e) reguleeritava temperatuuriga inkubaator või kliimaseadmega ruum, mis võimaldab hoida plaadi kannudes (või katsekambrites) temperatuuri  $26 \pm 1$  °C;
  - f) pH-meeter;
  - g) hapnikumõõtur;
  - h) seadmed vee kareduse ja juhtivuse määramiseks;
  - i) kudemisalus: klaasist, roostevabast terasest või muust inertsest materjalist instrumendinõu; roostevabast terasest või muust inertsest materjalist traatvõrk (silma suurus  $2 \pm 0,5$  mm) koetud marjaterade kaitseks; kudemis-substraat (nt inertsest materjalist kunsttaimed) (katsemeetodi C.48 4A liide (23));
  - j) laia otsaga pipetid marjaterade kogumiseks;

▼ **M7**

- k) klaasnõud eri kontsentratsiooniga katselahuste ja lahjendusvee valmistamiseks (keeduklaasid, mõõtekolvid, -silindrid ja -pipetid) ja vöödilise daanio marjaterade kogumiseks (nt keeduklaasid, kristalliseerimisnõud);
- l) kui katse läbiviimiseks kasutatakse teistsugust kokkupuutesüsteemi, näiteks läbivoolusüsteemi (24) või passiivset doseerimissüsteemi (25), on vaja selleks sobivaid ruume ja seadmeid.

**Katsekambrid**

11. Tuleks kasutada klaasist või polüstüreenist katsekambreid (nt 24-kannulised plaadid kannu mahutavusega 2,5–5 ml). Kui kahtlustatakse adsorbeerumist polüstüreenile (nt mittepolaarsete, tasapinnalise struktuuri ja suure  $K_{OW}$ -ga ainete puhul), tuleks adsorbeerumisest tingitud kao vähendamiseks kasutada inertset materjali (klaas) (26). Katsekambrite paigutus inkubaatoris peaks olema juhuslik.

**Vesi ja katsetingimused**

12. Kalade pidamise vett soovitatakse lahjendada, et saavutada pinnavee paljude eri tüüpide puhul tavapärase karedus. Lahjendusvesi tuleks valmistada taastatud veest (27). Lõppkaredus peaks vastama  $\text{CaCO}_3$  sisaldusele 100–300 mg/l, et ei toimuks kaltsiumkarbonaadi ulatuslikku väljasadenemist. Võib kasutada ka põhjalikult iseloomustatud pinna- või kaevuvett. Taastatud vett võib kalade pidamise vee väikese kareduse arvessevõtmiseks lahjendada deioniseeritud veega suhtes kuni 1:5, nii et saavutatav karedus vastaks  $\text{CaCO}_3$  sisaldusele vähemalt 30–35 mg/l. Enne uuritava kemikaali lisamist aereeritakse vett hapnikuga küllastumiseni. Kannudes tuleks kogu katse vältel hoida temperatuuri  $26 \pm 1$  °C. Lahuse pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5 ning ei tohiks katse kestel varieeruda selles vahemikus rohkem kui 1,5 ühikut. Kui pH ei püsi eeldatavalt selles vahemikus, tuleks enne katse algust pH-d reguleerida. Seda tuleks teha nii, et põhilahuse kontsentratsioon sellest märkimisväärselt ei muutuks ning uuritav kemikaal ei sadeneks ega osaleks üheski keemilises reaktsioonis. Uuritavat kemikaali sisaldava lahuse pH reguleerimiseks soovitatakse kasutada vesinikloriidi (HCl) või naatriumhüdrosiidi (NaOH).

**Katselahused**

13. Valitud kontsentratsiooniga katselahused võib valmistada näiteks põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaanilisel teel (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Kui uuritav kemikaal on vees raskesti lahustuv, tuleks järgida raskesti uuritavaid aineid ja segusid käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 23 kirjeldatud korda (28). Lahusti kasutamisest tuleks hoiduda, kuid mõnel juhul võib see olla sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks vajalik. Kui põhilahuse valmistamise hõlbustamiseks kasutatakse lahustit, ei tohiks selle lõppsisaldus olla suurem kui 100 µl/l ja peaks kõikides katsenõudes olema sama. Lahusti kasutamise korral on vaja kasutada täiendavat lahustiga kontrolli.

**Sugukalade pidamine**

14. Marja saamiseks kasutatakse kemikaaliga mitte kokku puutunud looduslikku vöödilise daanio sugukarja, kus marjaterade viljastamise määr on korralikult dokumenteeritud. Kaladel ei tohiks ilmned a mingeid makroskoopiliselt tuvastatavaid nakatumis- ega haigusnähte ning neile ei tohiks kudemisele eelneva 2 kuu jooksul olla antud aktiiv- või profülaktilise ravi eesmärgil mingeid ravimeid. Sugukarja kalu peetakse akvaariumis soovitatavalt tihedusel üks kala liitri vee kohta ning valgustusperioodi kindlaksmääratud

▼ **M7**

pikkus on 12–16 tundi (29–33). Filtrimiskiirus peaks olema optimaalne; tuleks hoiduda vee ulatuslikku liikumist põhjustava liiga suure filtrimiskiiruse kasutamisest. Söötistingimusi on kirjeldatud 2. liites. Tuleks jälgida, et sööta ei jääks üle, ning kontrollida korrapäraselt vee kvaliteeti ja akvaariumi puhtust ning vajaduse korral taastada algseisund.

**Pädevuse tõendamise katsed**

15. Kasutatava kalaliini tundlikkuse kontrollimiseks tuleks soovitatavalt kaks korda aastas teha kogu kontsentratsioonist sõltuvuse vahemikku hõlmav katse võrdluskemikaali 3,4-dikloroaniliiniga, mida kasutati valideerimiskatsetes (1, 2). Nimetatud võrdluskemikaali tuleks kasutada igas laboris, kus käesolev katsemeetod esmakordselt kasutusele võetakse. Seda kemikaali võib laboris kasutada katse tegemiseks vajaliku tehnilise pädevuse tõendamiseks enne regulatiivsel eesmärgil andmete esitamist.

**Marja saamine**

16. Võõdilise daanio marjaterad võib saada kudemisrühmadest (eraldi kudemisnõudes) või masskudemise teel (kalade pidamise nõudes). Kudemisrühmade puhul viiakse sugukarja isas- ja emaskalad (nt suhtes 2:1) katsele eelneval päeval mõni tund enne pimeduse saabumist kudemisnõudesse. Kuna võõdilise daanio puhul võib kudemine mõnes kudemisrühmas ebaõnnestuda, soovitatakse kasutada paralleelselt vähemalt kolme kudemisnõu. Geneetilise representatiivsuse tagamiseks kogutakse marjaterad vähemalt kolmest kudemisrühmast, segatakse omavahel ja tehakse juhuslik valik.
17. Kudemisalus pannakse marjaterade kogumiseks kudemisnõusse või kalade pidamise nõusse katsele eelneval päeval enne pimeduse saabumist või katse alguspäeval enne valguse saabumist. Kudemisalus kaetakse inertse traatvõrguga, millel on sobiv silma suurus (umbes  $2 \pm 0,5$  mm), et võõdilise daanio täiskasvanud isendid marjateri ära ei sööks. Vajaduse korral võib kudemise soodustamiseks kinnitada võrgu külge inertsest materjalist (nt plastist või klaasist) kunsttaimi (3–5, 23, 35). Tuleks kasutada kulunud plastmaterjali, mille puhul ei toimu (nt ftalaatide) leostumist. Paaritumine, kudemine ja viljastamine leiavad aset 30 minuti jooksul pärast valguse saabumist ja seejärel võib kudemisalused koos marjateradega ettevaatlikult eemaldada. Kudemisaluselt kogutud marjateri soovitatakse loputada taastatud veega.

**Marjaterade eristamine**

18. Temperatuuril 26 °C toimub umbes 15 minuti pärast viljastatud marjaterade esimene lõigustumine ning järgnevate sünkroonsete lõigustumiste tulemusena tekib 4, 8, 16 ja 32 blastomeeri (vt 3. liide) (35). Selles etapis on viljastatud marjaterad blastula väljakujunemise järgi selgelt eristatavad.

**KATSE KÄIK****Kokkupuutetingimused**

19. Uuritava kemikaaliga viiakse kokkupuutesse 20 embrüot ühe kontsentratsioonipunkti kohta (üks embrüo kannu kohta). Kokkupuutekontsentratsioon ei tohi kogu katse vältel erineda kemikaali nominaalsest kontsentratsioonist rohkem kui  $\pm 20$  %. Kui see ei ole staatilises süsteemis võimalik, tuleks lahust poolstaatilise režiimi kohaselt sobiva sagedusega uuendada (nt iga 24 tunni järel). Sel juhul tuleb kokkupuutekontsentratsioone kontrollida iga sellise kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus vähemalt suurimal ja väikseimal katsekontsentratsioonil (vt punkt 36). Kui kokkupuutekontsentratsiooni ei suudeta hoida vahemikus  $\pm 20$  % nominaalsest kontsentratsioonist, tuleb iga kokkupuuteperioodi alguses ja lõpus mõõta kõik kontsentratsioonid (vt punkt 36). Lahuse uuendamise ajal tuleks jälgida, et embrüod oleksid kaetud väikese koguse vana katselahusega ega jääks kuivale. Katseplani võib

▼ **M7**

kohandada vastavalt konkreetse ainega seotud katsenõuetele (nt läbivoolu-süsteemi (24) või passiivse doseerimissüsteemi (25) kasutamine hõlpsalt lagundatava või väga adsorbeeruva aine jaoks (29) või mõne muu süsteemi kasutamine lenduva aine jaoks (36, 37)). Igal juhul tuleks hoolitseda selle eest, et embrüotele põhjustataks võimalikult vähe stressi. Katselahust tuleks enne katse alustamist vähemalt 24 tundi katsekambris hoida. Katsetingimuste ülevaade on esitatud 2. liites.

**Katsekonsentratsioonid**

20. Tavaliselt piisab statistikanõuete täitmiseks viiest uuritava kemikaali konsentratsioonist, mille jada konstantne tegur ei ole suurem kui 2,2. Kui kasutatakse vähem kui viit konsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Katses kasutataval suurimal konsentratsioonil peaks suremus olema soovitatavalt 100 % ning väikseimal katses kasutataval konsentratsioonil peaks punktis 28 kirjeldatud täheldatav mõju soovitatavalt puuduma. Konsentratsioonivahemiku leidmise katse läbiviimine enne lõplikku katset võimaldab valida sobiva konsentratsioonivahemiku. See viiakse tavaliselt läbi kümne embrüoga konsentratsioonipunkti kohta. Allpool esitatud juhiste puhul on eeldatud, et katse tehakse 24-kannuliste plaatidega. Teistsuguste katsekambrite (nt väikeste Petri tasside) või suurema arvu konsentratsioonide kasutamise korral tuleb neid juhiseid vastavalt kohandada.
21. Üksikasjalik teave ja visuaalsed juhised konsentratsioonipunktide jaotamise kohta 24-kannulistel plaatidel on esitatud punktis 27 ja 4. liites joonisel 1.

**Kontrollid**

22. Lahendusveega kontrolle on vaja kasutada nii negatiivse kontrollina kui ka plaadisese kontrollina. Kui plaadisese kontrolli puhul täheldatakse üle 1 surnud embrüo, jäetakse asjaomane plaat kõrvale ning seega väheneb LC<sub>50</sub> leidmiseks kasutatavate konsentratsioonide arv. Terve plaadi kõrvalejätmine võib raskendada täheldatud mõju hindamist ja eristamist, eriti juhul, kui kõrvale jäetakse lahustiga kontrollplaat või plaat, kus mõju on avaldunud ka kemikaaliga kokku puutunud embrüotele. Esimesel juhul tuleb katset korrata. Teisel juhul võib terve(te) katserühma(de) kõrvaldamine sisemises kontrollis täheldatud suremuse tõttu piirata mõju hindamise ja LC<sub>50</sub> määramise võimet.
23. Iga katses kasutatava marjaterade partii puhul kasutatakse positiivse kontrollina 3,4-dikloroaniliini kindlaksmääratud konsentratsioonil 4 mg/l.
24. Lahusti kasutamise korral viiakse täiendav 20 embrüost koosnev rühm eraldi 24-kannulisel plaadil kokkupuutesse lahustiga – seda vaadeldakse lahustiga kontrollrühmana. Katse võib lugeda nõuetekohaseks, kui on tõendatud, et lahusti ei mõjuta märkimisväärselt koorumiseni kuluvat ajavahemikku ega elulemust ega avalda embrüotele muud negatiivset mõju (vt punkti 8 alapunkt c).

**Kokkupuute algus ja katse kestus**

25. Katset alustatakse võimalikult kiiresti pärast marjaterade viljastamist ja see lõpetatakse 96 tunni pikkuse kokkupuuteperioodi lõppedes. Embrüod peaksid olema ümbritsetud katselahusest enne blastodiski lõigustumise algust või hiljemalt 16-rakulisse staadiumisse jõudmise ajaks. Kokkupuute alustamiseks võimalikult väikese viivitusega valitakse juhuslikult vähemalt kaks korda suurem arv marjateri, kui on vajalik kõikide katserühmade jaoks, ja viiakse need hiljemalt 90 minutit pärast viljastamist eri konsentratsiooniga lahustesse ja kontroll-lahustesse (nt 100 ml kristalliseerimisnõusse; marjaterad peaksid olema täielikult kaetud).
26. Elujõulised viljastatud marjaterad tuleks eraldada viljastamata marjateradest ja viia 24-kannuliste plaatidele, mida on eelnevalt 24 tundi katsetingimustes hoitud ja mille kannud on 180 minuti jooksul pärast viljastamist uuesti täidetud 2 ml värskest valmistatud katselahusega. Stereomikroskoobi abil (soovitatavalt  $\geq 30$ -kordse suurendusega) valitakse välja lõigustuvad

▼ **M7**

viljastatud marjaterad, millel ei täheldata nähtavaid lõigustumishäireid (nt asümmeetriat, vesiikulite moodustumist) ega koorioni kahjustusi. Marjaterade kogumist ja eraldamist on kirjeldatud 3. liites joonistel 1 ja 3 ning 4. liites joonisel 2.

**Marjaterade jaotamine 24-kannulistele plaatidele**

27. Marjaterad jaotatakse kannudega plaatidele järgmiselt (vt ka 4. liite joonis 1):

- 20 marjatera ühele plaadile iga katsekonsentratsiooni kohta;
- 20 marjatera ühele lahustiga kontrollplaadile (vajaduse korral);
- 20 marjatera ühele positiivse kontrolli plaadile;
- 4 marjatera lahjendusvees plaadisese kontrollina igale eespool nimetatud plaadile;
- 24 marjatera lahjendusvees ühele negatiivse kontrolli plaadile.

**Vaatlused**

28. Iga katses kasutatava embrüo puhul tehtavad lõppnäitajate vaatlused hõlmavad järgmist: embrüo koaguleerumine, somiitide moodustumata jäämine, saba eraldumata jäämine ja südamelöökide puudumine (tabel 1). Nende vaatluste tulemusi kasutatakse letaalsuse kindlakstegemiseks: ükskõik millise kõnealuse vaatluse positiivne tulemus tähendab seda, et asjaomane võõdilise daanio embrüo on surnud. Peale selle registreeritakse katse- ja kontrollrühmades alates esimese 48 tunni möödumisest iga päev koorumise määr. Vaatlustulemused registreeritakse iga 24 tunni järel, kuni katse on lõppenud.

Tabel 1

**Lõppnäitajate vaatlused ägeda mürgisuse hindamiseks võõdilise daanio embrüotel 24–96 tundi pärast viljastamist**

	Kokkupuuteaeg			
	24 tundi	48 tundi	72 tundi	96 tundi
Embrüote koaguleerumine	+	+	+	+
Somiitide moodustumata jäämine	+	+	+	+
Saba eraldumata jäämine	+	+	+	+
Südamelöökide puudumine		+	+	+

29. *Embrüote koaguleerumine:* koaguleerunud embrüod on piimjasvalged ja näevad mikroskoobi all välja tumedad (vt 5. liite joonis 1). Koaguleerunud embrüote arv tehakse kindlaks pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist.
30. *Somiitide moodustumata jäämine:* normaalselt arenevas võõdilise daanio embrüos moodustub esimese 24 tunni jooksul temperatuuril  $26 \pm 1$  °C umbes 20 somiiti (vt 5. liite joonis 2). Normaalselt arenenud embrüo liigutab end spontaanselt (kokkutõmbed küljelt küljele). Spontaansed liigutused annavad tunnistust somiitide moodustumisest. Somiitide puudumine registreeritakse pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist. Somiitide moodustumata jäämine esimese 24 tunni jooksul võib olla tingitud arengu üldisest pidurdumisest. Somiidid peaksid olema tekkinud hiljemalt 48 tunni jooksul. Vastasel juhul loetakse asjaomane embrüo surnuks.
31. *Saba eraldumata jäämine:* normaalselt arenevas võõdilise daanio embrüos täheldatakse saba eraldumist rebukotist (vt 5. liite joonis 3) pärast embrüo

▼ **M7**

keha tagaosa pikenemist. Saba eraldumata jäämine registreeritakse pärast 24, 48, 72 ja 96 tunni möödumist.

32. *Südamelöökide puudumine*: normaalselt arenevas vöödilise daanio embrüos on südamelöögid temperatuuril  $26 \pm 1$  °C vaadeldavad pärast 48 tunni möödumist (vt 5. liite joonis 4). Selle lõppnäitaja registreerimisel tuleb olla eriti hoolikas, kuna ebakorrapäraseid südamelööke ei tohiks registreerida letaalsuse ilminguna. Peale selle ei peeta letaalseks ilminguks nähtavaid südamelööke ilma ringluseta kõhuaordis. Selle lõppnäitaja registreerimiseks tuleks embrüoid, kellel südamelöögid puuduvad, jälgida vähemalt 80-kordsel suurendusel vähemalt ühe minuti vältel. Südamelöökide puudumine registreeritakse pärast 48, 72 ja 96 tunni möödumist.
33. Koorumise määr nii katse- kui ka kontrollrühmades tuleks registreerida alates esimese 48 tunni möödumisest ja esitada see katseprotokollis. Ehkki koorumist ei kasutata lõppnäitajana  $LC_{50}$  arvutamiseks, võib see näitaja aidata andmeid tõlgendada, kuna koorumisega tagatakse embrüo kokkupuude kemikaaliga, ilma et koorioni võimalik kaitsefunktsioon seda takistaks.
34. Vöödilise daanio embrüo normaalset arengut (35) ja ebanormaalse arengu näiteid on üksikasjalikult kirjeldatud ja kujutatud 3. ja 5. liites.

**Analüütilised mõõtmised**

35. Katse alguses ja lõpus mõõdetakse kontrollrühma(de)s ja uuritava kemikaali suurima kontsentratsiooniga rühmas pH, üldkaredus ja juhtivus. Uuendamisel põhinevas poolstaatilisest süsteemis tuleks pH mõõta enne ja pärast vee vahetamist. Lahustunud hapniku sisaldus mõõdetakse katse lõpus negatiivses kontrollis ja suurimal katses kasutatud kontsentratsioonil, mille juures embrüod on elujõulised; nendes rühmades peab see olema vastavuses katse nõuetekohasuse kriteeriumidega (vt punkti 8 alapunkt f). Kui on kahtlus, et temperatuur 24-kannuliste plaatide lõikes kõigub, mõõdetakse temperatuur kolmes juhuslikult valitud nõus. Soovitavalt tuleks temperatuuri katse vältel registreerida pidevalt või vähemalt kord päevas.
36. Staatilises süsteemis tuleks uuritava kemikaali sisaldus mõõta katse alguses ja lõpus vähemalt väikseimal ja suurimal katses kasutataval kontsentratsioonil, kuid soovitatavalt igal katsekontsentratsioonil. Poolstaatilises (uuendamise) katses, kus uuritava kemikaali sisaldus püsib eeldatavalt vahemikus  $\pm 20$  % nominaalväärtusest, soovatakse seda analüüsida vähemalt suurimal ja väikseimal katsekontsentratsioonil pärast värsket lahuse valmistamist ja vahetult enne lahuse uuendamist. Katsete puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt vahemikus  $\pm 20$  % nominaalväärtusest, tuleb seda analüüsida kõikidel katsekontsentratsioonidel pärast värsket lahuse valmistamist ja vahetult enne lahuse uuendamist. Kui lahust ei ole analüüsimiseks piisavalt, võib olla kasu katselahuste ühtekoondamisest või selliste asenduskambrite kasutamisest, mis on samast materjalist kui 24-kannulised plaadid ja millel on sama ruumala ja pindala suhe. On tungivalt soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Kui kontsentratsioonid ei püsi vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, tuleks mõju avaldumise kontsentratsioone väljendada kontsentratsiooni mõõdetud väärtuste geomeetrilise keskmise suhtes; seda on üksikasjalikumalt kirjeldatud OECD juhenddokumendi „Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“ („Raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimine“) (28) 5. peatükis.

**PIIRSISALDUSKATSE**

37. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud korra alusel võib teha piirsalduskatse uuritava kemikaali kontsentratsioonil 100 mg/l või katsekeskkonnas lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb neist on väiksem) ja selle abil tõendada, et kemikaali  $LC_{50}$  on sellest kontsentratsioonist suurem. Piirsalduskatseks tuleks kasutada nii katserühma kui ka positiivse kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli puhul 20 embrüot ning negatiivse kontrolli puhul 24 embrüot. Kui suremuse määr katses kasutatud kontsentratsioonil on vähemalt 10 % suurem kui negatiivse (või lahustiga) kontrolli puhul, tuleks läbi viia täismahus uuring. Mis tahes täheldatud mõju tuleks

▼ **M7**

registreerida. Kui negatiivse (või lahustiga) kontrolli puhul on suurem kui 10 %, loetakse katsetulemused kehtetuks ja katset tuleks korrata.

**ANDMED JA ARUANDLUS****Andmete töötlemine**

38. Käesoleva katsemeetodi puhul käsitletakse iga üksikut kannu statistilises analüüsis sõltumatu paralleelproovina. Selliste embrüote protsentuaalne osakaal, mille puhul vähemalt ühe lõppnäitaja vaatluse tulemus on 48 ja/või 96 tunni möödudes positiivne, kantakse graafikule sõltuvuses katsekontsentratsioonist. Saadud kõvera tõusude,  $LC_{50}$  ja usaldusnivoole 95 % vastavate usalduspiiride arvutamiseks tuleks kasutada sobivaid statistikameetodeid (38) ja tutvuda OECD juhenddokumendiga „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data“ („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks“) (39).

**Katseprotokoll**

39. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

*Uuritav kemikaal:*

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalise-keemilised omadused.

*Katseorganismid:*

- teaduslik nimetus, liin, päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

*Katsetingimused:*

- kasutatud katserežiim (nt uuendamise poolstaatiline režiim);
- valgustusperiood;
- katseplaan (nt katsekambrite arv, kontrollide liigid);
- vee kvaliteedinäitajad kalade pidamisel (nt pH, karedus, temperatuur, juhtivus, lahustunud hapniku sisaldus);
- lahustunud hapniku sisaldus, pH, üldkaredus, temperatuur ja juhtivus katselahustes katse alguses ja 96 tundi hiljem;
- põhilahuste ja katselahuste valmistamise meetod ning lahuse uuendamise sagedus;



▼ M7

- lahusti kasutamise põhjendus ja lahusti valiku põhjendus, kui lahustina ei kasutata vett;
- nominaalsed katsekontsentratsioonid ja kõik katsenõudes oleva uuritava kemikaali sisalduse määramise tulemused; tuleks esitada ka meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja määramispiir;
- tõendid selle kohta, et üldist elulemust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;
- marjaterade viljastamise määr;
- koorumise määr katse- ja kontrollrühmades.

*Tulemused:*

- suurim kontsentratsioon, mille puhul katse vältel ei täheldata suremust;
- väikseim kontsentratsioon, mille puhul suremus katse vältel on 100 %;
- kumulatiivne suremus soovitatavatel vaatlusaegadel iga kontsentratsiooni juures;
- suremuse näitajana LC<sub>50</sub> väärtus 96 tunni (ja soovi korral 48 tunni) möödudes, võimaluse korral koos usalduspiiridega usaldusnivool 95 %;
- kontsentratsiooni ja katse lõpuks täheldatava suremuse vahelise sõltuvuse graafik;
- suremus kontrollrühmades (negatiivne kontroll, plaadisesed kontrollid, positiivne kontroll ja lahusti kasutamisel lahustiga kontroll);
- kõigi nelja lõppnäitaja vaatluse tulemusi kajastavad andmed;
- võimalike morfoloogiliste ja füsioloogiliste kõrvalekallete esinemissagedus ja kirjeldus (näited on esitatud 5. liite joonisel 2);
- katse käigus esinenud vahejuhtumid, mis võisid mõjutada tulemusi;
- andmete statistiline analüüs ja töötlemine (probitanalüüs, logistiline regressiooni mudel ja geomeetriline keskmine seoses LC<sub>50</sub>-ga);
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse (teisendatud) kõvera regressioonisirge tõus ja usalduspiirid.

*Kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja sellekohased selgitused.*

*Tulemuste arutelu ja tõlgendamine.*

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2011). Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157. OECD, Pariis.
- (2) OECD (2012). Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179. OECD, Pariis.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., ja Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish

▼ M7

- LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *ALTEX* 22: 87–102.
- (4) ISO (2007). International Standard. Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E). Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon.
  - (5) Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38–48.
  - (6) Schulte, C., ja Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. *ATLA* 22: 12–19.
  - (7) Bachmann, J. (2002). Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktoritöö. Dresdeni Tehnikaülikool, Saksamaa.
  - (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J., ja Nagel, R. (1995). Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11): 2087–2102.
  - (9) Knöbel, M., Busser, F. J. M., Rico-Rico, A., Kramer, N. I., Hermens, J. L. M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., ja Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46: 9690–9700.
  - (10) Kammann, U., Vobach, M., ja Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Con. Tox.* 51: 97–102.
  - (11) Groth, G., Kronauer, K., ja Freundt, K. J. (1994). Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401–406.
  - (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V., ja Freundt, K. J. (1993). Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *B. Environ. Contam. Tox.* 50: 878–882.
  - (13) Nguyen, L. T., ja Janssen, C. R. (2001). Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566–571.
  - (14) Cheng, S. H., Wai, A. W. K., So, C. H., ja Wu, R. S. S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024–3031.
  - (15) Belanger, S. E., Rawlings, J. M., ja Carr, G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 1768–1783.
  - (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., ja Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Phys. C* 149 (2): 196–209.
  - (17) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.
  - (18) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO<sub>2</sub> suletud nõudes (vabaruumi katse)“.
  - (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., ja Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25–36.

▼ M7

- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., ja Broschard, T. H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133–141.
- (21) Incardona, J. P., Linbo, T. L., ja Scholz, N. L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharm.* 257: 242–249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R. E., Hiraga, T., ja Teraoka, H. (2011). Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharm.* 253: 244–252.
- (23) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“. Vt 4A liide.
- (24) Lammer, E., Kamp, H. G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E. R., Wendlar, K., Zok, S., ja Braunbeck, T. (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. In Vitro* 23: 1436–1442.
- (25) Brown, R. S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I. S., Villerius, L. A., ja Klamer, H. J. C. (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097–4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., ja Küster, E. (2008). How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1676–1682.
- (27) ISO (1996). International Standard. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Kätesaadav aadressil <http://www.iso.org>.
- (28) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Pariis.
- (29) Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121–173.
- (30) Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. väljaanne. Neuroteaduste instituut, Oregoni Ülikool. University of Oregon Press, Eugene, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. ISBN: 0-919087-43-4. <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Euroopa Komisjon (2007). Komisjoni soovitus 2007/526/EÜ, 18. juuni 2007, teaduslikes katsetes ja muudel teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade pidamise ja hooldamise suuniste kohta (teatavaks tehtud numbri K(2007) 2525 all) (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:ET:PDF>).
- (33) Euroopa Liit (2010). Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta. *Euroopa Liidu Teataja* L 276, 20.10.2010, lk 33.  
  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:ET:PDF>
- (34) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173–181.

**▼M7**

- (35) Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., ja Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203: 253–310.
- (36) Käesoleva lisa peatükk C.2 „*Daphnia* sp. liikumisvõime akuutse pärssimise katse“.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., ja Duis, K. (2009). Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970–1978.
- (38) ISO (2006). International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. ISO TS 20281. Kättesaadav aadressil <http://www.iso.org>.
- (39) OECD (2006). Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariis.
- (40) Braunbeck, T., ja Lammer, E. (2006). Põhjalik ülevaateartikkel „Fish embryo toxicity assays“. UBA aruanne lepingu nr 20385422 raames. Saksamaa Keskkonnaamet, Berliin. 298 lk.

▼ **M7***1. liide***MÕISTED**

**Lõppnäitaja** – näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil.

**Blastula** – animaalsel poolusel paiknev rakukogum, mis katab teatava osa rebust.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Epiboolia** – peamiselt epidermaalsete rakkude massiline paljunemine embrüo arengu gastrulatsioonietapis ja nende rakkude liikumine dorsaalselt küljelt ventraalsele; selle käigus sopistub endodermaalne rakukiht invaginatsiooni meenutava protsessi tagajärjel sisse ja rebu haaratakse embrüo koosseisu.

**Läbivoolukatse** – katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

**Plaadisene kontroll** – sisemine kontroll, mis hõlmab 24-kannulisel plaadil lahjendusveega täidetud 4 kannu ning võimaldab tuvastada plaadi võimalikku saastumist tootja või katset tegeva teadlase süül ja plaadiga seotud mis tahes võimalikku mõju katsetulemustele (nt temperatuurigradient).

**IUPAC** – Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit.

**Kalade pidamise vesi** – vesi, mida kasutatakse täiskasvanud kalade pidamiseks.

**Letaalne mediaankontsentratsioon (LC<sub>50</sub>)** – uuritava kemikaali hinnanguline kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel letaalne 50 protsendile katseorganismidest.

**Poolstaatiline uuendamisega katse** – katse, mille käigus katselahuseid uuendatakse korrapäraselt kindlaksmääratud ajavahemike (nt iga 24 tunni) järel.

**SMILES** – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

**Somiit** – selgroogsete embrüo arengus on somiidid neuraalitoru külgedel paiknevad mesodermaalsed rakumassid, millest lõpuks arenevad pärisnahk (dermatoom), skeletilihased (müotoom) ja selgroolülid (sklerotoom).

**Staatiline katse** – katse, mille puhul katselahuseid katse käigus ei uuendata.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

## ▼M7

## 2. liide

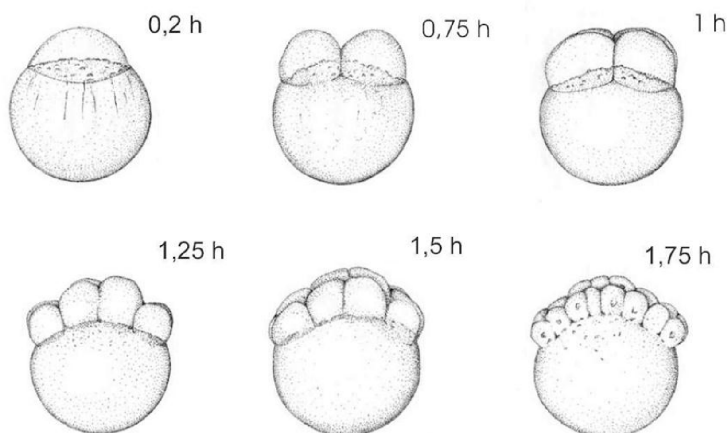
**KALADE PIDAMINE JA KASVATAMINE NING VÖÖDILISE DAANIO EMBRÜOTEGA TEHTAVA ÄGEDA MÜRGISUSE KATSE TAVAPÄRASED TINGIMUSED**

<b>Vöödilise daanio (<i>Danio rerio</i>)</b>		
Liigi päritolu	India, Birma, Malaka, Sumatra	
Sooline dimorfism	Emased: esileulatuv kõht marja kandmise ajal Isased: saledamad, oranži värvusega siniste pikitriipude vahel (eriti selgelt nähtav päraakuime juures)	
Söötmissrežiim	Kuiv helvessööt 3–5 korda päevas (maksimaalselt 3 % kala kehamassist päevas); täiendavalt soolase vee krevettide ( <i>Artemia</i> sp.) noorjärgus isendid ja/või saastumata allikast pärit sobiva suurusega väikesed kiivrikud. Elussööt on keskkonda rikastav ja seepärast tuleks seda võimaluse korral alati anda. Optimaalse veekvaliteedi tagamiseks tuleks sööda ülejääk ja väljaheited eemaldada umbes üks tund pärast söötmist.	
Täiskasvanud kala ligikaudne mass	Emased: 0,65 ± 0,13 g Isased: 0,5 ± 0,1 g	
Sugukalade pidamine	Valgustus	Luminofoorlambid (laia spektriga); 10–20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540–1080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus); valgustusperiood 12–16 tundi
	Vee temperatuur	26 ± 1 °C
	Vee kvaliteet	O <sub>2</sub> sisaldus: ≥ 80 % küllastuskontsentratsioonist; karedus: nt ~ 30–300 mg CaCO <sub>3</sub> liitri kohta; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sisaldus: ≤ 48 mg/l; NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ja NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> sisaldus: < 0,001 mg/l; kloorijääkide sisaldus: < 10 µg/l; orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus: < 25 ng/l; pH: 6,5–8,5
	Täiendavad vee kvaliteedi kriteeriumid	Tahkete osakeste sisaldus < 20 mg/l, orgaanilise süsiniku üldsisaldus < 2 mg/l, fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus < 50 ng/l, kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus < 50 ng/l
	Kalade pidamiseks kasutatava akvaariumi suurus	Nt 180 liitrit; 1 kala liitri kohta
	Veepuhastus	Pidev (söefiltri abil); muu võimalusena võib seda kombineerida perioodilisel uuendamisel põhineva poolstaatilise süsteemi või vee pideval uuendamisel põhineva läbivoolusüsteemiga
	Soovitav isas- ja emaskalade suhtarv kudemisel	2:1 (või masskudemine)
Kudemisnõud	Nt 4-liitrised nõud, mille põhjas on terasvõrk ja mis sisaldavad kudemise soodustamiseks kunsttaimi; välised soojendusmatid või masskudemine kalade pidamiseks kasutatavates akvaariumides	
Marjaterade struktuur ja välimus	Stabiilne koorion (st väga läbipaistev, mittekleepuv, läbimõõduga ~ 0,8–1,5 mm)	
Kudemismäär	Üks suguküps emaskala koeb vähemalt 50–80 marjatera päevas. Kalaliinist sõltuvalt võib kudemismäär olla oluliselt suurem. Viljastamismäär peaks olema ≥ 70 %. Esmakordselt kudevate kalade puhul võib marjaterade viljastamise määr paaril esimesel kudemisel olla väiksem.	
Katse tüüp	Staatiline, uuendamise poolstaatiline või läbivoolukatse, 26 ± 1 °C, 24 tunni vältel katsetingimustega kohandatud katsekambriid (nt 24-kannulised plaadid, 2,5–5 ml lahust kannu kohta)	

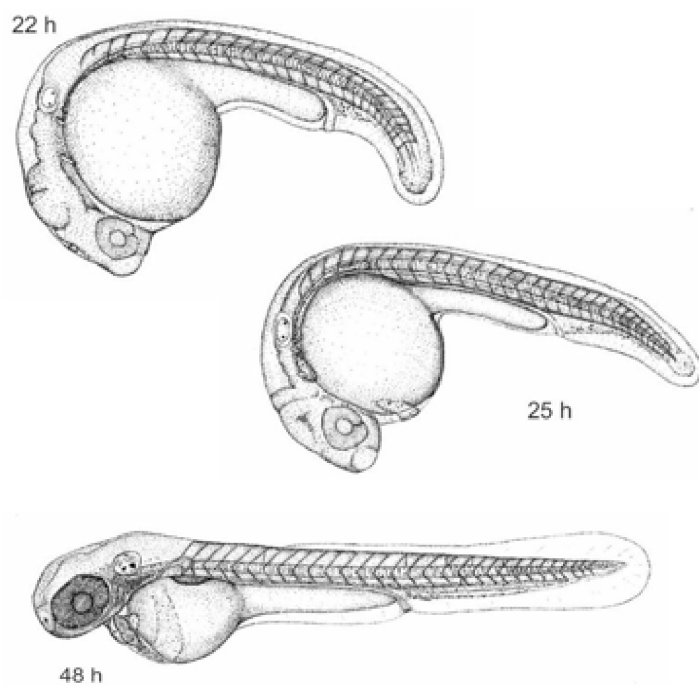
▼ M7

## 3. liide

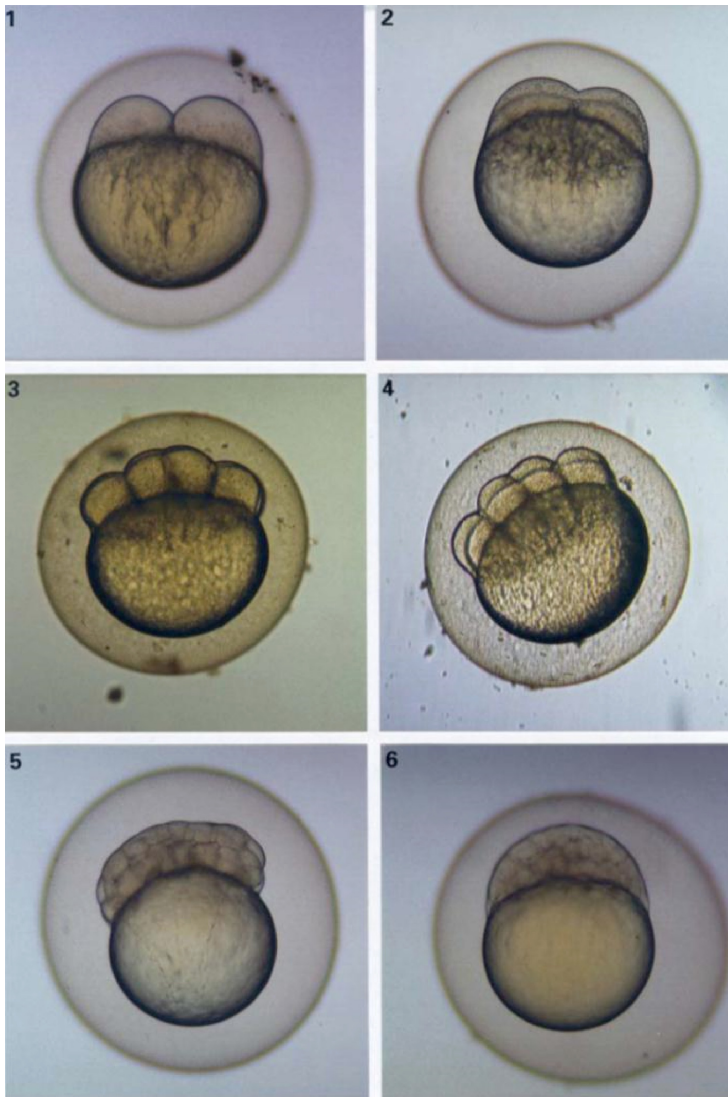
## VÖÖDILISE DAANIO NORMAALNE ARENG TEMPERAATUURIL 26 °C



**Joonis 1. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) varase arengu valitud etapid:** 0,2–1,75 tundi pärast viljastamist (allikas: Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Normaalse arengu sündmuste ajalist järgnevust võib kasutada nii marjaterade viljastamise kui ka nende elujõulisuse hindamiseks (viljastatud marjaterade valimist on käsitletud punktis 26).



**Joonis 2. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) hilised valitud arenguetapid** (embrüolt on nähtavuse parandamiseks eemaldatud koorion): 22–48 tundi pärast viljastamist (allikas: Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

▼ M7

**Joonis 3. Vöödilise daanio (*Danio rerio*) embrüo normaalne areng:** 1) 0,75 tunni pärast, kahearakuline staadium; 2) 1 tunni pärast, neljarakuline staadium; 3) 1,2 tunni pärast, kaheksarakuline staadium; 4) 1,5 tunni pärast, 16-rakuline staadium; 5) 4,7 tunni pärast, epiboolia algus; 6) 5,3 tunni pärast, epiboolia on umbes 50 % ulatuses ära toimunud (allikas: Braunbeck ja Lammer, 2006 (40)).

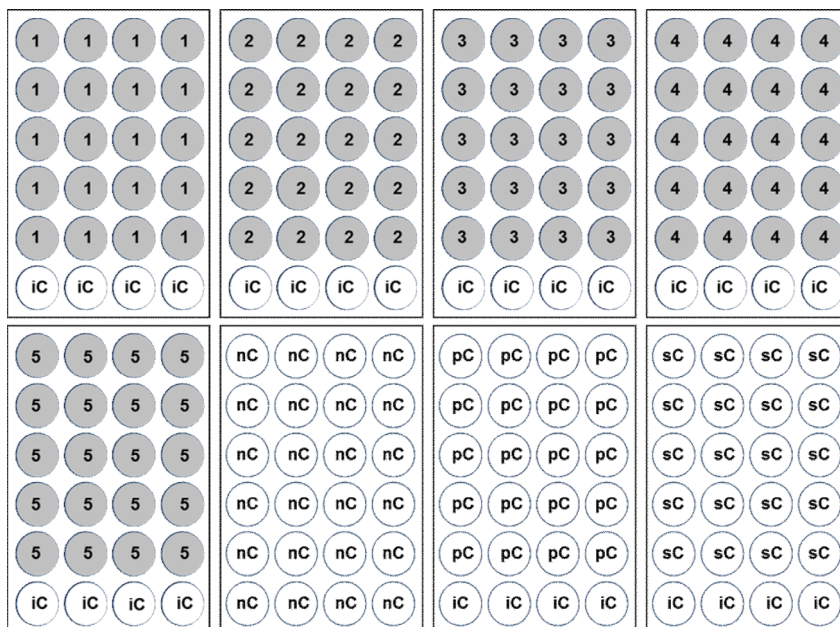


▼ M7

## 4. liide

## Joonis 1

## Jaotuskeem 24-kannulisel plaadil



1–5 = viis katsekonsentratsiooni kemikaali kohta;

nC = negatiivne kontroll (lahjendusvesi);

iC = plaadisisene kontroll (lahjendusvesi);

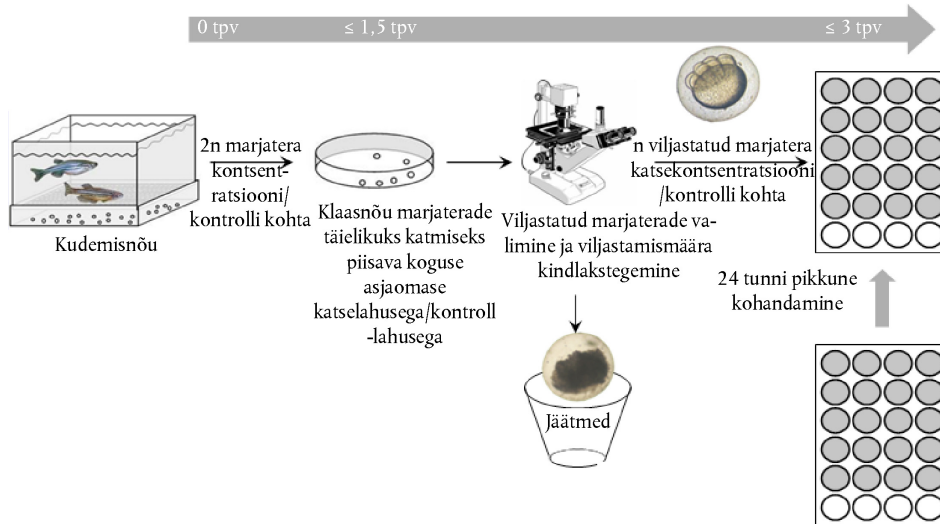
pC = positiivne kontroll (3,4-dikloroaniliin, 4 mg/l);

sC = lahustiga kontroll

▼ M7

Joonis 2

Vöödilise daanio embrüotega tehtava ägeda mürgisuse katse skeem (vasakult paremale): marja heitmine, marjaterade kogumine, kokkupuute-eelne periood klaasnõudes vahetult pärast viljastamist, viljastatud marjaterade valimine invertmikroskoobi või binokulaarmikroskoobi abil ja nende jaotamine 24-kannuliste plaatidele, kuhu on eelnevalt lisatud asjakohase kontsentratsiooniga katselahus või kontroll-lahus;  $n$  – vajalik marjaterade arv katsekonsentratsiooni/kontrolli kohta (siin 20),  $tpv$  – tundi pärast viljastamist.



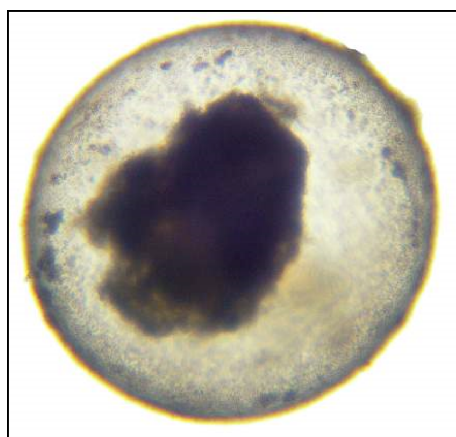
▼ M7

## 5. liide

**VÖÖDILISE DAANIO EMBRÜOTEGA TEHTAVAS ÄGEDA MÜRGISUSE KATSES TÄHELDATAVA LETAALSE MÕJU LÕPPNÄITAJATE ATLAS**

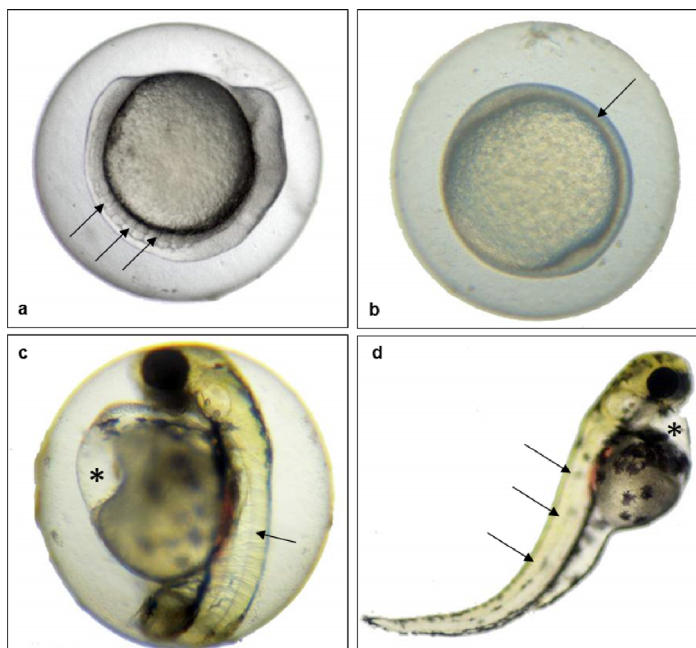
Ägedale mürgisusele ja sellest tulenevale embrüo surmale viitavad järgmised lõppnäitajad: *embrüo koaguleerumine, saba eraldumata jäämine, somiitide moodustumata jäämine ja südamelöökide puudumine*. Nende lõppnäitajate illustreerimiseks on valitud järgmised mikrograafid.

## Joonis 1

**Embrüo koaguleerumine:**

vöödilise daanio koaguleerunud embrüotel täheldatakse helevälja meetodil valgustamisel mitmesuguseid läbipaistmatuid inklusioone.

## Joonis 2

**Somiitide moodustumata jäämine:**

▼ **M7**

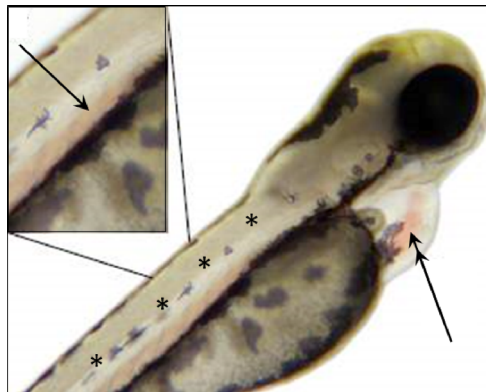
ehkki pildil a kujutatud 24 tunni vanune vöödilise daanio embrüo on arengus umbes 10 tundi maha jäänud, on sellel näha hästi välja kujunenud somiidid (→), kuid pildil b kujutatud embrüo puhul ei esine mingeid märke somiitide moodustumisest (→). Ehkki pildil c kujutatud 48 tunni vanusel vöödilise daanio embrüol võib täheldada silmatorkavat rebukoti turset (\*), on sellel moodustunud selgelt eristatavad somiidid (→), kuid pildil d kujutatud 96 tunni vanuse embrüo puhul ei esine mingeid märke somiitide moodustumisest (→). Samuti tuleks tähele panna pildil d kujutatud embrüo selgroo kõverust (skolioos) ja perikardi turset (\*).

Joonis 3

**Sabaalgme eraldumata jäämine külgsaates**

(a: →; 96 tunni vanune vöödilise daanio embrüo). Tuleks tähele panna ka silmaalgme puudumist (\*).

Joonis 4

**Südamelöökide puudumist**

Südamelöökide puudumist on määratlusest tulenevalt keeruline mikrograafil kujutada. Südamelöökide puudumisele viitab südame (topeltnool) kokkutõmmete puudumine. Vererakkude liikumatus näiteks kõhuaordis (→ suurendatud pildil) ei ole südamelöökide puudumise näitaja. Samuti tuleks tähele panna somiitide puudumist kujutatud embrüol (\*; lihaskude on homogeenne, mitte segmenteerunud). Südamelöökide puudumise registreerimiseks tuleks embrüot vaadelda vähemalt 80-kordsel suurendusel vähemalt ühe minuti vältel.

## ▼ M7

C.50. Settevaba mürgisuskatse *Myriophyllum spicatum*'iga

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 238 (2014). Selle abil on võimalik hinnata kemikaalide mürgisust perekonda vesikuusk kuuluvale kaheidulehelisele veesisesele liigile *Myriophyllum spicatum*. Meetod põhineb olemasoleval ASTMi katsemeetodil (1), mida on kohandatud settevabas katsesüsteemis kasutamiseks (2), et võimaldada hinnata uuritava kemikaali tegelikku ökotoksilisust (olenemata kemikaali vee ja sette vahel jaotumise näitajatest). Setteta katsesüsteemis on analüüsimine hõlbus (üksnes veefaasis) ja tulemusi on võimalik vaadelda paralleelselt ja/või võrdluses *Lemna* sp. põhise katse tulemustega (3); peale selle võimaldavad nõutavad steriilsed tingimused tagada, et mikroorganismide ja vetikate mõju (kemikaali omastamine/lagundamine jne) on võimalikult väike. Käesolev katsemeetod ei asenda muid veekeskkonnas avalduva mürgisuse hindamise meetodeid, vaid pigem täiendab neid ja võimaldab täielikumalt hinnata ohte ja riske veetaimedele. Käesolev meetod on valideeritud võrdlusuuringuga (4).
2. Meetodis kirjeldatakse katse üksikasju uuendatava katselahuse (poolstaatiline režiim) ja mitteuuendatava katselahuse (staatiline režiim) kasutamisel. Olenevalt katse eesmärgist ja regulatiivsetest nõuetest on soovitatav kasutada poolstaatilist režiimi näiteks selliste ainete puhul, mis kaovad lahusest kiiresti lendumise, adsorbeerumise, fotolagunemise, hüdrolüüsumise, sadenemise või biolagunemise tõttu. Täiendavad juhised on esitatud viites 5. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse ainete puhul, mille jaoks see on valideeritud (üksikasjalik teave on esitatud võrdlusuuringu aruandes (4)), ning valmististe ja teadaolevate segude puhul; segu analüüsimisel peaksid selle koostisosad olema võimalikult suures ulatuses määratletud ja kvantifitseeritud. Käesolev *Myriophyllum spicatum*'il põhinev settevaba katsemeetod täiendab *Myriophyllum spicatum*'ile süsteemis vesi/sete avalduva mürgisuse hindamise meetodit (6). Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas ja kuidas see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

## KATSE PÕHIMÕTE

3. Pidevalt kasvavatel *Myriophyllum spicatum*'i taimedel (kasutatakse üksnes muudetud Andrews'i söödet; vt 2. liide) lastakse kasvada settevabas katsesüsteemis monokultuurina 14 päeva eri kontsentratsioonides esineva uuritava kemikaali juuresolekul. Katse eesmärk on kirjeldada valitud mõõdetava muutuja alusel kvantitatiivselt kemikaali mõju vegetatiivsele kasvule nimeetatud perioodi jooksul. Mõõdetavad muutujad on võrsete, külgharude ja juurte pikkus, samuti märgmass ja kuivmass ning männaste arv. Peale selle võetakse arvesse katseorganismidel täheldatavaid spetsiifilisi kvalitatiivseid muutusi, näiteks väliseid moonutusi, kloroosi ja nekroosi, millele viitab kolletumine või valge-pruunikirju värvus. Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kasvuga kontrollrühmas ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi  $x$  võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $EC_x$ , kus  $x$  võib olla regulatiivsetest nõuetest sõltuvalt mis tahes väärtusega – nt  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  või  $EC_{50}$ . Tuleks tähele panna, et  $EC_{10}$  ja  $EC_{20}$  hinnanguline väärtus on usaldusväärne ja asjakohane üksnes sellise katse puhul, kus kontrolltaimi iseloomustav variatsioonikordaja on hinnatava mõju ulatusest väiksem; see tähendab, et  $EC_{20}$  usaldusväärseks hindamiseks peaks variatsioonikordaja olema  $< 20\%$ .
4. Töödeldud ja töötlemata taimedel tuleks määrata nii keskmine kasvu erikiirus kui ka saagis (kumbagi näitajat hinnatakse peavõrse pikkuse ja kolme täiendava mõõdetava muutuja alusel). Leitud kasvu erikiirust ( $r$ ) ja saagist ( $y$ )

▼ **M7**

kasutatakse vastavalt  $E_rC_x$  (nt  $E_rC_{10}$ ,  $E_rC_{20}$ ,  $E_rC_{50}$ ) ja  $E_yC_x$  (nt  $E_yC_{10}$ ,  $E_yC_{20}$ ,  $E_yC_{50}$ ) määramiseks.

5. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni ja täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni.

## TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

6. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtus ja lisandid, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes, happe dissotsiatsioonikonstant ( $pK_a$ ), jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi ( $K_{ow}$ ), aururõhk ja biolagundatavus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. See aitab kindlaks teha, kas sellise kao ärahoidmiseks tuleks võtta konkreetseid meetmeid. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures.
7. Katsesöötme pH reguleerimine on eriti oluline näiteks juhul, kui analüsitakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid aineid. Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (5).

## KATSE NÕUETEKOHASUS

8. Katse vastab nõuetele, kui peavõrse pikkuse kahekordistumise aeg kontrollrühmas on lühem kui 14 päeva. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud söötmete ja katsetingimuste kasutamisel on see kriteerium täidetav nii staatilise kui ka poolstaatilise katserežiimi puhul.
9. Võrsete märgmassi (st katse alguses ja katse lõpus saadud väärtuste) ja täiendavate mõõdetud näitajate (vt punkt 37) alusel arvutatud saagise keskmine paralleelkultuuride vaheline variatsioonikordaja ei tohi kontrollrühmas olla suurem kui 35 %.
10. Kontrollrühmas peavad üle 50 % paralleelkultuuridest püsima 14 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi vältel steriilsena, st need ei tohi olla nähtavalt saastunud muude organismidega, näiteks vetikate, seente või bakteritega (selge lahus). *Märkus:* steriilsuse hindamise juhised on esitatud võrdlusuuringu aruandes (4).

## VÕRDLUSKEMIKAAL

11. Katsemeetodi kontrollimiseks võib kasutada ühte või mitut võrdluskemikaali, näiteks võrdlusuuringus (4) kasutatud 3,5-diklorofenooli; võrdlusuuringu andmete põhjal jäävad 3,5-diklorofenooli  $EC_{50}$  keskvaartused eri uuritavate muutujate puhul (vt käesoleva katsemeetodi punktid 37–41) vahemikku 3,2–6,9 mg/l (üksikasjalik teave nende väärtuste usaldusvahemiku kohta on esitatud võrdlusuuringu aruandes). Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt.

▼ **M7****MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

12. Kõik katsesöötmega kokku puutuvad seadmed peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kultuuride kasvatamiseks ja katseteks kasutatavad klaasnõud peaksid olema steriilsed ja katsesöötmesse leostuda võivatest keemilistest saasteainetest puhastatud. Katsenõud peavad olema piisavalt kõrged, et kontrollnõudes olevad võrsed saaksid kasvada veefaasis ega jõuaks katse lõpuks katsesöötmepinnale. Soovitatakse kasutada servarandita ja alumiiniumkorgiga paksuseinalisi boorsilikaatklaasist katseklaase siseläbimõõduga umbes 20 mm ja pikkusega umbes 250 mm.
13. Kuna muudetud Andrews si sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab seente ja bakterite kasvu), tuleb katselahused valmistada steriilsetes tingimustes. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga (210 °C) või autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.
14. Kultuure ja katsenõusid ei tohiks hoida koos. Seepärast on kõige parem kasutada eraldi kasvukambreid, inkubaatoreid või ruume. Valgustihedus ja temperatuur peaksid olema reguleeritavad ja neid tuleks hoida konstantsena.

**Katseorganism**

15. *Myriophyllum spicatum* – veesisene kaheiduleheline liik – kuulub perekonda vesikuusk. Ajavahemikul juunist augustini ilmuvad veepinna kohale silmatorkamatud roosakasvalged õied. Taimed on juurdunud tugevate risoomide süsteemi abil ja neid võib leida kogu põhjapoolkeral eutroofsetes, kuid saastumata ja lubjarikkamates mudase põhjaga seisuveekogudes. *Myriophyllum spicatum* eelistab magevett, kuid võib esineda ka riimvees.
16. Settevaba mürgisuskatse jaoks on vaja steriilseid taimi. Kui laboris, kus katset tehakse, ei kultiveerita tavaliselt *Myriophyllum spicatum*'it, võib steriilse taimse materjali saada mõnest muust laborist või hankida (mittesteriilsed) taimed loodusest või kaubandusliku tarnija käest; kui taimed saadakse loodusest, tuleks ette näha liigilise kuuluvuse kontrollimine. Loodusest kogutud või kaubanduslikult tarnijalt saadud taimed tuleks enne kasutamist steriliseerida (1) ja kultiveerida neid vähemalt kaheksa nädalat katses kasutatavas söötmes. Loodusliku lähtekultuuri kogumiskohas ei tohi esineda ilmseid saasteallikaid. *Myriophyllum spicatum*'i kogumisel loodusest tuleks hoolega jälgida, et võetakse õige liigi taimed, eriti piirkonnas, kus see liik võib hübriidiseeruda teiste *Myriophyllum*'i liikidega. Teisest laborist saadud taimi tuleks enne kasutamist kultiveerida samal viisil vähemalt kolm nädalat. Taimse materjali allikas ning katses kasutatud liik tuleks alati märkida katseprotokollis.
17. Katses kasutatavate taimede kvaliteet ja ühetaolisus mõjutavad märkimisväärselt katsetulemust ning seepärast tuleks taimi hoolikalt valida. Tuleks kasutada kiirelt kasvavaid noori taimi, millel pole nähtavaid kahjustusi ega värvimuutusi (kloroos). Katseorganismi ettevalmistamist on üksikasjalikult kirjeldatud 4. liites.

**Kultiveerimine**

18. Kultuuride hooldamissageduse vähendamiseks (nt kui teatava aja jooksul ei kavandata katseid vesikuusega) võib kultuure hoida vähendatud valgustiheduse ja madalama temperatuuri juures ( $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Kultiveerimist on üksikasjalikult kirjeldatud 3. liites.

▼ **M7**

19. Vähemalt 14–21 päeva enne katset viiakse piisav arv katseorganisme aseptiliselt värskesse steriilsesse söötmesse ja neid kasvatatakse katsetingimustes eelkultuurina 14–21 ööpäeva. Eelkultuuri loomist on üksikasjalikult kirjeldatud 4. liites.

**Katsesööde**

20. Settevabas katsesüsteemis soovitatakse kasutada *Myriophyllum spicatum*'i jaoks ainult ühte söödet, nagu on kirjeldatud 2. liites. *Myriophyllum spicatum*'i kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks on soovitatav kasutada muudetud Andrews'i söödet, nagu on kirjeldatud viites 1. Muudetud Andrews'i sööde saadakse viiest eraldi valmistatud toitaine põhilahusest, millele lisatakse 3 % sahharoosi. Söötme valmistamist on üksikasjalikult kirjeldatud 2. liites.
21. Katselahuste valmistamiseks (asjakohase lahendamise teel) on vajalik kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrews'i sööde. Selle söötme koostis on esitatud 2. liites.

**Katselahused**

22. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahendamise teel. Uuritava kemikaali põhilahuse valmistamiseks lahustatakse kemikaal tavaliselt demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vees. Toitainete lisamiseks kasutatakse kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrews'i söödet.
23. Uuritava kemikaali põhilahuse võib steriliseerida autoklaavimisega 20 minuti jooksul 121 °C juures või filtrimise teel, eeldusel, et uuritav kemikaal kasutatava steriliseerimismeetodi puhul ei denatureeru. Katselahused võib valmistada ka steriilselt demineraliseeritud vee või söötmega steriilsetes tingimustes. Uuritava kemikaali põhilahuse steriliseerimise meetodi valikul tuleks arvesse võtta kemikaali termilist püsivust ja adsorbeerumist eri pindadele. Seepärast on soovitatav valmistada põhilahus steriilsetes tingimustes, st lahustada uuritav kemikaal steriilsete materjalide abil steriilsetes tingimustes (nt leegis steriliseerimine, laminaarkapp vms) steriilses vees. Kõnealune steriilselt põhilahuse valmistamise meetod on rakendatav nii ainete kui ka segude puhul.
24. Üldjuhul ei tohiks uuritava kemikaali suurim kasutatav kontsentratsioon ületada kemikaali vees lahustuvuse piirkontsentratsiooni katsetingimustes. Veest raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamisel peaks selle lõppsisaldus olema võimalikult väike (≤ 100 µl/l) ja tuleks märkida katseprotokollis ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleks kasutada lahusti või dispergeeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud viites 5.

**Katse- ja kontrollrühmad**

25. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus *Myriophyllum spicatum*'ile on kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega eelnevalt kindlaks tehtud. Lõplikus mürgisuse hindamises katsete tuleks üldjuhul kasutada viit (nagu käesoleva lisa peatükis C.26 kirjeldatud *Lemna* kasvu pidurdumise katses) kuni seitset katsekontsentratsiooni geomeetrilises jadas; kõnealune kontsentratsioonivahemik tuleks valida nii, et see



▼ **M7**

hõlmaks täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni ja  $EC_{50}$ . Katsekonsentratsioonide jada tegur ei tohiks soovitatavalt olla suurem kui 3,2; kontsentratsioonide ja mõju vahelise nõrga sõltuvuse puhul võib siiski kasutada suuremat tegurit. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleks seda põhjendada. Uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada vähemalt viit paralleelkultuuri.

26. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ja/või mürgisuse hindamise lõplikus katses kasutatavate kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta järgmist.

$EC_x$  määramisel peaks  $EC_x$  väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusväärsus. Näiteks peaks  $EC_{50}$  määramisel suurim katsekonsentratsioon olema suurem kui  $EC_{50}$  väärtus. Kui  $EC_{50}$  väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata.

Kui eesmärk on leida vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, peaks väikseim katsekonsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Peale selle peaks suurim katsekonsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Vastasel juhul tuleb katset korrata ning kasutada seejuures teistsugust kontsentratsioonivahemikku (kui suurim kasutatav kontsentratsioon ei ole juba võrdne lahustuvuse piirkontsentratsiooniga või suurima nõutava kontsentratsiooniga, näiteks 100 mg/l).

27. Iga katse peaks hõlmama kontrole, mille puhul kasutatakse sama söödet ja katseorganismi (eelkultuurist valitakse võimalikult homogeenne taimne materjal: noored külgharud, mis lühendatakse otsast mõõtes 2,5 sentimeetri) ning samu keskkonnatingimusi ja meetodeid kui katsenõude puhul, kuid uuritav kemikaal jäetakse lisamata. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks lisaks valmistada kontrollkultuur, milles lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon on sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes. Paralleelseid kontrollnõusid (ja vajaduse korral lahustiga nõusid) peaks olema vähemalt kümme.
28. Kui ei ole vaja määrata täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni, võib katseplaan muuta nii, et suurendatakse uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelide arvu iga kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab siiski olema vähemalt kümme.

#### **Kokkupuude**

29. Eelkultuurist võetud noored külgharud, mis on lõigatud otsast mõõdetuna 2,5 cm pikkuseks, jaotatakse aseptilistes tingimustes juhuslikkuse alusel katsenõudesse; iga katsenõu peaks sisaldama ühte 2,5 cm pikkust külgharu, mille ühes otsas asub tipmine meristeem. Valitud taimne materjal peaks olema kõikides katsenõudes sama kvaliteediga.
30. Katsenõude paigutus inkubaatoris peab olema juhuslik, et vähendada asukohest tingitud valgustiheduse ja temperatuuri erinevuste mõju. Samuti on vaja katsenõusid vaatluste tegemise ajal või suurema sagedusega kas kindla skeemi alusel või juhuslikult ümber paigutada.
31. Kui kemikaali püsivuse määramise eelkatsest nähtub, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni ei ole võimalik katse vältel (14 päeva jooksul) püsivana hoida, st kemikaali mõõdetud sisaldus langeb alla 80 % mõõdetud algsisaldusest, soovatakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul tuleks taimed katse jooksul vähemalt ühel korral (nt seitsmendal katsepäeval) üle viia värskest valmistatud katse- ja kontroll-lahustesse. Värskesse söötmesse

▼ **M7**

üleviimise sagedus sõltub uuritava kemikaali püsivusest; väga ebapüsiva või lenduva kemikaali puhul võib selle sisalduse peaaegu püsivana hoidmiseks olla vaja tagada sagedasem üleviimine värskesse söötmesse.

32. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta kokkupuudet taimelehtedele pritsimise teel.

**Katsetingimused**

33. Tuleks kasutada päevavalguse spektriga ja/või külmvalget fluorestsentsvalgust, mille valgustihedus jääb vahemikku umbes 100–150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (vastab umbes 6 000–9 000 luksile), mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui katsenõude põhi. Tuleks kasutada valgustusrežiimi 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Valgustiheduse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist. Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõtetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitnepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.
34. Temperatuur katsenõudes peaks olema  $23 \pm 2$  °C. Erijuhul, nt ebapüsiva kemikaali või metalli mõju uurimisel tuleb pöörata erilist tähelepanu pH muutumisele; pH peaks püsima vahemikus 6–9. Täiendavad juhised on esitatud viites 5.

**Kestus**

35. Katse lõpetatakse, kui taimede viimisest katsenõudesse on möödunud 14 päeva.

**Mõõtmised ja analüüsid**

36. Katse alguses on katseorganismi peavõrse pikkus 2,5 cm (vt punkt 29); selle mõõtmiseks kasutatakse joonlauda (vt 4. liide) või fotot ja pildianalüüsi. Tavapärase või ebanormaalse välimusega katseorganismi peavõrse pikkus tuleb mõõta katse alguses, vähemalt üks kord 14 päeva pikkuse kokkupuuteperioodi jooksul ning katse lõpus. Märkus: pildianalüüsi võimaluse puudumise korral võib teise võimalusena kasutada peavõrse pikkuse mõõtmiseks katse alguses ja katse kestel ka steriilset joonlauda, kui töölaud on enne katsenõudesse taimede lisamist steriliseeritud. Tuleks registreerida muutused taimede arengus, näiteks võrsete moonundumine, muutused välimuses, nekroosi või kloroosi ilmingud, taimede lagunemine või ujuvuse vähenemine ning muutused juurte pikkuses ja välimuses. Samuti tuleks registreerida olulised muutused katsesöötmes (nt lahustumatu aine esinemine, vetikate, seente ja bakterite kasv katsenõus).
37. Lisaks peavõrse pikkuse määramisele katse jooksul tuleks hinnata uuritava kemikaali mõju ka vähemalt kolmele järgmistest mõõdetavatest muutujatest:
- i. külgharude summaarne pikkus,
  - ii. võrsete summaarne pikkus,
  - iii. juurte summaarne pikkus,
  - iv. märgmass,
  - v. kuivmass,
  - vi. männaste arv.

▼ M7

- Märkus 1:* kontsentratsioonivahemiku leidmise katses tehtud vaatlused võivad hõlbustada asjakohaste lisanäitajate valimist eespool loetletud kuue muutuja hulgast.
- Märkus 2:* märg- ja kuivmassi (parameetrid iv ja v) määramine on tungivalt soovitatav.
- Märkus 3:* Kuna sahharoos ja valgus (juurte sattumine valguse kätte katse vältel) võivad mõjutada auksiini (taimede kasvuhormoon) transporti vahendavaid kandevalke ja kuna mõne kemikaali toimemehhanism võib sarnaneda auksiini omale, on juurte pikkuse (parameeter iii) kasutamine lõppnäitajana küsitav.
- Märkus 4:* Võrdlusuuringu tulemustest nähtub, et külgharude summaarse pikkuse (parameeter i) variatsioonikordaja on suur ( $> 60\%$ ). Võrsete summaarne pikkus (parameeter ii) hõlmab niikuinii ka külgharude summaarset pikkust ja selle näitaja variatsioonikordaja on vastuvõetavama väärtusega:  $< 30\%$ .
- Märkus 5:* Eespool esitatud kaalutlustest lähtuvalt soovitatakse kasutada järgmisi mõõdetavaid lõppnäitajaid: võrsete summaarne pikkus, märgmass ja kuivmass (parameetrid ii, iv ja v); parameetri vi – männaste arvu – kasutamine jäetakse katse läbiviija otsustada.
38. Peavõrse pikkuse ja männaste arvu kindlakstegemise eelis seisneb selles, et seda saab katse alguses, kestel ja lõpus iga katse- ja kontrollnõu puhul teha pildistamise ja pildianalüüsi teel, ehkki võib kasutada ka (steriilset) joonlauda.
39. Külgharude summaarset pikkust, juurte summaarset pikkust (kõikide külgharude või juurte pikkus kokku) ja võrsete summaarset pikkust (peavõrse pikkus ja külgharude summaarne pikkus kokku) saab mõõta joonlauaga kokkupuute lõpus.
40. Märg- ja/või kuivmass tuleks määrata katse alguses eelkultuuri representatiivse proovi alusel ning katse lõpus igast katse- ja kontrollnõust saadud taimse materjali alusel.
41. Külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi ja männaste arvu saab kindlaks teha järgmiselt.
- i. Külgharude summaarne pikkus – külgharude pikkuse kindlakstegemiseks saab kokkupuute lõpus mõõta joonlauaga ära kõik külgharud. Külgharude summaarne pikkus on igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud kõikide külgharude pikkus kokku.
  - ii. Võrsete summaarne pikkus – peavõrse pikkuse võib kindlaks teha pildianalüüsi abil või joonlauaga. Võrsete summaarne pikkus on kokkupuute lõpus igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud külgharude summaarne pikkus ja peavõrse pikkus kokku.
  - iii. Juurte summaarne pikkus – juurte pikkuse kindlakstegemiseks saab kokkupuute lõpus mõõta joonlauaga ära kõik juured. Juurte summaarne pikkus on igas katse- ja kontrollnõus mõõdetud kõikide juurte pikkus kokku.
  - iv. Märgmass – märgmassi määramiseks saab katseorganismid kokkupuute lõpus ära kaaluda. Igast katse- ja kontrollnõust pärit kogu taimne materjal

▼ **M7**

loputatakse destilleeritud veega läbi ja kuivatatakse kergelt tselluloospaberiga. Pärast sellist ettevalmistust määratakse kaalumise teel märgmass. Biomassi (märgmassi) algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist.

- v. **Kuivmass** – pärast märgmassi määramiseks tehtud ettevalmistusi kuivatatakse katseorganismide 60 °C juures, kuni nende mass enam ei muutu. See mass on taimede kuivmass. Biomassi (kuivmassi) algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist.

- vi. **Männaste arv** – loetakse ära kõik peavõrsel paiknevad männased.

*Mõõtmiste ja analüüside sagedus*

42. Staatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta pH igas katsenõus katse alguses ja lõpus. Poolstaatilise katserežiimi puhul tuleks mõõta värske katselahuse pH enne iga lahusevahetust ja määrata ka iga äratarvitatud lahuse pH.
43. Valgustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui katseorganismid. Valgustihedust tuleks katse jooksul mõõta vähemalt üks kord. Söötmel temperatuur kasvukambri, inkubaatori või ruumis samades tingimustes hoitava jälgendusnõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas (või teha seda andmeregistraatori abil pidevalt).
44. Uuritava kemikaali sisaldus määratakse katse ajal sobivate ajavahemike järel. Staatilise katse puhul tuleb uuritava kemikaali sisaldus määrata vähemalt katse alguses ja lõpus.
45. Poolstaatilise katse puhul, kus uuritava kemikaali sisaldus ei püsi eeldatavalt  $\pm 20$  % piires nominaalväärtusest, tuleb selle sisaldus määrata kõigis värskelt valmistatud katselahustes ja samades lahustes nende väljavahetamise ajal. Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja püsiv (st jääb vahemikku 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil. Kõigil juhtudel on kemikaali sisaldus igal katses kasutataval kontsentratsioonil vaja enne katselahuse väljavahetamist määrata ainult ühes paralleelnõus (või paralleelnõude sisu koondproovis).
46. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui  $\pm 20$  %, võib tulemuste analüüsimisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse. Kui kõrvalekalle sisalduse nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui  $\pm 20$  %, tuleks tulemuste analüüsimisel võtta aluseks katse vältel esinenud väärtuste geomeetiline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (5).

**Piirsalduskatse**

47. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmel lahustuvuse piirkontsentratsioonil või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkontsentratsioonil mürgist mõju, võib teha piirsalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonil. Piirsalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsalduskatse puhul kohaldatakse kõiki eespool kirjeldatud katsetingimusi ja nõuetele

▼ **M7**

vastavuse kriteeriume; ainsa erandina nähakse ette, et uuritava kemikaaliga paralleelkultuure peaks olema kaks korda rohkem. Kasvu analüüsimiseks kontrollrühmas ja katsesuhmades võib keskvaartusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

**ANDMED JA ARUANDLUS****Uuritavad muutujad**

48. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju *Myriophyllum spicatum*'i vegetatiivsele kasvule. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud kahte uuritavat muutujat.
- a) Keskmine kasvu erikiirus: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt peavõrse pikkuse logaritmi ja teiste mõõdetavate muutujate, st võrsete summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi ja männaste arvu logaritmitud väärtuse ööpäevasest muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas. *Märkus*: mõõdetavad parameetrid külgharude summaarne pikkus ja juurte summaarne pikkus ei võimalda arvutada keskmist kasvu erikiirust. Katse alguses ei ole katseorganismil külgharusid ega juuri (tulenevalt eelkultuuri taimede ettevalmistamise viisist); kasvu keskmise erikiiruse arvutamisel ei saa lähtuda algväärtusest null.
- b) Saagis: see uuritav muutuja arvutatakse lähtuvalt katse lõpuks toimunud peavõrse pikkuse ja teiste mõõdetavate muutujate – st soovitatavalt võrsete summaarse pikkuse, märgmassi ja kuivmassi või männaste arvu ning soovi korral ka muude parameetrite – väärtuse muutusest kontrollkultuurides ja igas uuritava kemikaaliga rühmas.
49. Mürgisuse hindamisel tuleks lähtuda peavõrse pikkusest ja veel kolmest mõõdetavast muutujast (st soovitatavalt võrsete summaarsest pikkusest, märgmassist ja kuivmassist või männaste arvust; vt punkt 37 ning selle punkti märkused 2, 4 ja 5), sest mõni kemikaal võib mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju enam kui peavõrse pikkust. Ainult peavõrse pikkuse vaatlemisel jääks selline mõju avastamata.

*Keskmine kasvu erikiirus*

50. Iga kontrollkultuuri ja uuritava kemikaaliga kultuuri puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus kasvu iseloomustavate muutujate – peavõrse pikkuse ja veel kolme mõõdetava muutuja (st võrsete summaarse pikkuse, märgmassi ja kuivmassi või männaste arvu) – logaritmitud väärtuse suurenemise alusel järgmise valemi abil:

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

kus

$\mu_{i-j}$  on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul i–j,

$N_i$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel i,

$N_j$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel j ja

t on ajavahemik i–j.

▼ M7

Kontrollrühma ja iga katserühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja tulemuste hajuvus.

51. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseperioodi kohta (eespool esitatud valemis vastab katse algusele ajahetk *i* ja katse lõpule ajahetk *j*). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse kasvu keskmise erikiiruse keskvärtus ja tulemuste hajuvus. Peale selle hinnatakse kasvukiirust ka ajavahemike kaupa, näiteks logaritmitud kasvu-kõverate uurimise teel, et hinnata uuritava kemikaali mõju kokkupuuteaja jooksul.
52. Seejärel võib iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutada kasvukiiruse vähenemise  $I_r$  protsentides järgmise valemi abil:

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

kus

$\% I_r$  on kasvu keskmise erikiiruse vähenemise määr protsentides,

$\mu_C$  on  $\mu$  keskvärtus kontrollrühmas ja

$\mu_T$  on  $\mu$  keskvärtus katserühmas.

*Saagis*

53. Kemikaali mõju saagisele määratakse lähtuvalt peavõrse pikkusest ja veel kolmest mõõdetavast muutujast (st soovitatavalt võrsete summaarsest pikkusest, märgmassist ja kuivmassist või männaste arvust), mis määratakse igas katsekultuuris katse alguses ja lõpus. Märgmassi ja kuivmassi algväärtus määratakse katseorganismide proovi alusel, mis võetakse katsenõude inokuleerimiseks kasutatavast partiist. Kontrollrühmas ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse keskmine saagis ning tulemuste hajuvus. Saagise vähenemise määra protsentides ( $\% I_y$ ) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

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

kus

$\% I_y$  on saagise vähenemise määr protsentides,

$b_c$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas ja

$b_T$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

*Peavõrse pikkuse kahekordistumise aeg*

54. Peavõrse pikkuse kahekordistumise aja  $T_d$  leidmiseks ja katse sellekohase nõuetele vastavuse kriteeriumi täitmise kindlakstegemiseks (vt punkt 8) kasutatakse kontrollkultuuridest saadud andmeid ja järgmist valemit:

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

kus  $\mu$  on punktides 50–52 kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

▼ **M7****Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine**

55. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (punkti 53 kohaselt arvatud %  $I_r$  või %  $I_y$ ) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

**EC<sub>x</sub> leidmine**

56. EC<sub>x</sub> hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest ( $E_r C_x$ ) kui ka saagisest ( $E_y C_x$ ), mis peaksid kumbki omakorda põhinema peavõrse pikkusel ja võimaluse korral täiendavatel mõõdetavatel muutujatel (st soovitatavalt võrsete summaarsel pikkusel, märgmassil ja kuivmassil või männaste arvul). Selle põhjuseks on asjaolu, et teatavad kemikaalid mõjutavad peavõrse pikkust ja muid mõõdetavaid muutujaid erinevalt. Määratavad mürgisuse näitajad igal arvataval kasvu pidurdumise tasemel  $x$  on seega neli EC<sub>x</sub> väärtust:  $E_r C_x$  (peavõrse pikkus),  $E_r C_x$  (soovitatavalt võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv),  $E_y C_x$  (peavõrse pikkus),  $E_y C_x$  (soovitatavalt võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv).
57. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja puhul arvatud EC<sub>x</sub> väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust võetakse katsetulemuste kasutamisel arvesse. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC<sub>x</sub> väärtused ( $E_r C_x$ ) enamikul juhtudel suuremad kui saagisel põhinevad väärtused ( $E_y C_x$ ), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad.

**Statistilised meetodid**

58. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks vastavalt probit-, logit- või Weibulli mudelile (7), kuid tuleks siiski eelistada mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (7). Tuleks silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleks kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid EC<sub>x</sub> väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud viidetes 8–10.
59. Iga uuritava muutuja puhul arvatatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal EC<sub>x</sub> hinnanguline väärtus. Võimaluse korral tuleks määrata iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskvärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.
60. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC<sub>50</sub> hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (10).
61. Et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja selle alusel ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, on vaja võrrelda katserühmade keskvärtusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskvärtust võrreldakse seejärel sobiva mitmese võrdluse või trenditesti meetodi abil kontrollrühma keskvärtusega. Selleks võib sobida Dunnetti või Williamsi test (12–16). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et hajuvus on homogeenne. Seda võib teha graafiku alusel või formaalse testi (15), näiteks Levene'i või

▼ **M7**

Bartletti testi abil. Kui hajuvuse homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord homogeensuse saavutada andmete logaritmilise teisendamisega. Kui hajuvuse heterogeensus on väga suur ja seda ei saa teisendamisega korrigeerida, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i trenditesti kasutamist. Lisajuhised tähtsate toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks on esitatud viites 10.

62. Uute teadussaavutuste põhjal on soovitatud loobuda tähtsate toime puudumise kontsentratsiooni mõistest ja asendada see regressiooni teel leitud hinnangulise näitajaga  $EC_x$ . Käesoleva *Myriophyllum*'it käsitleva katsemetodi jaoks ei ole sobivat  $x$  väärtust veel kindlaks määratud. Sobiv väärtuste vahemik näib olevat 10–20 % (olenevalt uuritavast muutujast) ning soovitatavalt tuleks esitada nii  $EC_{10}$  kui ka  $EC_{20}$  koos vastavate usalduspiiridega.

**Katseprotokoll**

63. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

*Uuritav kemikaal:*

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused.

*Katseliik:*

- teaduslik nimetus ja päritolu.

*Katsetingimused:*

- kasutatud katsemetod (staatiline või poolstaatiline meetod);
- katse alustamise kuupäev ja katse kestus;
- katsesõode;
- katseplaani kirjeldus: katsenõud ja nende katted, lahuste ruumala, peavõrse pikkus katsenõudes katse alguses;
- kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja vajaduse korral mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;
- põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;
- katsetemperatuur;
- valgusallikas, valgustihedus ja valguse ühtlus;
- katse- ja kontrollsõotmete pH väärtused;
- uuritava kemikaali määramise meetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed või usalduspiirid);



▼ M7

- peavõrse pikkuse ja muude mõõdetavate muutujate, näiteks külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu määramise meetodid;
- kultuuri staatus (steriilne või mittesteriilne) igas katse- ja kontrollnõus iga vaatluse ajal;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

*Tulemused:*

- töötlemata andmed: peavõrse pikkus ja muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga vaatluse ja analüüsi ajal;
- iga mõõdetava muutuja keskväärtused ja standardhälbed;
- igale mõõdetavale muutujale vastavad kasvukõverad;
- uuritavate muutujate arvatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskväärtused ja variatsioonikordajad;
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;
- uuritavate muutujate puhul määratud mürgisuse lõppnäitajad – nt EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub> – ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja/või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määr, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);
- katserehma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;
- kõik nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;
- tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

## KIRJANDUS

- (1) ASTM. Standard E 1913-04. Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D., et al. (2010). *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* 22: 702–710.
- (3) Käesoleva lisa peatükk C.26 „Perekonna *Lemna* taimede kasvu pidurdumise katse“.
- (4) OECD (2014). *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 205. OECD Publishing, Pariis.
- (5) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 23. OECD Publishing, Pariis.
- (6) Käesoleva lisa peatükk C.51 „Mürgisuse hindamise katse *Myriophyllum spicatum*'iga süsteemis vesi/sete“.

▼ M7

- (7) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 18 (9): 713–718.
- (8) Nyholm, N., *et al.* (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (2): 157–167.
- (9) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (10): 1485–1494.
- (10) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54. OECD Publishing, Pariis.
- (11) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The IC<sub>p</sub> approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.
- (12) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (272): 1096–1121.
- (13) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 (3): 482–491.
- (14) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27 (1): 103–117.
- (15) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28 (2): 519–531.
- (16) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29 (2): 93–96.

▼ M7

## 1. liide

## MÕISTED

**Biomass** – populatsiooni elusaine märgmass ja/või kuivmass. Käesoleva katsemeetodi puhul on biomass peavõrse, kõikide külgharude ja kõikide juurte summaarne mass.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kloroos** – katseorganismi, eriti männaste rohelise värvuse muutumine kollakaks.

**EC<sub>x</sub>** – katesöötmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Myriophyllum spicatum*'i kasv pidurdub kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul x % (nt 50 %) võrra (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E<sub>r</sub>C“ ja saagise puhul tähist „E<sub>y</sub>C“, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt „E<sub>r</sub>C (peavõrse pikkus)“.

**Kasv** – mõõdetava muutuja (nt peavõrse pikkuse, külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu) väärtuse suurenemine katse vältel.

**Kasvukiirus** (keskmine kasvu erikiirus) – mõõdetava muutuja väärtuse logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul. *Märkus*: kasvukiirusega seotud uuritavad muutujad ei sõltu katse kestusest, kuni kemikaaliga mitte kokku puutuvate kontrollorganismide kasv on eksponentsiaalne.

**Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon** – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud.

**Mõõdetav muutuja** – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva katsemeetodi puhul on mõõdetavad muutujad peavõrse pikkus, külgharude summaarne pikkus, võrsete summaarne pikkus, juurte summaarne pikkus, märgmass, kuivmass ja männaste arv.

**Monokultuur** – ühe liigi taimede kultuur.

**Nekroos** – protsess, mille tagajärjel tekib katseorganismi surnud (st valge või tumepruun) kude.

**Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon** – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

**Uuritav muutuja** – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on leitud biomassi kirjeldava mõõdetud muutuja alusel vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis on leitud selliste mõõdetavate muutujate alusel nagu peavõrse pikkus, võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv.

**Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse** – katse, mille käigus katselohus teatavate ajavahemike järel perioodiliselt välja vahetatakse.

**▼ M7**

**Staatiline katse** – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Katse lõppnäitaja** – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

**Katsesööde** – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**Saagis** – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mille kaudu väljendatakse biomassi suurenemist katse vältel. *Märkus:* kui kemikaaliga mitte kokku puutuvate organismide kasv on eksponentsiaalne, muutub saagisel põhinevate uuritavate muutujate väärtus katse vältel väiksemaks.

▼ **M7**

## 2. liide

**MUDETUD ANDREWSI SÖÖDE TÜVIKULTUURI JA EELKULTUURI JAOKS**

Tüvikultuuri ja eelkultuuri jaoks vajalik muudetud Andrews'i sööde valmistatakse viiest eraldi valmistatud toitaine põhilahusest, millele lisatakse 3 % sahharoosi.

Tabel 1

**Andrews'i söötme koostis (ASTMi standard E 1913-04)**

Toitainete põhilahuste valmistamine			Söötme valmistamine
Põhilahus	Kemikaal	Algkogus 1 000 ml kohta	Milliliitrit 5 l söötme kohta
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO <sub>3</sub>	8,08 g	
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	18,88 g	
2	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	9,86 g	50
3	Vt põhilahus 3.1 allpool		50
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g	50
5	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,278 g	50
	Na <sub>2</sub> EDTA × 2H <sub>2</sub> O	0,372 g	

Põhilahuseid võib hoida külmikus (5–10 °C juures) 6 kuud. Üksnes põhilahuse nr 5 säilivusaeg on lühem (kaks kuud).

Tabel 2

**Põhilahuse nr 3.1 valmistamine põhilahuse nr 3 jaoks**

Kemikaal	Algkogus grammides 100 ml kohta
MnSO <sub>4</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,223
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,115
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,155
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,0125
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,0037

Pärast põhilahuse nr 3.1 valmistamist (tabel 2) sügavkülmutatakse see umbes 11 ml suuruste alikvootidena (vähemalt –18 °C juures). Sügavkülmutatuna säilib lahus viis aastat.

Põhilahuse nr 3 valmistamiseks sulatakse põhilahus nr 3.1, viiakse 10 ml sellest 1-liitrisesse mõõtekolbi ja lisatakse ultrapuhast vett kuni kolvi mõõtemärgini.

Muudetud Andrews'i söötme valmistamiseks lisatakse 5-liitrisesse mõõtekolbi umbes 2 500 ml ultrapuhast vett. Pärast 50 ml iga põhilahuse lisamist täidetakse mõõtekolb 90 % ulatuses ultrapuhta veega ja reguleeritakse pH väärtusele 5,8.

**▼M7**

Seejärel lisatakse 150 g lahustatud sahharoosi (3 protsenti 5 liitris lahuses) ja mõõtekolb täidetakse mõõtemärgini ultrapuhhta veega. Lõpuks viiakse sööde 1-liitristesse Schotti kolbidesse ja seda autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures.

Nii saadud söödet saab säilitada külmikus (5–10 °C juures) steriilsena kolm kuud.

**Muudetud Andrews si sööde settevaba mürgisuskatse jaoks**

Tabelites 1 ja 2 nimetatud viiest toitaine põhilahusest valmistatakse katselahuste saamiseks vajalik kümnekordselt kontsentreeritud muudetud Andrews si sööde, mis sisaldab täiendavalt 30 % sahharoosi. Selleks lisatakse 1-liitrisesse mõõtekolbi umbes 100 ml ultrapuhast vett. Pärast 100 ml iga põhilahuse lisamist reguleeritakse pH väärtusele 5,8. Seejärel lisatakse 30 % lahustatud sahharoosi (300 grammi 1 000 ml kohta) ja mõõtekolb täidetakse mõõtemärgini ultrapuhhta veega.

Lõpuks viiakse sööde 0,5-liitristesse Schotti kolbidesse ja seda autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures.

Nii saadud kümnekordselt kontsentreeritud muudetud söödet saab säilitada külmikus (5–10 °C juures) steriilsena kolm kuud.

▼ M7

## 3. liide

## TÜVIKULTUURI SÄILITAMINE

Käesolevas 3. liites on kirjeldatud perekonda vesikuusk kuuluva kaheidulehelise veesise liigi *Myriophyllum spicatum* L. <sup>(1)</sup> tüvikultuuri. Ajavahemikul juunist augustini ilmuvad veepinna kohale silmatorkamatud roosakasvalged õied. Taimed on juurdunud tugevate risoomide süsteemi abil ja neid võib leida kogu põhjapoolkeral eutroofsetes, kuid saastumata ja lubjarikkamates mudase põhjaga seisuveekogudes. *Myriophyllum spicatum* eelistab magevett, kuid võib esineda ka riimvees.

Settevaba katse puhul laboritingimustes kasutatava tüvikultuuri jaoks on vaja steriilseid taimi. Steriilsed taimed on kättesaadavad Saksamaa Keskkonnaameti (Umweltbundesamt) ökotoksikoloogialaborist.

Teise võimalusena võib katseorganismid saada mittesteriilsetest taimedest vastavalt ASTMi standardile E 1913-04. Allpool on esitatud väljavõte ASTMi standardjuhendist, milles käsitletakse loodusest kogutud *Myriophyllum sibiricum*'i kultiveerimise meetodit.

„Kui kultiveerimist alustatakse loodusest kogutud mittesteriilsete taimedega, kogutakse sügisel *M. sibiricum*'i sigipungad. Sigipungad viiakse 20-liitrisesse akvaariumi, milles on 5 cm paksune steriilse sette kiht, mis on kaetud räniliivaga või näiteks tootega Turface<sup>®</sup> ja 18 liitri analüütilise puhtusastmega veega. Akvaariumi aereeritakse ja hoitakse temperatuuril 15 °C ning valguse vootihedust hoitakse 16 tunni vältel päevas väärtusel 200–300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Taimekultuuri võib akvaariumis säilitada taimede varuallikana, mida saab kasutada juhul, kui steriilsed taimekultuurid hävivad kasvukambri mehaanilise rikke või saastuse tõttu või mõnel muul põhjusel. Akvaariumis kasvatatavad taimed ei ole steriilsed ja steriilseid kultuure ei saa säilitada mittepidevas kultiveerimissüsteemis. Kultuuri steriliseerimiseks eemaldatakse taimed akvaariumist ja loputatakse neid umbes 0,5 tundi voolava deioniseeritud vee all. Taimede desinfitseerimiseks hoitakse neid laminaarkapis aseptilistes tingimustes vähem kui 20 minuti vältel (kuni enamik taimekudedest on pleekinud ja ainult kasvukuhik on veel roheline) lahuses, mis sisaldab 3 % (massiühikutes mahuühiku kohta) naatriumhüpokloriiti ja 0,01 % sobivat pindaktiivset ainet. Desinfitseerimisvahendit ja taimset materjali loksutatakse. Mitut varresõlme sisaldavad segmendid viiakse steriilsetesse kultiveerimiseks kasutatavatesse katseklaasidesse, mis sisaldavad 45 ml steriliseeritud muudetud Andrews'i söödet ja on kaetud tavalise katseklaasikorgiga. Igasse katsekambris viiakse ainult üks taimesegment. Kultiveerimise nõu korgi kinnitamiseks kasutatakse laboratoorset tihenduskiilet. Pärast steriilse kultuuri loomist tuleks mitut varresõlme sisaldavad taimesegmendid viia iga kümne kuni kaheistkümnepäeva järele üle uutesse värsket vedelsöödet sisaldavatesse katsekambritesse. Katse alustamiseks peavad taimed püsima katsele eelneva kaheksa nädala vältel steriilsed; seda tõendatakse agariga tassidel kultiveerimise teel.“

Kuna muudetud Andrews'i sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab seente ja bakterite kasvu), tuleb kõiki materjale ja lahuseid hoida steriilsena ning viia kultiveerimine läbi steriilsetes tingimustes. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga (210 °C) või autoklaavitakse 20 minutit 121 °C juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.

Tüvikultuure võib säilitada pikemat aega vähendatud valgustiheduse ja madalama temperatuuri juures (50 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 20 ± 2 °C), ilma et neid oleks vaja uuendada.

<sup>(1)</sup> Carl von Linné (sünd. 23. mail 1707 Råshultis/Älmhultis, surn. 10. jaanuaril 1778 Uppsalas).

▼ **M7**

*Myriophyllum*'i tüvikultuuride sööde peaks olema sama, mida kasutatakse katsetes; võib siiski kasutada ka muid toitainerikkaid söötmeid.

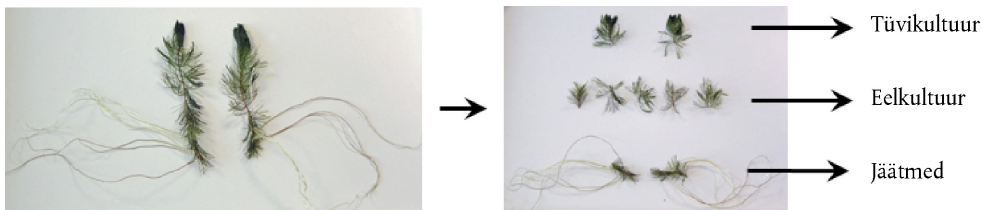
Taimesegmendid jaotatakse puhaskultuurina mitmesse 500 ml Erlenmeyeri kolbi ja/või 2 000 ml Fernbachi kolbi, milles on vastavalt umbes 450 või 1 000 ml muudetud Andrews'i söödet. Seejärel suletakse kolvid steriilselt tsellulooskorgiga.

Peale selle on vältimatult vajalik töödelda seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual põhjalikult leegiga. Taimed tuleb nende arvust ja suuruselt olenevalt viia umbes iga kolme nädala järel üle värskesse söötmesse.

Sel viisil kultuuri uuendamiseks võib kasutada nii võrse tippu kui ka varre keskosa segmente. Üle viidavate taimede (või taimesegmentide) arv ja suurus sõltub vajaminevate taimede arvust. Näiteks võib ühte Fernbachi kolbi viia viis võrsesegmenti ja ühte Erlenmeyeri kolbi kolm võrsesegmenti pikkusega 5 cm. Juurtega, õitsevaid, surnud või muidu silmatorkavad osad kõrvaldatakse.

Joonis 1

**Taimede lõikamine tüvikultuuri ja eelkultuuri jaoks pärast 3 nädala pikkust kultiveerimist**



Taimi kultiveeritakse 500 ml Erlenmeyeri kolbides ja 2 000 ml Fernbachi kolbides jahutusega inkubaatoris  $20 \pm 2$  °C juures muutumatul valgustihedusel umbes  $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (6 000–9 000 luks); kambri valguse värvustemperatuur peaks vastama soealge valguse spektrile.

Joonis 2

**Taimede kultiveerimine valgustuse ja jahutusega inkubaatoris**



Tuleks kasutada keemiliselt puhtaid (happega pestud) steriilseid klaasist kultiveerimisnõusid ja aseptilisi käitlemismeetodeid. Tüvikultuuri saastumisel näiteks vetikate, seente ja/või bakteritega tuleks luua uus kultuur või kasutada kultuuri uuendamiseks mõne muu labori tüvikultuuri.



▼ **M7**

## 4. liide

**EELKULTUURI KASVATAMINE JA KATSEORGANISMIDE ETTEVALMISTAMINE KATSEKS**

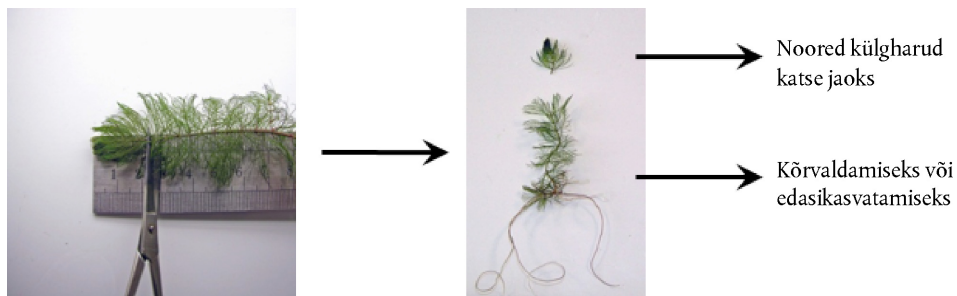
Eelkultuuri saamiseks lõigatakse tüvikultuuri võrsed kahe männasega segmentideks ning segmentid viiakse Fernbachi kolbidesse, mis on täidetud muudetud Andrews'i söötmega (sisaldab 3 % sahharoosi). Igasse kolbi võib viia kuni 50 võrsesegmenti. Tuleks siiski jälgida, et kõnealused segmentid oleksid elujõulised ja neil ei esineks juuri, külgharusid ega nende pungasid (vt 3. liite joonis 1).

Eelkultuuri organisme kasvatatakse 14–21 päeva kasvukambris steriilsetes tingimustes valgustusrežiimil 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Valitud valgustihedus peaks jääma vahemikku  $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Temperatuur katsenõudes peaks olema  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Kuna muudetud Andrews'i sööde sisaldab sahharoosi (mis soodustab vetikate, seente ja bakterite kasvu), tuleks kasutada uuritava kemikaaliga lahuste valmistamisel ja kultiveerimise ajal steriilseid tingimusi. Enne kasutamist steriliseeritakse kõik vedelikud ja seadmed. Selleks töödeldakse neid 4 tunni vältel kuuma õhuga ( $210 \text{ }^\circ\text{C}$ ) või autoklaavitakse 20 minutit  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  juures. Peale selle töödeldakse kõiki kolbe, nõusid, kausse jms ning muid seadmeid vahetult enne kasutamist steriilsel töölaual leegiga.

Võrsed eemaldatakse puhaskultuurina eelkultiveerimiskolbideist; valitav materjal peaks olema võimalikult homogeenne. Iga katse jaoks on vaja vähemalt 60 katseorganismi (kaheksal uuritava kemikaali kontsentratsioonil tehtava katse puhul). Eelkultuurist võetakse katse jaoks noored külgharud, lõigatakse need otsast joonlauaga mõõdetuna 2,5 cm pikkuseks ja viiakse steriilset muudetud Andrews'i söödet sisaldavasse keeduklaasi. Neid noori külgharusid võib kasutada settevabas mürgisuskatsetes *Myriophyllum spicatum*'iga.

## Joonis 2

**Eelkultuuri taimede lõikamine *Myriophyllum spicatum*'iga tehtava settevaba mürgisuskatse jaoks**

▼ M7C.51. Mürgisuse hindamise katse *Myriophyllum spicatum*'iga süsteemis vesi/sete

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 239 (2014). On olemas katsemeetodid üheiduleheliste ujutaimede perekonna *Lemna* liikide jaoks (1) ja vetikaliikide jaoks (2). Neid meetodeid kasutatakse igapäevaselt selliste andmete saamiseks, mis võimaldavad hinnata uuritava- test kemikaalidest, eriti herbitsiidse toimega kemikaalidest tulenevat riski muudele veetaimedele kui sihtliigid. Mõnel juhul võib siiski olla vaja andmeid teistegi makrofüüdiliikide kohta. Keskkonnatoksikoloogia ja -keemia Ühingu (SETAC) seminari põhjal, kus käsitleti pestitsiididest tuleneva makrofüütidele avalduva riski hindamist, avaldati hiljuti suunised, mille kohaselt võib olla vaja esitada mõnda juurdunud makrofüüdiliiki käsitlevad andmed selliste kemikaalide kohta, mille toimemehhanismi suhtes *Lemna* ja vetikad ei ole teadaolevalt tundlikud või mille puhul teeb muret kemikaali kogunemine settesse ja sellest tulenev kokkupuude juurte kaudu omastamisel (3). Praeguste teadmiste ja kogemuste põhjal valiti eelistatud liikideks *Myriophyllum*'i liigid, mida tuleks kasutada juhul, kui on vaja andmeid juurdunud veesisese kaheidulehelise liigi kohta (4–6). Käesolev katsemeetod ei asenda muid veekeskkonnas avalduva mürgisuse hindamise meetodeid, vaid pigem täiendab neid ja võimaldab täielikumalt hinnata ohte ja riske veetaimedele. Käesolev süsteemis vesi/sete kasutatav *Myriophyllum spicatum*'il põhinev katsemeetod täiendab settevabas süsteemis *Myriophyllum spicatum*'ile avalduva mürgisuse hindamise meetodit (7).
  
2. Käesolevas dokumendis on kirjeldatud katsemeetodit, mis võimaldab hinnata uuritava kemikaali mõju juurdunud veetaimele *Myriophyllum spicatum*, mis kasvab süsteemis vesi/sete. Meetod põhineb osaliselt olemasolevatel meetoditel (1, 2, 8) ja selles võetakse arvesse veetaimedele avalduva riski hindamisega seotud hiljutisi teadusuuringuid (3). Süsteemile vesi/sete tuginev meetod on valideeritud rahvusvahelise võrdlusuuringuga, kus staatilistes tingimustes kasvatatud *Myriophyllum*'i liigid viidi uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kemikaali veesambasse lisamise teel (9). Seda katsesüsteemi saab aga hõlpsalt kohandada rikastatud sette kaudu kokkupuute jaoks, samuti veefaasi kaudu kokkupuute jaoks poolstaatilises või impulssdoseerimise režiimis, ehkki nende režiimide puhul ei ole tehtud ametlikku võrdlusuuringut. Peale selle võib kõnealust üldmeetodit kasutada muude juurdunud veesiseste ja üle veepinna ulatuvate liikide, sealhulgas teiste *Myriophyllum*'i liikide (nt *Myriophyllum aquaticum*'i) ja *Glyceria maxima* puhul (10). Muude liikide kasutamise korral võib olla vaja muuta katsetingimusi, katseplaani ja katse kestust. Eelkõige on vaja teha tööd asjakohase metoodika määratlemiseks *Myriophyllum aquaticum*'i jaoks. Käesolevas katsemeetodis ei käsitleta üksikasjalikult neid lisavõimalusi, vaid kirjeldatakse standardset lähenemisviisi, mis põhineb *Myriophyllum spicatum*'i kokkupuutel staatilises süsteemis veefaasi kaudu.
  
3. Käesolevat katsemeetodit kohaldatakse ainete puhul, mille jaoks see on valideeritud (üksikasjalik teave on esitatud võrdlusuuringu aruandes (9)), ning valmististe ja teadaolevate segude puhul. *Myriophyllum*'iga katse võib teha esimese taseme andmenõuete täitmiseks tulenevalt võimalikest probleemidest seoses uuritava kemikaali kogunemisega settesse või selle toimemehhanismiga/selektiivsusega. Samuti võib laborikatse *Myriophyllum*'iga olla nõutav osana kõrgema taseme strateegiast, milles käsitletakse veetaimedele avalduva riskiga seotud küsimusi. Kokkupuuteviis (st vee kaudu või sette kaudu) valitakse lähtuvalt katse tegemise konkreetselt eesmärgist. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas ja kuidas see meetod võimaldab saada taotletava eesmärgi jaoks vastu võetavad tulemused. Seda ei ole vaja kaaluda, kui asjaomase segu hindamine on regulatiivse nõudega ette nähtud.

▼ M7

## KATSE PÕHIMÕTE

4. Katses hinnatakse kemikaaliga seotud mõju standardses keskkonnas (vesi, sete ja toitained) kasvavate *Myriophyllum*'i isendite vegetatiivsele kasvule. Selleks istutatakse tervete mitteõitsevate taimede võrsetipud standarditud kunstlikku settesse, millele on taimede piisava kasvu tagamiseks lisatud täiendavad toitained, ja kasvatatakse neid Smarti ja Barko söötmes (1. liide). Pärast juurte tekkeks vajalikku kohanemisperioodi viiakse taimed kokkupuutesse veesambasse eri kontsentratsioonides lisatud uuritava kemikaaliga. Teise võimalusena võib settekaudse kokkupuute jälgendamiseks rikastada uuritava kemikaaliga kunstlikku setet ja istutada taimed ümber rikastatud settesse. Kummalgi juhul kasvatatakse taimi seejärel kontrollitud keskkonningimustes 14 päeva. Kasvule avalduva mõju kindlakstegemiseks hinnatakse kvantitatiivselt võrsete pikkust, märgmassi ja kuivmassi ning tehakse kvalitatiivseid vaatlusi selliste sümptomite nagu kloroosi, nekroosi ja väärarengute tuvastamiseks.
5. Kemikaali mõju kvantitatiivseks hindamiseks võrreldakse kasvu katselahuses kontrolltaimede kasvuga ning tehakse kindlaks kontsentratsioon, mille juures kasv pidurdub teatud kindla protsendi  $x$  võrra; seda kontsentratsiooni väljendatakse kujul  $EC_x$ , kus  $x$  võib olla regulatiivsetest nõuetest sõltuvalt mis tahes väärtusega – nt  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  või  $EC_{50}$ . Tuleks tähele panna, et  $EC_{10}$  ja  $EC_{20}$  hinnanguline väärtus on usaldusväärne ja asjakohane üksnes sellise katse puhul, kus kontrolltaimi iseloomustav variatsioonikordaja on hinnatava mõju ulatusest väiksem; see tähendab, et  $EC_{20}$  usaldusväärseks hindamiseks peaks variatsioonikordaja olema  $< 20\%$ .
6. Töödeldud ja töötlemata taimedel tuleks määrata nii keskmine kasvu erikiirus kui ka saagis (kumbagi näitajat hinnatakse võrsete pikkuse, võrsete märgmassi ja võrsete kuivmassi alusel). Leitud kasvu erikiirust ( $r$ ) ja saagist ( $y$ ) kasutatakse vastavalt  $E_r C_x$  (nt  $E_r C_{10}$ ,  $E_r C_{20}$ ,  $E_r C_{50}$ ) ja  $E_y C_x$  (nt  $E_y C_{10}$ ,  $E_y C_{20}$ ,  $E_y C_{50}$ ) määramiseks.
7. Vajaduse korral võib kasvu keskmise erikiiruse ja saagise hinnangulise väärtuse põhjal teha statistiliselt kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni ja täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni.

## TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

8. Analüüsimeetod uuritava kemikaali sisalduse määramiseks katsesöötmes peaks olema piisava tundlikkusega.
9. Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava kemikaali kohta olla kasulik teada muu hulgas järgmisi andmeid: struktuurivalem, mitut koostisosa sisaldava aine, UVCB, segu või valmistise puhul koostis, puhtus, lahustuvus vees, püsivus vees ja valguse käes, happe dissotsiatsioonikonstant ( $pK_a$ ), jaotuskoefitsient süsteemis oktanool/vesi ( $K_{ow}$ ), võimaluse korral settesse kogunemist iseloomustav  $K_d$ , aururõhk ja biolagundatavus. Vees lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas uuritava kemikaali märkimisväärne kadu katse ajal on tõenäoline. Kui kemikaali kadu on tõenäoline, tuleks kadu kvantifitseerida ja dokumenteerida järgnevad sammud kao vähendamiseks. Kui puuduvad kindlad andmed uuritava kemikaali lahustuvuse ja püsivuse kohta, soovitatakse hinnata neid omadusi katses kasutatavates tingimustes, st samas söötmes ning sama temperatuuri ja valgusrežiimi juures. Märkus: kui katses uuritakse valguse toimel peroksüdeerivat herbitsiidi, peaks laboris kasutatava valguse spekter hõlmama ultraviolettkiirgust samal määral, nagu seda esineb looduslikus päikesekiirguses.

▼ **M7**

10. Tuleks mõõta katsesöötmelise pH ja seda vastavalt vajadusele reguleerida. Katsesöötmelise pH reguleerimine on eriti oluline näiteks juhul, kui analüüsitakse metalle või kergesti hüdrolüüsuvaid kemikaale. Täiendavad juhised selliste kemikaalide mõju hindamiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad nende uurimist, on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (11).

**KATSE NÕUETEKOHASUS**

11. Katsetulemused vastavad nõuetele, kui kontrollitaimede võrsete keskmine summaarne pikkus ja keskmine summaarne märgmass suurenevad katse kokkupuuteperioodi jooksul vähemalt kaks korda. Peale selle ei tohi kontrollitaimedel olla näha mingeid kloroosi sümptomeid ning taimed, sette pind ja katsesööde ei tohi olla nähtavalt saastunud muude organismidega, näiteks vetikatega ja/või bakterite kihiga.
12. Võrsete märgmassi (st katse alguses ja katse lõpus saadud väärtuste) alusel arvatud saagise keskmine paralleelkultuuride vaheline variatsioonikordaja ei tohi kontrollrühmas olla suurem kui 35 %.

**VÕRDLUSKEMIKAAL**

13. Katsemetodi töökindluse perioodiliseks kontrollimiseks tuleks kasutada ühte või mitut võrdluskemikaali, näiteks võrdlusuuringus (9) kasutatud 3,5-diklorofenooli. Võrdlusuuringu andmete põhjal jäävad 3,5-diklorofenooli EC<sub>50</sub> keskvaartused eri uuritavate muutujate puhul vahemikku 4,7–6,1 mg/l (üksikasjalik teave nende väärtuste eeldatava usaldusvahemiku kohta on esitatud võrdlusuuringu aruandes). Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või kui katseid tehakse harva, siis mürgisuse hindamise lõpliku katsega samaaegselt. Juhised seoses 3,5-diklorofenooli eeldatavate EC<sub>50</sub> väärtustega on esitatud rahvusvahelise võrdlusuuringu statistikaaruandes (9).

**MEETODI KIRJELDUS****Katseseadmed**

14. Katse tuleks läbi viia kontrollitavates keskkonnatingimustes, st reguleeritava valgustuse, päeva pikkuse ja temperatuuriga kasvukambris, kasvatusruumis või laboris (vt jaotis „Katsetingimused“: punktid 56–58). Tüvikultuure tuleks hoida katsenõudest eraldi.
15. Katses tuleks kasutada klaasist katsenõusid, näiteks akvaariume või keeduklaase; tavapäraselt kasutatakse 2-liitrisid keeduklaase (kõrgusega umbes 24 cm ja läbimõõduga umbes 11 cm). Võivad sobida ka muud (st suuremad) nõud, kui vesi on neis piisavalt sügav, et võimaldada taimedel katse vältel piiramatult kasvada, ilma et need veest välja ulatuksid.
16. Taimede settesse istutamise jaoks võib kasutada plastist või klaasist taimepotte (kõrgusega umbes 9 cm, läbimõõduga umbes 8 cm ja mahuga umbes 500 ml). Teise võimalusena võib kasutada keeduklaase, mis on mõnel juhul (nt hüdrofoobsete või suure K<sub>ow</sub>-ga kemikaalide puhul) soovitatavad.
17. Katsenõude ja eelistatud katseplaani (vt allpool) valimise kõrval on vaja pöörata tähelepanu ka õige suurusega poti või keeduklaasi valimisele. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) võib olla vaja kasutada väiksemaid potte. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) peaksid sobima eespool nimetatud suurusega potid ja nõud. Sette kohal oleva vee minimaalne sügavus peaks kõikidel juhtudel olema 12 cm ning tuleks registreerida sette pindala/ruumala ja vee pindala/ruumala suhe.

▼ **M7****Katseorganism**

18. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud üldist lähenemisviisi saab kasutada mitme eri veetaimede liigi puhul. Meetodis sätestatud tingimused on aga välja töötatud vesikuuse liigi *Myriophyllum spicatum*'i jaoks. Nimetatud liik kuulub kaheiduleheliste taimede sugukonda *Haloragaceae*.
19. *Myriophyllum spicatum* (tähk-vesikuusk) on veesisene juurdunud liik, mis talub väga erinevaid tingimusi ja mida leidub nii staatilistes kui ka voolava veega veekogudes. *M. spicatum* on mitmeaastane taim, millest säilivad ületalve vaid juured. Taimed õitsevad ja nende seemned valmivad vabalt, kuid sageli toimub levimine eelkõige vegetatiivse paljunemise teel kaenlapungade abil või varretükkidega, mis eralduvad loomulikult teel või häirimise järgselt.

*Katseorganismi kultiveerimine*

20. Taimed võib saada looduslikust populatsioonist või veetaimede tarnija kaudu. Kummalgi juhul tuleks taimede päritolu dokumenteerida ja viia läbi liigi kinnitav määramine. *Myriophyllum spicatum*'i kogumisel loodusest tuleks hoolega jälgida, et võetakse õige liigi taimed, eriti piirkonnas, kus see liik võib hübriidiseeruda teiste *Myriophyllum*'i liikidega. Kahtluse korral soovitatakse kasutada teadaoleva päritolu ja tõendatud liigilise kuuluvusega laborikultuure. Katses ei tohiks kasutada taimi, mis on olnud kokkupuutes mis tahes keemilise saasteainega või mille kogumiskoht on teadaolevalt saastunud.
21. Piirkonnas, kus *M. spicatum* ei ole talvekuudel hõlpsalt kättesaadav, võib olla vaja säilitada tüvikultuuri pikaajaliselt kasvuhoones või laboritingimustes. Tüvikultuure tuleks säilitada tingimustes, mis sarnanevad katsetingimustele, kuid kiirgustihedus võib olla väiksem ja temperatuur madalam, et vähendada kultuuri hooldamissagedust (nt kui teatava perioodi jooksul ei ole kavandatud katseid *Myriophyllum*'iga). Kasvuruumi jätmiseks soovitatakse kasutada suuremaid akvaariume ja taimepotte kui katses. Sette ja veekeskonna koostis peaks olema sama kui katses, kuid sette väetamiseks võib rakendada teistsugust meetodit (nt kasutada kaubanduslikku aeglase vabanemisega väetist).
22. Tüvikultuuri taimed ei tohiks olla nähtavalt saastunud ühegi muu organismiga, sealhulgas tigude, niitvetikate, seente või putukatega, näiteks ööliblika *Paraponyx stratiotata* munade või vastsetega või kärsaklase *Eubrychius velutus*'e täiskasvanud isenditega. Nähtava saastuse kõrvaldamiseks võib olla vaja taimset materjali puhta veega loputada. Peale selle tuleks teha jõupingutusi üherakuliste vetikate ja bakteritega saastumise ulatuse minimeerimiseks, ehkki taimne materjal ei pea olema täielikult steriilne. Tüvikultuuri tuleks jälgida ja seda vastavalt vajadusele ümber istutada, et hoida ära vetikatest ja bakteritest põhjustatud saastuse levikut. Kui vetikate või bakteritega saastumine muutub probleemiks, võib olla kasulik tüvikultuuri aereerida.
23. Kõikidel juhtudel kultiveeritakse/kohandatakse taimi enne katses kasutamist piisava ajavahemiku vältel (st üle 2 nädala) tingimustes, mis on sarnased, kuid mitte tingimata identsed katses kasutatavate tingimustega.
24. Katse jaoks ei tohiks kasutada õitsevat tüvikultuuri, kuna vegetatiivse kasvu kiirus on õitsemise ajal ja järel üldjuhul väiksem.

▼ **M7****Sete**

25. Käesoleva meetodi kohases katses soovitatakse kasutada järgmist valmistatud setet, mis põhineb käesoleva lisa peatükis C.28 (8) kirjeldatud kunstlikul settel. Sete valmistatakse katsemeetodis C.28 kirjeldatud viisil; ainsa erinevusena lisatakse toitaineid järgmiselt:
- a) 4–5 % (kuivmass) turvast (orgaanilise süsiniku lõppsisaldus  $2 \pm 0,5$  %), mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; on oluline kasutada üksnes õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud pulbrilist turvast, mille osakeste suurus on soovitatavalt  $< 1$  mm;
  - b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (soovitav kaoliniidisisaldus üle 30 %);
  - c) 75–76 % (kuivmass) kvartslüüva (peamiselt peen liiv;  $> 50$  % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200  $\mu\text{m}$ );
  - d) lisatakse selline kogus toitaineid vesilahust, et nii ammooniumkloriidi kui ka naatriumfosfaadi sisaldus valmis settepartii oleks 200 mg sette kuivmassi kilogrammi kohta ja lõpliku segu niiskusesisaldus oleks 30–50 %;
  - e) lõpliku settesegu pH reguleerimiseks väärtusele  $7,0 \pm 0,5$  lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati ( $\text{CaCO}_3$ ).
26. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada ja dokumenteeritud. Kui mõne nimetatud koostisosa päritolu ei ole teada või teeb teataval määral muret, tuleks veenduda, et asjaomane koostisosa ei ole saastunud kemikaalidega (nt raskmetallide, kloororgaaniliste ühendite või fosfororgaaniliste ühenditega).
27. Sette kuivad koostisosad tuleks esmalt segada homogeensuse saavutamiseks omavahel ja alles siis tuleks settesse hoolikalt segada toitaineid vesilahus. Niiske sete tuleks teha valmis vähemalt kaks päeva enne kasutamist, et turvas jõuaks põhjalikult veest läbi imbuda ja hüdrofoobsed turbaosakesed ei kerkiks settele söötme lisamisel veepinnale; niisket setet võib enne kasutamist säilitada pimedas.
28. Katse jaoks viiakse sete sobiva suurusega mahutisse, näiteks sellise läbimõõduga taimepottidesse, mis võimaldab paigutada potid klaasnõudesse (sette pindala peaks olema minimaalselt umbes 70 % nõu pindalast). Kui mahuti põhjas on augud, aitab mahuti põhja paigutatud filterpaberi tükk setet mahutis hoida. Potid täidetakse settega nii, et sette pind oleks tasane, ja seejärel kaetakse sete selle paigaldamiseks inertse materjali, näiteks liiva või peene aianduskruusa (või purustatud korallide) õhukese kihiga ( $\sim 2$ –3 mm).

**Katsesööde**

29. *Myriophyllum spicatum*'i kultiveerimiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Smarti ja Barko söödet (12). Selle söötme valmistamist on kirjeldatud 1. liites. Katsekeskkonna (veefaasi) pH peaks optimaalse taimekasvu tagamiseks olema katse alguses vahemikus 7,5–8,0.

**Katseplaan**

30. Katses tuleks kasutada kemikaaliga töötlemata kontrolli puhul vähemalt kuut paralleelnõu ja minimaalselt viiest katsekonsentratsioonist iga kontsentratsiooni puhul vähemalt nelja paralleelnõu.
31. Kui ei ole vaja määrata täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni, võib katseplaan muuta nii, et suurendataks uuritava kemikaali kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelide arvu iga kontsentratsiooni kohta.

▼ **M7**

32. Iga katsenõu näol on tegemist kolme võrset sisaldava paralleelkultuuriga. Igas katsenõus kolme võrse kasvatamiseks on kaks võimalust:
- katseplaani A: üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta;
  - katseplaani B: kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta;
  - alternatiivse katseplaanina on lubatud kasutada ühte võrset poti ja nõu kohta, kui seejuures kohandatakse vastavalt vajadusele paralleelide arvu, et saavutada vastavus nõuetekohasuse kriteeriumidele.
33. Katsenõud tuleks jaotada katserühmadesse juhuslikkuse alusel. Katsenõude paigutus katsealal peab olema juhuslik, et vähendada asukohast tingitud valgustiheduse ja temperatuuri erinevuste mõju.

**Uuritava kemikaali kontsentratsioonid ja kontrollrühmad**

34. Katsekonsentratsioonid peaksid üldjuhul moodustama geomeetrilise jada, mille tegur ei tohiks olla suurem kui 3,2. Uuritava kemikaali sobivate kontsentratsioonide valimine on hõlpsam, kui kemikaali mürgisus on kontsentratsioonivahemiku leidmise katsega eelnevalt kindlaks tehtud.
35.  $EC_x$  määramisel peaks  $EC_x$  väärtus jääma kasutatavasse kontsentratsioonivahemikku, et tagada tulemuste piisav usaldusvärsus. Näiteks peaks  $EC_{50}$  määramisel suurim katsekonsentratsioon olema suurem kui  $EC_{50}$  väärtus. Kui  $EC_{50}$  väärtus jääb kasutatavast kontsentratsioonivahemikust väljapoole, on asjaomane usaldusvahemik lai ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega ei pruugi olla võimalik statistiliselt hinnata. Leitud  $EC_x$  väärtusega seotud kitsama usaldusvahemiku saamiseks tuleks kasutada suuremat arvu katsekonsentratsioone.
36. Valikulise lõppnäitajana vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni või täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks peaks väikseim katsekonsentratsioon olema piisavalt väike, et kasv ei erineks selle kontsentratsiooni juures oluliselt kontrolltaimede kasvust. Peale selle peaks suurim katsekonsentratsioon olema piisavalt suur, et kasv oleks selle kontsentratsiooni juures oluliselt aeglasem kui kontrollrühmas. Suurema arvu paralleelide kasutamine suurendab täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks kasutatava dispersioonanalüüsi (ANOVA) statistilist võimsust.

**Piirsalduskatse**

37. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkonsentratsioonil või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkonsentratsioonil kahjulikku mõju, võib teha piirsalduskatse, mille abil on hõlbus võrrelda kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkonsentratsioonis või kontsentratsioonis 1 000 mg kuiva sette kilogrammi kohta. Kõnealuse katse puhul tuleks järgida standardse kontsentratsioonist sõltuvuse katse üldpõhimõtteid; ainsa erinevusena soovitatakse suurendada minimaalset paralleelide arvu kuue katsenõuni kontrollrühma ja katserühma kohta. Kasvu analüüsimiseks kontroll- ja katserühmas võib keskvärtusi võrrelda statistilise testi (nt Studenti t-testi) abil.

**Katselahused**

38. Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel; viimane saadakse uuritava kemikaali lahustamisel või dispergeerimisel Smarti ja Barko söötmes, mille valmistamiseks on kasutatud demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vett (vt 1. liide).

▼ **M7**

39. Suurim katsekonsentratsioon ei tohiks üldjuhul olla suurem kui uuritava kemikaali vees lahustuvuse piirkonsentratsioon või valmistise puhul dispergeeruvuse piirkonsentratsioon katsetingimustes.
40. Vees raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontseentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesõotmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või dispergeerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid lahusteid või dispergeerivaid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või dispergeeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või dispergeeriva aine kasutamise korral tuleks esitada selle lõppkonsentratsioon, mis peaks olema võimalikult väike ( $\leq 100 \mu\text{l/l}$ ). Sellisel juhul peaks lahusti või dispergeeriva aine sisaldus olema kõikides katsenõudes ja (lahustiga) kontrollnõudes ühesugune. Katseplaani näha ette ka lahustit või dispergeerivat ainet mittesisaldavate kemikaaliga töötlemata kontrollrühma paralleelide kasutamine. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud asjaomases OECD juhenddokumendis (11).

**KATSE KÄIK**

41. Katse käik varieerub sõltuvalt uuritava kemikaaliga kokkupuutumise viisist (st veefaasi või settefaasi kaudu). Katses kasutatava kokkupuuterežiimi valimisel (st staatiline või uuendamise poolstaatiline, rikastatud vesi või rikastatud sete) tuleks kaaluda uuritava kemikaali eeldatavat käitumist süsteemis vesi/sete. Mõnel juhul, kui kemikaal koguneb eeldatavalt olulisel määral settesse, võib olla soovitatav teha katse rikastatud settega.

**Ettevalmistusetapp**

42. Kultiveeritud taimede küljest lõigatakse terved võrsetipud ilma külgharudeta, et saada  $6 \pm 1$  cm pikkused võrsed. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) istutatakse igasse potti üks võrsetipp. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) istutatakse igasse setet sisaldavasse potti neli kuni viis võrsetippu.
43. Kummalgi juhul tuleks istutada taimed suuremasse arvu pottidesse kui katse jaoks vajalik, et katse alguses oleks võimalik valida ühesugused taimed ning et ülejäävaid taimi saaks kasutada juurte kasvu kontrollimiseks vahetult enne kemikaaliga kokkupuudet ja võrsete biomassi ja pikkuse määramiseks katse nullpäeval.
44. Võrsed istutatakse nii, et võrsest umbes kolme sentimeetri pikkune osa, mis sisaldab vähemalt kahte sõlme, jääb sette pinnast allapoole.
45. Seejärel viiakse potid katsenõudesse, milles valitsevad keskkonningimused on samad kui kokkupuutetapi ajal, ning hoitakse neid juurekasvu esilekutsumiseks seitse päeva Smarti ja Barko sõotmes.
46. Pärast seda tuleks varupottidest eemaldada mitu taime juurte kasvu kontrollimiseks. Kui nähtav juurekasv puudub (st juuretippud ei ole näha), tuleks ettevalmistusetappi pikendada, kuni täheldatakse nähtavat juurekasvu. Selle soovitatava sammuga tagatakse, et taimed kasvavad katse alustamise ajal aktiivselt.



▼ **M7****Ühetaolise taimse materjali valimine**

47. Katseplaani A puhul (üks võrse poti kohta ja kolm potti nõu kohta) valitakse enne katse algust välja ühesuguste taimedega potid. Katseplaani B puhul (kolm võrset poti kohta ja üks pott nõu kohta) eemaldatakse üleliigsed taimed nii, et kolm allesjäävat taime oleksid ühesuguse suuruse ja välimusega.

**Kokkupuude veefaasi kaudu**

48. Ühesuguste taimede alusel välja valitud potid paigutatakse konkreetsest katseplaanist lähtuvalt katsenõudesse. Seejärel lisatakse katsenõudesse Smarti ja Barko sööde. Tuleks jälgida, et selle käigus ei häiritaks settekihti. Selleks võib söötme lisamisel kasutada lehtrit või katta sette söötme katsenõudesse valamise ajal plastkettaga, mis eemaldatakse kohe pärast söötme lisamist. Teise võimalusena võib taimepotid panna katsenõudesse pärast söötme lisamist. Kummalgi juhul võib kokkupuuteetapi alguses kasutada värsket söödet, kui see on vajalik võimaliku vetikate ja bakterite kogunemise minimeerimiseks või selleks, et võimaldada valmistada katselahuse partii korraga kõikide paralleelide jaoks.
49. Sette kohal oleva võrse pikkus mõõdetakse kas enne või pärast söötme lisamist.
50. Katsesöötmesse võib sobiva koguse uuritavat kemikaali lisada enne söötme viimist katsenõudesse. Teise võimalusena võib uuritava kemikaali lisada pärast seda, kui sööde on lisatud katsenõudesse. Viimasel juhul tuleks tagada uuritava kemikaali ühtlane jaotumine katsesüsteemis ilma setet häirimata.
51. Kõikidel juhtudel registreeritakse katse alguses katsesöötme välimus (nt selge, hägune vmt).

**Kokkupuude sette kaudu**

52. Valitud kontsentratsiooniga rikastatud sete valmistatakse uuritava kemikaali lahuse otse värskesse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava kemikaali põhilahus segatakse valmistatud settega rullimisseadme või söödasegaja abil või käsitsi. Veest raskesti lahustuva uuritava kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt heksaanis, atsetoonis või kloroformis). Seejärel segatakse saadud lahus umbes 10 g peene kvartsiivaga ühe katsenõu kohta. Lahustil lastakse aurustuda ja seejärel segatakse liiv sobiva koguse settega katses kasutatava keeduklaasi kohta. Uuritava kemikaali lahustuvaks muutmiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada üksnes kergesti lenduvat kemikaali. Tuleks meeles pidada, et lõpliku sette valmistamisel on vaja arvesse võtta ka uuritava kemikaaliga rikastatud liiva ruumala/massi (seega tuleks sette valmistamisel kasutada vähem liiva). Tuleks jälgida, et settele lisatav uuritav kemikaal seguneks settega põhjalikult ja jaotuks selles ühtlaselt.
53. Rikastatud sete lisatakse pottidesse (nagu on kirjeldatud eespool). Välja valitud ühesugused piisava juurestikuga taimed eemaldatakse ettevalmistuse-  
tapis kasutatud pottidest ja istutatakse eespool kirjeldatud viisil ümber rikastatud settesse.
54. Potid paigutatakse konkreetsest katseplaanist lähtuvalt katsenõudesse. Seejärel lisatakse ettevaatlikult Smarti ja Barko sööde (nt lehtri abil), häirimata seejuures setet. Sette kohal oleva võrse pikkus mõõdetakse kas enne või pärast söötme lisamist.

**▼ M7****Veetaseme säilitamine katse vältel**

55. Igas katsenõus tuleb registreerida vee lõplik ruumala ja märkida nõule veetase. Kui katse vältel aurustub üle 10 % veest, tuleks veetaset destilleeritud veega reguleerida. Vajaduse korral võib keeduklaasid katta lahtise läbiipaistva kattega, näiteks läbipaistvast plastist kaanega, et minimeerida aurustumist ja vetikate spooridega saastumist.

**Katsetingimused**

56. Kasutatakse päevalguse spektriga ja/või külmvalget fluorestsentsvalgust, mille valgustihedus on umbes  $140 (\pm 20) \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus (400–700 nm) veepinnal. Kohaldatakse valgustusrežiimi 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust. Kõrvalekalle valitud valgustihedusest ei tohi katseala üheski punktis olla suurem kui  $\pm 15 \%$ .
57. Temperatuur katsenõudes on  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .
58. KontrollsöötmepH väärtus ei tohiks katse ajal suureneha rohkem kui 1,5 ühiku võrra. Kui pH väärtus suureneb üle 1,5 ühiku võrra, ei loeta katset siiski nõuetele mittevastavaks, kui on võimalik tõendada, et eespool sätestatud nõuetekohasuse kriteeriumid on täidetud.

**Katse kestus**

59. Kokkupuuteperiood kestab 14 päeva.

**Mõõtmised ja analüüsid**

60. Ettevalmistusetapi järel ja vahetult enne kemikaaliga kokkupuudet (st katse nullpäeval) kogutakse varutaimed viiest juhuslikult valitud potist, kui potis on katseplaani kohaselt kolm taime, või 15 potist, kui potis on üks taime, ning tehakse kindlaks võrsete pikkus, märgmass ja kuivmass, nagu on kirjeldatud allpool.
61. Kokkupuuteetapi jaoks kasutatavate taimede puhul määratakse järgmised tabelis 1 esitatud näitajad:
- peavõrse pikkus, külgharude arv ja külgharude pikkus registreeritakse vähemalt kokkupuuteperioodi lõpus (st 14. katsepäeval);
  - taimede tervise visuaalse hindamise tulemused registreeritakse kokkupuuteperioodi jooksul vähemalt kolmel korral (nt nullpäeval ning 7. ja 14. päeval);
  - võrsete märgmass ja kuivmass määratakse katse lõpus (st 14. päeval).
62. Võrsete pikkust mõõdetakse joonlauaga. Külgharude esinemise korral tuleks kindlaks teha ka nende arv ja pikkus.
63. Taimede tervise visuaalseks hindamiseks registreeritakse nende väljanägemine ja katsesöötmepõhine üldseisund. Vaatlused hõlmavad järgmist:
- nekroos, kloroos või muu värvimuutus, näiteks liigne punaseks värvumine kontrolltaimedega võrreldes;
  - bakteritest või vetikatest põhjustatud saastuse teke;
  - kasvuhäired, näiteks kangumine, sõlmedevahelise pikkuse muutumine, võrsete/lehtede moonustumine, külgharude juurdekasv, lehtede langemine, turgori kadu või varre fragmenteerumine;

▼ **M7**

- juurte tervist hinnatakse visuaalselt katse lõpus; selleks pestakse sete juurtelt ettevaatlikult maha ja vaadeldakse seejärel juurestikku. On välja pakutud järgmine hindamiskaala võrdluses kontrolltaimedega:
- 1) juured puuduvad,
  - 2) mõned juured,
  - 3) mõõdukalt arenenud juurestik,
  - 4) väga hästi välja kujunenud juurestik, mis sarnaneb kontrolltaimede omale.
64. Märgmass määratakse katse alguses ja lõpus; selleks lõigatakse sette pinna kohal olev võrse osa ära ja kuivatatakse see enne kaalumist kuivatuspaberiga. Tuleks jälgida, et võrse alumise otsa külge kleepuda võivad setteosakesed saaksid eemaldatud. Seejärel pannakse võrse kuivatuskappi temperatuurile umbes 60 °C ja kuivatatakse seda, kuni selle mass enam ei muutu, ning kaalutakse siis võrse uuesti ja registreeritakse selle kuivmass.
65. Katse vältel minimaalselt nõutavate bioloogiliste hindamiste kokkuvõte on esitatud tabelis 1.

*Tabel 1*  
**Hindamiste ajakava**

Päevade arv kokkupuute algusest	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Võrse pikkus, külgharude pikkus ja arv	Võrsete visuaalne hindamine	Võrsete märgmass ja kuivmass Juurte visuaalne hindamine	pH O <sub>2</sub>
0	H	H	H	H
4	—	—	—	—
7	—	H	—	H
14	H	H	H	H

„H“ tähistab asjaomase hindamise vajalikkust

„—“ tähistab hindamisvajaduse puudumist

*Mõõtmiste ja analüüside sagedus*

66. Söötme temperatuur kasvukambris, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitavas lisanõus tuleks registreerida vähemalt üks kord päevas (või teha seda andmeregistraatori abil pidevalt).
67. Katsesöötme pH-d ja lahustunud hapniku sisaldust kontrollitakse katse alguses, vähemalt üks kord katse vältel ja katse lõpus kõikides paralleelnõudes. Mõõtmised tuleks iga kord teha samal kellaajal. Kui iga katsekontsentratsiooni puhul valmistatakse katselahus korraga kõikide paralleelide jaoks, piisab iga sellise lahuse puhul ühekordsest mõõtmisest katse nullpäeval.
68. Valgustihedust tuleks mõõta kasvukambri, inkubaatori või ruumi punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui veepind. Valgustihedus tuleks kindlaks teha vähemalt üks kord katse alguses või katse jooksul. Valgustugevuse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist.

▼ M7

Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovitatakse kasutada kerakujulist andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõdetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele, või koosinusandurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõdetasapinda mis tahes nurga all saabuvale valgusele; sellise anduriga saadakse käesolevas meetodis kirjeldatud mitnepunktilise valgusallika puhul suuremad väärtused.

*Uuritava kemikaali sisalduse analüütiline mõõtmine*

69. Uuritava kemikaali õige koguse lisamises veendumiseks tuleks läbi viia kemikaali sisalduse analüütiline mõõtmine.
70. Veeproovid uuritava kemikaali analüüsimiseks kõikidel katsekontsentratsioonidel tuleks koguda veidi aega pärast katse algust (st püsiva uuritava kemikaali puhul selle lisamise päeval ja ebapüsiva kemikaali puhul üks tund pärast lisamist) ja katse lõpus.
71. Kemikaali sisaldus settes ja settepoorides olevas vees tuleks määrata katse alguses ja katse lõpus vähemalt suurimal katsekontsentratsioonil, välja arvatud juhul, kui uuritav kemikaal on vees teadaolevalt püsiv (sisaldus > 80 % nominaalväärtusest). Mõõtmised settes ja settepoorides olevas vees ei pruugi olla vajalikud, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja sette vahel on näiteks sette ja vee suhte, kemikaali lisamise meetodi ja sette tüübi poolest võrreldavates tingimustes süsteemis vesi/sete läbi viidud uuringu käigus täpselt kindlaks tehtud.
72. Setteproovi võtmisega katse alguses kaasneb tõenäoliselt katsesüsteemi häirumine. Seepärast võib olla vaja kasutada täiendavaid kemikaaliga katse nõusid, et hõlbustada analüütilist määramist katse alguses ja lõpus. Kui peetakse vajalikuks teha vahehindamisi näiteks 7. katsepäeval ja analüüsiks vaja mineva proovi kogus on nii suur, et seda ei ole lihtne katsesüsteemist eemaldada, tuleks samuti kasutada analüütiliseks määramiseks täiendavaid katse nõusid, mida on käideldud samal viisil kui bioloogiliste hindamiste jaoks kasutatavaid nõusid.
73. Poorivee eraldamiseks soovitatakse kasutada tsentrifuugimist näiteks 30 minuti vältel 10 000 g ja 4 °C juures. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal ei adsorbeeru filtril, võib siiski olla vastuvõetav ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi kemikaali sisalduse määramine poorivees proovi liiga väikese mahu tõttu võimalik olla.
74. Poolstaatilise katse puhul (st veefaasi kaudu kokkupuutel), kus asjaomase uuritava kemikaali sisaldus ei püsi katse vältel katselahust uuendamata eeldatavalt vahemikus  $\pm 20\%$  nominaalsest kontsentratsioonist, tuleks igal uuendamisel võtta uuritava kemikaali sisalduse määramiseks proov nii ära kasutatud kui ka värskest valmistatud katselahusest.
75. Kui uuritava kemikaali mõõdetud algsisaldus erineb nominaalväärtusest enam kui 20 % võrra, kuid on olemas piisavad tõendid selle kohta, et algsisaldus on korratav ja asjaomane väärtus on püsiv (st püsib vahemikus 80–120 % algsisaldusest), võib kemikaali sisalduse määrata ainult suurimal ja väikseimal katses kasutataval kontsentratsioonil.
76. Kõikidel juhtudel on uuritava kemikaali sisaldus igal katsekontsentratsioonil vaja määrata ainult ühes paralleelnõus. Teise võimalusena võib igal kontsentratsioonil kõikide paralleelide katselahused analüüsimiseks ühte koondada.
77. Kui on tõendatud, et uuritava kemikaali sisaldus ei kõigu katse vältel nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtusega võrreldes rohkem kui  $\pm 20\%$ , võib tulemuste analüüsimisel ja järgneval lõppnäitajate arvutamisel võtta aluseks nominaalväärtuse või mõõdetud algväärtuse.

▼ **M7**

78. Sellisel juhul peaksid mõju avaldumise kontsentratsioonid põhinema nominaalsetel või katse alguses vees mõõdetud kontsentratsioonidel.
79. Kui aga on tõendeid selle kohta, et kontsentratsioon on katse vältel vähenenud (st ei ole püsinud uuritava kemikaaliga töödeldud faasis vahemikus  $\pm 20\%$  nominaalväärtusest või mõõdetud algväärtusest), tuleks võtta tulemuste analüüsimisel aluseks kokkupuute vältel esinenud väärtuste geomeetriline keskmine või mõni mudel, millega saab kirjeldada uuritava kemikaali sisalduse vähenemist töödeldud faasis (11).

**ANDMETE HINDAMINE**

80. Kui katses on vaja kasutada lahustit või dispergeerivat ainet, võib lahustiga kontrolli ja töötlemata kontrolli andmed statistilise analüüsi jaoks ühte koondata, eeldusel, et kõnealuste rühmade näitajate vahel ei täheldata statistiliselt olulisi erinevusi.

**Uuritavad muutujad**

81. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju katseliigi vegetatiivsele kasvule kahe uuritava muutuja – kasvu keskmise erikiiruse ja saagise – põhjal järgmisel viisil.

*Keskmine kasvu erikiirus*

82. See uuritav muutuja põhineb kontrollrühma(de)s ja igas katserühmas mõõdetud võrsete summaarse pikkuse, summaarse märgmassi ja summaarse kuivmassi logaritmitud väärtuste muutumisel ajas. Kõnealune muutuja arvutatakse iga kontroll- ja katserühma iga paralleeli kohta. Igas katsenõus (paralleelnõus) oleva kolme taime keskmine pikkus ja mass ning sellest lähtuvalt kasvukiirus iga paralleelis tuleks arvutada järgmise valemi abil:

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

kus

$\mu_{i-j}$  on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul  $i-j$ ,

$N_i$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel  $i$ ,

$N_j$  on mõõdetava muutuja väärtus katse- või kontrollnõus ajahetkel  $j$  ja

$t$  on ajavahemik  $i-j$ .

83. Paralleelnõude andmete põhjal tuleks iga katserühma ja kontrollrühma puhul arvutada kasvukiiruse keskvärtus ja tulemuste hajuvus.
84. Keskmine kasvu erikiirus tuleks arvutada kogu katseperioodi kohta (eespool esitatud valemis vastab katse algusele ajahetk  $i$  ja katse lõpule ajahetk  $j$ ). Kontrollrühma ja uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni puhul arvutatakse kasvu keskmise erikiiruse keskvärtus ja tulemuste hajuvus.

▼ **M7**

85. Seejärel võib iga katses kasutatava kontsentratsiooni (katserühma) puhul arvutada kasvukiiruse vähenemise  $I_r$  protsentides järgmise valemi abil:

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

kus

$\% I_r$  on kasvu keskmise erikiiruse vähenemise määr protsentides,

$\mu_C$  on  $\mu$  keskvärtus kontrollrühmas ja

$\mu_T$  on  $\mu$  keskvärtus katserühmas.

*Saagis*

86. See uuritav muutuja põhineb kontrollrühma(de)s ja igas katserühmas mõõdetud võrsete summaarse pikkuse, summaarse märgmassi ja summaarse kuivmassi muutumisel ajas. Saagise vähenemise määr protsentides ( $\% I_y$ ) võib iga katserühma puhul arvutada järgmiselt:

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

kus

$\% I_y$  on saagise vähenemise määr protsentides,

$b_C$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe kontrollrühmas ja

$b_T$  on biomassi lõppväärtuse ja algväärtuse vahe katserühmas.

#### **Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverate koostamine**

87. Tuleks koostada kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõverad, mis väljendavad uuritava muutuja väärtuse vähenemise keskmise protsentuaalse määra (eespool kirjeldatud viisil arvatud  $\% I_r$  või  $\% I_y$ ) sõltuvust uuritava kemikaali kontsentratsiooni logaritmitud väärtusest.

#### **EC<sub>x</sub> leidmine**

88. EC<sub>x</sub> (nt EC<sub>50</sub>) hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest ( $E_r C_x$ ) kui ka saagisest ( $E_y C_x$ ), mis peaksid kumbki omakorda põhinema võrsete summaarsel märgmassil, summaarsel kuivmassil ja summaarsel pikkusel.
89. Tuleks silmas pidada, et nende kahe uuritava muutuja puhul arvatud EC<sub>x</sub> väärtused ei ole võrreldavad, ning seda erinevust võetakse katsetulemuste kasutamisel arvesse. Käesolevas katsemeetodis sätestatud tingimuste kohase katse puhul on keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC<sub>x</sub> väärtused ( $E_r C_x$ ) enamikul juhtudel suuremad kui saagisel põhinevad väärtused ( $E_y C_x$ ), kuna asjaomaste lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad.

#### **Statistilised meetodid**

90. Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. On võimalik kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast mõjuandmete lineariseerivat teisendamist näiteks vastavalt probit-, logit- või Weibulli mudelile (13), kuid tuleks siiski eelistada mittelinearse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kasvu täielikule pidurdumisele või pidurdumise täielikule puudumisele lähedases olukorras võib kõnealune teisendamine andmevigu võimendada ja analüüsi segada (13). Tuleks silmas

▼ **M7**

pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardised analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleks kasvukiiruse või saagise andmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsed meetodid  $EC_x$  väärtuste leidmiseks pidevate andmete alusel on esitatud viidetes 14–17.

91. Iga uuritava muutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse kõvera põhjal  $EC_x$  hinnanguline väärtus. Määratakse iga hinnangulise väärtuse usalduspiirid usaldusnivool 95 %. Mõjuandmete sobivust regressioonimudeliga tuleks hinnata graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsi tegemisel tuleks kasutada mitte katserühmade andmete keskväärtsi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.
92. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib  $EC_{50}$  hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (18).
93. Et teha kindlaks vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja selle alusel ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon, on vaja võrrelda katserühmade keskväärtsi dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetoditega. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskväärtsust võrreldakse seejärel sobiva meetodi (nt Dunnetti või Williamsi testi) abil kontrollrühma keskväärtsusega (19–22). Tuleb hinnata, kas kehtivad dispersioonanalüüsi eeldused, et tegemist on normaaljaotusega ja hajuvus on homogeenne. Selleks tuleks kasutada Shapiro-Wilksi testi (normaaljaotus) ja Levene'i testi (hajuvuse homogeenus). Kui normaaljaotuse ja hajuvuse homogeenuse eeldused ei kehti, võib mõnikord olla abi andmete logaritmilisest teisendamisest. Kui hajuvuse heterogeensus ja/või kõrvalekalle normaaljaotusest on väga suur(ed) ja teisendamise abil korrigeerimine ei ole võimalik, tuleks kaaluda mõne muu meetodi, näiteks Bonferroni-Welchi t-testi, muutujate sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra testi või Bonferroni mediaantesti kasutamist. Lisajuhised täheldatava toime puudumise kontsentratsiooni määramiseks on esitatud viites 16.

**ARUANDLUS**

94. Katseprotokollis esitatakse järgmine üksikasjalik teave.

*Uuritav kemikaal:*

ühest koostisosast koosnev aine:

- füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne;

mitut koostisosa sisaldav aine, UVCB või segu:

- võimalikult täpne omaduste kirjeldus, nt koostisosade keemiline määratlus (vt eespool), kvantitatiivne sisaldus ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused.

*Katseliik:*

- teaduslik nimetus ja päritolu.

*Katsetingimused:*

- ettevalmistusetapi kestus ja tingimused;
- kasutatud katserežiim (staatiline, poolstaatiline või impulssdoseerimise režiim);

▼ M7

- katse alustamise kuupäev ja katse kestus;
- katsekeskkonna, st sette ja vedelsöötme kirjeldus;
- katseplaani kirjeldus: kasvukamber, ruum või labor, katsenõud ja nende katted, lahuste ruumala, katsetaimede pikkus ja mass igas katsenõus katse alguses, sette pindala ja vee pindala suhe, sette ruumala ja vee ruumala suhe;
- kasutatud kontsentratsioonid (nominaalne ja vajaduse korral mõõdetud sisaldus) ja paralleelkultuuride arv kontsentratsiooni kohta;
- põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või dispergeerivate ainete kasutamise kirjeldus;
- katsetemperatuur;
- valgusallikas ja valgustihedus ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );
- katsesöötme ja kontrollsöötme pH ning katsesöötme välimus katse alguses ja lõpus;
- hapnikusisaldus;
- kemikaali määramise meetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed või usalduspiirid);
- mõõdetavate muutujate, näiteks pikkuse, kuivmassi ja märgmassi määramise meetodid;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

*Tulemused:*

- töötlemata andmed: taimede võrsete pikkus ja mass poti kohta ning muude mõõdetavate muutujate väärtus igas uuritava kemikaaliga kultuuris ja kontrollkultuuris iga tabelis 1 esitatud ajakava kohase vaatluse ja analüüsi ajal;
- iga mõõdetava muutuja keskvaartused ja standardhälbed;
- kasvukõver igaal kontsentratsioonil;
- võrsete pikkuse ja märgmassi alusel arvatud biomassi kahekordistumise aeg ja kasvukiirus kontrollrühmas, sealhulgas märgmassil põhineva saagise variatsioonikordaja;
- uuritavate muutujate arvatud väärtused igas uuritava kemikaaliga paralleelkultuuris ning paralleelkultuuride andmete keskvaartused ja variatsioonikordajad;
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;
- uuritavate muutujate põhjal leitud mürgisuse lõppnäitajate, näiteks  $\text{EC}_{50}$  hinnangulised väärtused ja vastavad usaldusvahemikud; asjaomaste andmete olemasolu korral vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon ja/või täheldatava toime puudumise kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamise korral mõju määra, mida on võimalik tuvastada (nt väikseim oluline erinevus);
- katserühma mis tahes kultuuris täheldatud stimuleeriv mõju kasvule;



▼ M7

- kõik nähtavad fütotoksilisuse ilmingud ja tähelepanekud katselahuste kohta;
- tulemuste arutelu, milles muu hulgas käsitletakse võimaliku käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

## KIRJANDUS

- (1) Käesoleva lisa peatükk C.26 „Perekonna *Lemna* taimede kasvu pidurdumise katse“.
- (2) Käesoleva lisa peatükk C.3 „Mageveevetikate ja tsüanobakterite kasvu pidurdumise katse“.
- (3) Maltby, L., *et al.* (2010). Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides. Suunised AMRAPi seminarilt Wageningenis (NL), 14.–16. jaanuar 2008.
- (4) Arts, G. H. P., *et al.* (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153: 199–206.
- (5) ISO 16191:2013. Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K., *et al.* (2006). Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Manag. Sci.* 62 (8): 715–722.
- (7) Käesoleva lisa peatükk C.50 „Settevaba mürgisuskatse *Myriophyllum spicatum*’iga“.
- (8) Käesoleva lisa peatükk C.28 „Sette-vee mürgisuskatse surusääsklastel rikastatud vee kasutamisega“.
- (9) Ratte, M., ja Ratte, H. (2014). *Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 206. OECD Publishing, Pariis.
- (10) Davies, J., *et al.* (2003). Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study. *Pest Manag. Sci.* 59 (2): 231–237.
- (11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 23. OECD Publishing, Pariis.
- (12) Smart, R. M., ja Barko, J. W. (1985). Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquat. Bot.* 21 (3): 251–263.
- (13) Christensen, E. R., ja Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 18 (9): 713–718.
- (14) Nyholm, N., *et al.* (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (2): 157–167.
- (15) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modeling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (10): 1485–1494.
- (16) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54. OECD Publishing, Pariis.
- (17) Brain, P., ja Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Res.* 29 (2): 93–96.

**▼M7**

- (18) Norberg-King, T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USA Keskkonnakaitseamet, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50 (272): 1096–1121.
- (20) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 (3): 482–491.
- (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 (1): 103–117.
- (22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28 (2): 519–531.

▼ M7

## I. liide

## SMARTI JA BARKO SÖÖTME KOOSTIS

Koostisaine	Veele (*) lisatava reaktiivi kogus (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	69,0
$\text{NaHCO}_3$	58,4
$\text{KHCO}_3$	15,4
pH (õhuga tasakaalus lahus)	7,9

(\*) Demineraliseeritud (st destilleeritud või deioniseeritud) vesi

▼ **M7**

## 2. liide

**MÕISTED**

**Biomass** – populatsiooni elusaine märgmass ja/või kuivmass. Käesoleva katsemeetodi puhul on biomass peavõrse, kõikide külgharude ja kõikide juurte summaarne mass.

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kloroos** – katseorganismi, eriti männaste rohelise värvuse muutumine kollakaks.

**EC<sub>x</sub>** – katsesõõtmes lahustatud uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille puhul *Myriophyllum spicatum*'i kasv pidurdub kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul x % (nt 50 %) võrra (kui kokkupuuteaeg erineb katse tavapärasest või täiskestusest, tuleb täpselt märkida selle kestus). Kasvukiiruse või saagise alusel arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E<sub>r</sub>C“ ja saagise puhul tähist „E<sub>s</sub>C“, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt „E<sub>r</sub>C (peavõrse pikkus)“.

**Kasv** – mõõdetava muutuja (nt peavõrse pikkuse, külgharude summaarse pikkuse, võrsete summaarse pikkuse, juurte summaarse pikkuse, märgmassi, kuivmassi või männaste arvu) väärtuse suurenemine katse vältel.

**Kasvukiirus** (keskmine kasvu erikiirus) – mõõdetava muutuja väärtuse logaritmiline suurenemine kokkupuuteperioodi jooksul. *Märkus:* kasvukiirusega seotud uuritavad muutujad ei sõltu katse kestusest, kuni kemikaaliga mitte kokku puutuvate kontrollorganismide kasv on eksponentsiaalne.

**Vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon** – väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) kasvu pidurdavat mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud.

**Mõõdetav muutuja** – mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse katse lõppnäitaja väljendamiseks ühe või mitme eri uuritava muutuja kaudu. Käesoleva katsemeetodi puhul on mõõdetavad muutujad peavõrse pikkus, külgharude summaarne pikkus, võrsete summaarne pikkus, juurte summaarne pikkus, märgmass, kuivmass ja männaste arv.

**Monokultuur** – ühe liigi taimede kultuur.

**Nekroos** – protsess, mille tagajärjel tekib katseorganismi surnud (st valge või tumepruun) kude.

**Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon** – kontsentratsioon, mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

**Uuritav muutuja** – mürgisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis on leitud biomassi kirjeldava mõõdetud muutuja alusel vastavalt asjakohasele arvutusmeetodile. Käesoleva katsemeetodi puhul on uuritavad muutujad kasvukiirus ja saagis, mis on leitud selliste mõõdetavate muutujate alusel nagu peavõrse pikkus, võrsete summaarne pikkus, märgmass, kuivmass või männaste arv.

**Poolstaatiline (lahusevahetusega) katse** – katse, mille käigus katselahus teatavate ajavahemike järel perioodiliselt välja vahetatakse.

**Staatiline katse** – katse, mille käigus katselahust ei uuendata.

**▼ M7**

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**Katse lõppnäitaja** – katse eesmärgile vastav üldine näitaja, mis muutub uuritava kemikaali mõjul kontrollrühma asjaomase näitajaga võrreldes. Käesoleva katsemeetodi puhul on katse lõppnäitaja kasvu pidurdumine, mida võib väljendada ühel või mitmel mõõdetaval muutujal põhinevate uuritavate muutujate abil.

**Katsesööde** – täielik sünteetiline kasvukeskkond, milles katsetaimi kasvatatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav kemikaal katsesöötmes.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**Saagis** – kokkupuuteperioodi lõpus ja alguses määratud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mille kaudu väljendatakse biomassi suurenemist katse vältel. *Märkus:* kui kemikaaliga mitte kokku puutuvate organismide kasv on eksponentsiaalne, muutub saagisel põhinevate uuritavate muutujate väärtus katse vältel väiksemaks.

## ▼M8

C.52. ÜHTE PÕLVKONDA HÕLMAV PIKENDATUD SIGIVUSKATSE  
JAAPANI RIISIKALAGA (MEOGRT)

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 240 (2015). Jaapani riisikalaga tehtava ühte põlvkonda hõlmava pikendatud sigivuskatse (MEOGRT) juhendis kirjeldatakse põhjalikku katsemeetodit, mille aluseks on kalade kokkupuude kemikaaliga mitme põlvkonna jooksul, et koguda ökoloogilise ohu ja kemikaalide, sealhulgas võimalikud endokriinfunktsiooni kahjustavad kemikaalid, riskihindamise aspektist olulisi andmeid. MEOGRT puhul kestab kokkupuude kemikaaliga kuni teise põlvkonna (F2) koorumiseni (kaks nädalat pärast viljastamist). Täiendavalt oleks vaja uurida seda, kas põlvkonna F2 uurimine koorumisjärgsel perioodil oleks põhjendatud; praegu ei ole piisavalt teavet, mille põhjal saaks esitada põlvkonna F2 uurimise pikendamist põhjendavaid asjakohaseid tingimusi või kriteeriume. Käesolevat katsemeetodit võidakse siiski uue teabe ja andmete põhjal ajakohastada. Näiteks võivad juhised põlvkonna F2 uurimise pikendamiseks kuni sigimiseni olla kasulikud teatud asjaoludel (nt suure biokontsentratsiooni potentsiaaliga kemikaalid või andmed põlvkondadevahelise toime kohta muudes taksonites). Käesoleva katsemeetodi abil saab hinnata kemikaalide, sealhulgas potentsiaalselt endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide võimalikku kroonilist toimet kaladele. Meetodis keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämusele, arengule, kasvule ja sigimisele), et arvutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (ECx), kuid tuleks arvesse võtta, et ECx-il põhinevad meetodid ei sobi tavaliselt sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus ECx-i kindlakstegemise eesmärgil uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine võib olla ebaotsustarbekas ja põhjustada kasutatavate loomade suure arvu tõttu loomade heaoluga seotud probleeme. Kemikaalide puhul, mis ei vaja mitmes põlvkonnas hindamist või millel puudub endokriinfunktsiooni kahjustamise potentsiaal, võivad olla sobivamad muud katsemeetodid (1). Jaapani riisikala on käesoleva katsemeetodiga kasutamiseks sobiv liik tänu lühikesele elutsükklile ja võimalusele tuvastada selle geneetilist sugu (2), mida peetakse selle katsemeetodi keskse tähtsusega komponendiks. Meetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaatluste lõppnäitajad on kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes. Sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid (nt võõtdaanio).
2. Käesoleva katsemeetodi kohaselt mõõdetakse mitmeid bioloogilisi lõppnäitajaid. Esmajoones pööratakse tähelepanu võimalikule kahjulikule toimele, mis avaldub populatsiooni näitajates, sealhulgas ellujäämus, üldine areng, kasv ja sigimine. Teises järjekorras kogutakse muud kasulikku teavet *vitellogeniini* (*vtg*) mRNA (või vitellogeniini valgu, VTG) ja geneetilise sooga seotud fenotüübi teisest sootunnuste mõõtmise ning histopatoloogia hindamise teel, et saada andmeid toimemehhanismide kohta ja seostada neid muudes valdkondades ja laboriuuringutes saadud tulemustega juhul, kui leidub *a posteriori* tõendeid kemikaali endokriinfunktsiooni kahjustava potentsiaali kohta (nt muude katsetega on leitud androgeenide või östrogeenide funktsiooni kahjustav toime). Tuleb märkida, et kui kemikaalil või selle metaboliitidel endokriinfunktsiooni kahjustavat toimet ei kahtlustata, võib nimetatud teisest lõppnäitajate mõõtmise vajadus puududa ning sobivam on kasutada vähem ressursse ja loomi vajavaid uuringuid (1). Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

## ▼M8

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimise on kaasatud vähe laboreid, võib eeldada, et katsemeetod vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. Andmeid saab kasutada endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide analüüsimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 5. tasemel. Meetodi kohaselt algab katse sellega, et täiskasvanud kalad (põlvkond F0) viiakse sigimisperioodil kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kokkupuude jätkub põlvkonna ja F1 arengu ja sigimise perioodil kuni põlvkonna F2 koorumiseni. Tänu sellele võimaldab katse hinnata nii struktuurseid kui ka aktiveerivaid radasid, mis mõjutavad endokriinfunktsiooni. Endokriinfunktsiooniga seotud lõppnäitajate tõlgendamisel võib kasutada tõendite kaalukusel põhinevat meetodit.
4. Katsesse tuleks kaasata vajalikul arvul isendeid, et saavutada sigimisega seotud lõppnäitajate hindamiseks piisav statistiline võimsus (vt 3. liide), tagades samal ajal loomade heaolu kaalutlustel, et kasutatavate loomade arv on võimalikult väike. Arvestades kasutatavate katseloomade suurt arvu, tuleb katse vajalikkust hoolikalt kaaluda seoses olemasolevate andmetega, mis võivad juba hõlmata asjakohast teavet paljude MEOGRT lõppnäitajate kohta. Sellega seoses võib abi saada OECD koostatud raamistikust kaladele avalduva mürgisuse katsete kohta (1).
5. Katsemeetod on välja töötatud eelkõige üksiku aine toime eristamiseks. Ent kui tekib vajadus teha katse seguga, siis tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse kavandatud regulatiivse eesmärgi jaoks sobivad tulemused.
6. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalise-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada püsivaid kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks.

## KATSE PÕHIMÕTE

7. Katse alustamiseks viiakse suguküpsed isas- ja emasisendid (vähemalt 12 nädalat pärast viljastamist) sigimispaarides kolmeks nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse. Selle aja jooksul levitatakse uuritavat kemikaali vanemate põlvkonna (F0) organismis vastavalt kemikaali toksikokineetilistele omadustele. Võimalikult lähedal neljanda nädala esimesele päevale korjatakse määrid, et saada põlvkond F1. Põlvkonna F1 kasvatamise ajal (kokku 15 nädalat) hinnatakse kooruvust ja ellujäämist. Lisaks võetakse 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal kaladelt proove arengu lõppnäitajate kindlakstegemiseks ning 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal hinnatakse kolme nädala jooksul kudemist. Põlvkond F2 luuakse pärast kolmandat sigivuse hindamise nädalat ja seda kasvatatakse kuni koorumise lõpuni.

## KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITERIUMID

8. Katse nõuetekohasuse suhtes kohaldatakse järgmisi kriteeriume.

— Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema  $\geq 60$  % õhu küllastuskontsentratsioonist.

— Keskmine veetemperatuur peaks kogu uuringu vältel olema vahemikus 24–26 °C. Üksikutes akvaariumides esinevad põgusad kõrvalekalded keskmisest ei tohiks ületada 2 °C.

**▼M8**

- Keskmine sigivus iga põlvkonna (F0 ja F1) kontrollrühmades peaks olema suurem kui 20 marjatera paari kohta päevas. Kõikide hindamise jooksul valminud marjaterade viljakus peaks olema üle 80 %. Lisaks peaks kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta.
  - Marjaterade (keskmine) kooruvus kontrollrühmades peaks olema  $\geq 80\%$  (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2).
  - Kontrollrühmas (F1) peaks (keskmine) ellujäämus kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja alates 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni põlvkonnaga F1 katse lõpetamiseni (15. viljastamisjärgne nädal) olema vastavalt  $\geq 80\%$  ja  $\geq 90\%$ .
  - Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsioon lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus  $\pm 20\%$  mõõtmistulemuste keskväärtest.
- Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, ei tohiks ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).
9. Kuigi suurema kokkupuutega rühmades võib täheldada vähenenud sigivust, peaks põlvkonna F0 sigivus kokkupuute suuruse järgi vähemalt kolmandast rühmast alates ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades olema piisav kooremisinkubaatorite täitmiseks. Peale selle peaks põlvkonna F1 embrüote ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi kolmandas rühmas ja kõigis väiksema kokkupuutega rühmades piisav selleks, et hinnata lõppnäitajaid noorkaladest proovide võtmise etapil (vt punktid 36 ja 38 ja 9. liide). Lisaks peaks põlvkonna F1 kooremisjärgne ellujäämus olema kokkupuute suuruse järgi teises rühmas vähemalt nõutaval miinimumtasemel ( $\sim 20\%$ ). Need ei ole otseselt nõuetekohasuse kriteeriumid, vaid soovitused, mis võimaldavad arutada usaldusväärseid NOEC väärtusi.
  10. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

**MEETODI KIRJELDUS****Seadmed**

11. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:
  - a) hapnikumõõtur ja pH-meeter;
  - b) seadmed vee kareduse ja leelisuse määramiseks;
  - c) asjakohased temperatuuri reguleerimise ja soovitatavalt selle pideva jälgimise seadmed;
  - d) soovitatava biomassisalduse ja asustustiheduse jaoks piisava suurusega keemiliselt inertsest materjalist proovinõud (vt 3. liide);
  - e) sobiva täpsusega kaal (st täpsusega  $\pm 0,5$  mg).



**▼M8****Vesi**

12. Katses võib kasutada sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema kogu katse jooksul püsiva kvaliteediga. Tagamaks, et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi ega põhjustaks näiteks uuritava kemikaaliga komplekside moodustumist või avaldaks negatiivset mõju sugukarja jõudlusele, tuleks kindlate ajavahemike järel võtta analüüsimiseks veeproove. Kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (nt Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ja SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus määrata näiteks iga kuue kuu järel. Lahjendusvee mõned nõutavad keemilised omadused on esitatud 2. liites. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui ± 0,5 pH-ühikut.

**Kokkupuutesüsteem**

13. Kokkupuutesüsteemi konstruktsiooni ja selles kasutatavaid materjale ei ole täpsustatud. Katsesüsteemi ehitamiseks tuleks kasutada klaasi, roostevaba terast või muid keemiliselt inertseid materjale, mis ei ole varasemate katsete käigus saastunud. Käesolevas katses kasutamiseks sobiv kokkupuutesüsteem võib koosneda pideva läbivooluga süsteemist (4–13).

**Katselahused**

14. Uuritava kemikaali põhilahus tuleks viia kokkupuutesüsteemi sobiva pumba abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb kalibreerida enne kokkupuute algust põhilahuse kohta tehtava analüüsi tulemuste põhjal ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumetriselt kontrollida. Igas kambri oleval uuritaval lahustil värskendatakse piisaval määral (nt vähemalt 5 ja kuni 16 kambri mahu värskendust päevas või voolukiirus kuni 20 ml/min) olenevalt uuritava kemikaali püsivusest ja vee kvaliteedist.
15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahjendusvees mehaaniliselt (nt segamine ja/või ultrahelitöötlus) soovitatavalt lihtsalt segada või loksutada. Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (14). Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatud lahustid võivad ise põhjustada mürgisust ja/või soovimatuid või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal kontsentratsioonil (nagu lahustite kasutamise puhul sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset kindlakstegemist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset bioloogilist määrdumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahustiga kontroll, mis aga mõjutab loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali puhul võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning parima meetodi kindlakstegemisel tuleb arvesse võtta OECD juhendit nr 23 raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimise kohta (15). Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad andmed lahusti kasutamise kohta. Lahusti kandeainete kasutamise korral tuleb lisaks ilma lahustita (negatiivsetele) kontrollidele (üksnes lahjendusvesi) hinnata ka sobivaid lahustiga kontrole. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja tekib mikroobne aktiivsus (bioloogiline määrdumine), on soovitatav iga paagi bioloogiline määrdumine kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas)

▼ **M8**

registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahustiga kontrollis ja kõigis katseproovides pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahustiga kontrolliks kasutada katseproovide kõige suuremat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandeaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (15) ja soovitatavalt tuleks hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult madalal ( $nt < 20 \mu\text{l/l}$ ), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele lõppnäitajatele (16).

**Katseloomad***Kalade valimine ja pidamine*

16. Katses kasutatav liik on jaapani riisikala *Oryzias latipes*, kuna sellel on lühike elutsükkel ja võimalus teha kindlaks geneetilist sugu. Kuigi sarnase katse-eeskirja jaoks võivad sobida ka muud väikesed kalaliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed katsemeetodid ja vaatluste lõppnäitajad kohaldatavad üksnes jaapani riisikala suhtes (vt punkt 1). Riisikala paljunemist vangistuses on lihtne esile kutsuda; on olemas selle kasvatamist käsitlevad avaldatud meetodid (17–19), samuti andmed lühiajalise letaalsuse, varase elujärgu ja kogu elutsükli katsete kohta (5–6, 8–9, 20). Kõigi kalade puhul kasutatakse valgusrežiimi 16 h valgust ja 8 h pimedust. Kalu söödetakse soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) elusate noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Kaubanduslikult müüdavat helvessööta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes.
  
17. Sobivate kasvatusemeetodite järgimise korral ei ole kohustuslik rakendada konkreetset kasvatuseeskirja. Näiteks võib riisikala kuni 4. viljastamisjärgse nädalani kasvatada 2 l proovinõudes tihedusega 240 kalavastset nõu kohta, seejärel kuni 8. viljastamisjärgse nädalani 2 l nõudes tihedusega 10 kala nõu kohta. Pärast seda paigutatakse kalad sigimispaaridena 2 l nõudesse.

*Kalade kohandamine ja valimine*

18. Katsealused kalad tuleks valida ühest laboriparvest, mida on vähemalt kahe nädala vältel enne katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele tingimustele (märkus: nimeetatud kohanemisperiood ei asenda kokkupuute-eelset perioodi). Soovitatavalt tuleks katsealused kalad soetada kohalikust kasvandusest, sest täiskasvanud kalade transportimine põhjustab stressi ja võib häirida kudemist. Pidamisperioodil tuleks kalu kaks korda päevas sööta soolase vee krevettidega ning kokkupuute etapil tuleks sellele vajaduse korral lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Piisava replitseeritavuse tagamiseks peetakse katse alustamise eeltingimuseks vähemalt 42 sigimispaaari olemasolu (54 sigimispaaari juhul, kui on vaja kasutada lahustiga kontrolli, kuna puuduvad piisavad varasemad andmed, mis võimaldaksid kasutada ainult lahustita kontrolli). Lisaks tuleb põlvkonna F0 iga sigimispaaari puhul kontrollida XX-XY kromosoomide (st kummagi soo sugukromosoomide normaalkomplekti) olemasolu, et vältida spontaansete XX isaste kaasamist (vt punkt 39).

▼ **M8**

19. Kohanemise etapil tuleb registreerida kasvukalade seas esinev suremus ning pärast 48-tunnist rahunemisperioodi kohaldatakse järgmisi kriteeriume.
- Kui suremus kasvupopulatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katse-süsteemi üleviimist suurem kui 10 %, jäetakse kogu partii kõrvale.
  - Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katse-süsteemi üleviimist suurem kui 5–10 %, lastakse kaladel veel seitse päeva koha-neda nii, et kohanemisperiood on kokku kaks nädalat. Kui kõnealuse järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, jäetakse kogu partii kõrvale.
  - Kui suremus populatsioonis on seitsme päeva jooksul enne katse-süsteemi üleviimist väiksem kui 5 %, loetakse partii vastuvõetavaks.
20. Katsele eelneva kahe nädalase kohanemisperioodi vältel ja kokkupuute ajal ei tohiks kaladel haigusi ravida ning võimaluse korral tuleks haiguste ravi täielikult vältida. Kliiniliste haigustunnustega kalu ei tohiks uuringus kasu-tada. Katsele eelnenud perioodil tehtud vaatlused ning haiguste ennetamiseks ja raviks kasutatud meetodid tuleks dokumenteerida.
21. Kokkupuuteperioodi tuleks alustada eristatavate sootunnuste ja geneetilisel kindlaks tehtud sooga täiskasvanud kaladega, kes pärinevad temperatuuril  $25 \pm 2$  °C kasvatatud labori suguküpsete loomade varudest. Kalade sigimis-võime (st varasem eluvõimeliste järglaste saamine) peaks olema kokkupuute eelneva nädala jooksul kontrollitud. Katse kasutatavas kalade rühmas peaks kõikide kalade kehamass soo järgi jääma katse alguses vahemikku  $\pm 20$  % samasooliste kalade massi aritmeetilisest keskmisest. Hinnangulise keskmise kehamassi leidmiseks tuleks enne katset kalu osaliselt kaaluda. Valitud kalad peaksid olema vähemalt 12 nädalat vanad (alates viljastami-sest) ning nende kehamass peaks olema emastel  $\geq 300$  mg ja isastel  $\geq 250$  mg.

**KATSEPLAAN****Katsekontsentratsioonid**

22. Soovitavalt tuleks kasutada kemikaali viit kontsentratsiooni ja kontrolli/kon-trolle. Katsekontsentratsioonide vahemiku valimisel tuleks arvesse võtta kõiki teabeallikaid, sealhulgas kvantitatiivseid struktuur-aktiivsussõltuvusi (QSAR), analoogmeetodeid, kaladega tehtud muude katsete, näiteks ägeda mürgisuse katsete (käesoleva lisa peatükk C.1), kalade paljunemise lühiajaliste katsete (käesoleva lisa peatükk C.48) ja muude katsemeetoditega (nt käesoleva lisa peatükid C.15, C.37, C.41, C.47 või C.49; (21–26) saadud tulemusi, kui need on kättesaadavad, ning vajaduse korral ka vahemiku leidmise katsega (mis võib hõlmata sigimisetappi) kogutud andmeid. Vajaduse korral võib vahemiku leidmise katse läbi viia lõpliku katsega sarnastel tingimustel (veekvaliteet, katse-süsteem, loomade biomass). Kui tuleb kasutada lahustit, mille kohta puuduvad varasemad andmed, saab vahemiku leidmise katse abil kontrollida lahusti sobivust. Suurim katsekontsentratsioon ei tohiks ületada vees lahustu-vuse taset 10 mg/l või ühte kümnendikku 96h-LC50 väärtusest (27). Vähim kontsentratsioon peaks olema 10–100 korda väiksem kui suurim kontsentrat-sioon. Lisaks annuse-toime seoste mõõtmisele võimaldab käesolevas katse

**▼M8**

viie kontsentratsiooni kasutamine kindlaks määrata ka vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja toimet mitte avaldava kontsentratsiooni (NOEC), mis on mõnes regulatiivses kavas või jurisdiktsioonis nõutavad riskihindamise jaoks. Üldiselt peaks uuritava kemikaali järjestikuste nominaalsete kontsentratsioonide vahe kordaja olema  $\leq 3,2$ .

**Katse- ja kontrollrühmades kasutatavad paralleelnõud**

23. Iga katsekonsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt kuut paralleelnõud (vt 7. liide). Sigimisetapil (välja arvatud põlvkonna F0 puhul) tuleks paralleelnõude arv viljakuse hindamiseks kahekordistada ning iga paralleelnõu peab sisaldama üksnes ühte sigimispaari (vt punkt 42).
24. Lisaks katsekonsentratsioonidele tuleks kasutada ka lahjendusveega kontrolli ja vajaduse korral lahustiga kontrolli. Piisava statistilise võimsuse tagamiseks tuleks kontrollide puhul kasutada kahekordset paralleelkambrite arvu (st vähemalt 12 paralleelnõud). Sigimisetapil kontrollrühma paralleelnõude arv kahekordistatakse (st vähemalt 24 paralleelnõud, millest igauks sisaldab üksnes ühte sigimispaari). Pärast sigimist peaksid kontrollrühma paralleelnõud sisaldama kuni 20 embrüot (kala).

**KATSE KÄIK****Katse alustamine**

25. Katse põlvkonnana F0 kasutatakse suguliselt aktiivseid täiskasvanud kalu, kes valitakse kahe kriteeriumi põhjal: vanus (üldjuhul rohkem kui 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal) ja kehamass (emastel  $\geq 300$  mg ja isastel  $\geq 250$  mg).
26. Nimetatud tingimustele vastavad emase-isase paarid paigutatakse eraldi paralleelnõudesse: katse alguses 12 paralleelnõud kontrollrühmas ja kuus paralleelnõud kemikaaliga töödeldavates rühmades. Proovinõud jaotatakse juhuslikkuse alusel kontsentratsioonirühma (nt T1–T5 ja kontroll) ja paralleelrühma (nt kontrollid A–L ja kontsentratsiooniproovid A–F) ning asetatakse seejärel kokkupuutesüsteemi, kus igas nõus kasutatakse sellele ette nähtud vooluhulka.

**Kokkupuutefingimused**

27. Katse parameetrite ja tingimuste täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Nende nõuete järgimise korral peaksid kontrollrühma kalade lõppnäitajad olema samased 4. liites loetletud väärtustele.
28. Katse ajal tuleks iga kontsentratsioonirühma ja kontrollrühma kohta vähemalt ühes katsenõus mõõta lahustunud hapniku sisaldust, pH-d ja temperatuuri. Nimetatud mõõtmisi (v.a temperatuur) tuleks teha kokkupuuteperioodi vältel vähemalt kord nädalas. Keskmine veetemperatuur peaks olema kogu uuringu vältel vahemikus 24–26 °C. Temperatuuri tuleks mõõta kokkupuuteperioodi vältel iga päev. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, kuid ei tohiks ühe katse jooksul muutuda rohkem kui  $\pm 0,5$  pH-ühikut. Ühe kontsentratsioonirühma paralleelnõude ega katse kontsentratsioonirühmade vahel ei tohiks olla statistilisi erinevusi vee temperatuuris (igapäevaste temperatuurimõõtmiste põhjal; välja arvatud põgusad kõrvalekalded).

▼ **M8****Kokkupuute kestus**

29. Katses viiakse põlvkonna F0 sigimisvõimelised kalad kemikaaliga kokkupuutesse kolmeks nädalaks. Neljandal nädalal (u 24. katsepäeval) moodustatakse põlvkond F1, põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse humaansel viisil ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse (vt punkt 34). Seejärel viiakse põlvkond F1 veel 14 nädalaks kemikaaliga kokkupuutesse (põlvkonna F1 kokkupuuteaeg on kokku 15 nädalat) ja põlvkond F2 jääb kokkupuutesse kaheks nädalaks kuni koorumiseni. Katse põhiosa kogukestus on 19 nädalat (st kuni põlvkonna F2 koorumiseni). Katse ajakava on esitatud tabelis 2 ja seda on täpsemalt selgitatud 9. liites.

**Söötmissrežiim**

30. Kalu võib sööta piiramatul kogusel soolase vee krevettide (*Artemia* spp.) 24 tunni vanuste noorjärgus isenditega, millele võib vajadusel lisada kaubanduslikult müüdavat helvessööta. Kaubanduslikult müüdavat helvessööta tuleks regulaarselt analüüsida saasteainete, näiteks kloororgaaniliste pestitsiidide, polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike ja polüklooritud bifenuülide sisalduse suhtes. Suures koguses endokriinse toimega aineid (nt fütoöstrogeenid) sisaldavat sööta, mis võib katses tekkivat reaktsiooni mõjutada, ei tohiks kasutada. Sööda ülejäägid ja väljaheidet tuleks eemaldada katsenõudest vastavalt vajadusele, näiteks iga nõu põhja ettevaatliku puhastamisega sifooni abil. Üks või kaks korda nädalas tuleks puhastada ka iga nõu külgi ja põhja (nt spaatliga kaapimise teel). Üks söötmissrežiimi näide on esitatud 5. liites. Söödaratsioon sõltub kalade arvust paralleelnõus. Seetõttu vähendatakse söödaratsiooni juhul, kui paralleelnõus esineb kalade suremust.

**Analüüsid ja mõõtmised**

31. Enne kokkupuuteperioodi algust tuleks tagada kemikaali lisamise süsteemi nõuetekohane toimimine. Tuleks kindlaks teha kõik vajalikud analüüsimeetodid, sealhulgas peaks olema piisavalt teavet uuritava kemikaali püsivuse kohta katsesüsteemis. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobivate ajavahemike järel, soovitatavalt vähemalt igal nädalal iga kontsentratsioonirühma ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutatakse samas kontsentratsioonirühmas erinevaid paralleelnõusid.
32. Katse ajal tuleks ettenähtud ajavahemike järel (nt vähemalt kolm korda nädalas) kontrollida lahendusvedeliku ja põhilahuse vooluhulka. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20$  % keskmisest mõõdetud väärtusest, võivad tulemused põhineda kas nominaalsetel või mõõdetud väärtustel. Olulisel määral kaladesse kogunevate uuritavate kemikaalide puhul võivad katsekonsentratsioonid kalade kasvades väheneda. Sellisel juhul soovatakse kohandada iga kambri katselahuse värskendamise sagedust, et hoida katsekonsentratsioone võimalikult ühtlasena.

**Vaatlused ja mõõdetavad lõppnäitajad**

33. Populatsiooni tasemel ilmneva võimaliku toime hindamiseks mõõdetavad lõppnäitajad on sigivus, viljakus, koorumine, kasv ja ellujäämus. Lisaks tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Muud mehhanistlikud lõppnäitajad on maksa vitellogeniini (vtg) mRNA või vitellogeniini valgu (VTG) tase, mis määratakse immuunanalüüsiga (28), fenotüübilised soomarkerid (nt isaskaladele iseloomulikud pärakuuime papillaarjätked), sugunäärmete koeanalüüsi põhjal määratud sugu ning neerude, maksa ja sugunäärmete histopatoloogiline hindamine (vt tabelis 1 esitatud lõppnäitajate loendit). Kõikide nimetatud konkreetsete lõppnäitajate hindamisel lähtutakse isendi geneetilise soo kindlakstegemisest riisikala isassugu määrava geeni *dmy* esinemise või puudumise põhjal (vt punkt 41). Lisaks hinnatakse kudemise aega. Peale selle võib pärakuuime papillaarjätkede loendamise teel kogutud andmete põhjal kindlaks teha lihtsa fenotüüpse soolise jagunemise, et

▼ **M8**

liigitada riisikala isendid fenotüübi järgi isaseks või emaseks. Käesoleva katsemeetodi puhul ei eeldata, et sellega on võimalik tuvastada mõõdukaid kõrvalekaldeid eeldatavast soolisest jagunemisest, kuna kalade suhteliselt väike arv proovi kohta ei taga piisavat statistilist võimsust. Pelegi uuritakse histopatoloogilise hindamise käigus sugunääret ja viiakse läbi palju põhjalikumad analüüsid sugunäärme fenotüübi hindamiseks geneetilise soo kontekstis.

34. Käesoleva katsemeetodi peamine eesmärk on hinnata uuritava kemikaali võimalikku toimet populatsioonile. Lisaks aitavad mehhanistlikud lõppnäitajad (vitellogeniin, teisesed sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed) kindlaks teha, kas mõni toime avaldub endokriinifunktsiooni vahendusel. Samas võivad kõnealuseid mehhanistlikke lõppnäitajaid mõjutada ka süsteemsed või muud mürgised toimed. Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid.

#### *Kalade humaanne surmamine*

35. Põlvkondade F0 ja F1 kokkupuute lõpetamisel ning noorkalade osaproovide võtmisel tuleks kalad surmata vajaliku koguse anesteetikumilahusega (nt trikaiinmetaansulfonaat, MS-222, CASi nr 886-86-2, kontsentratsiooniga 100–500 mg/l), mis on limaskestast ärrituse vähendamiseks puhverdatud NaHCO<sub>3</sub>-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8) kontsentratsioonis 300 mg/l. Kui kaladel ilmneb märkimisväärsete kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja kalade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud kalade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid aruannetes kajastada. Olenevalt sellest, millisel uuringu etapil kalad surmatakse, võidakse kalu säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (kalade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

#### *Marja ja kalavastsete käitlemine*

##### *Sigimispaaride marjaterade kogumine järgmise põlvkonna paljundamiseks*

36. Põlvkondade F0 ja F1 vahel kogutakse marja 4. katsenädala esimesel päeval (või vajadusel esimesel kahel päeval) ning põlvkondade F1 ja F2 vahel 18. katsenädala esimesel päeval. Põlvkond F1 on 18. katsenädalaks täiskasvanud ja elanud viljastamisest alates 15 nädalat. Kõik marjaterad tuleb eemaldada nõust üks päev enne nende kogumist tagamaks, et kõik sigimispairilt kogutud marjaterad pärinevad samast kudust. Mõnikord kannavad emased riisikalad oma marjaterasid pärast kudemist pärakuuva juures, et paigutada need substraadile. Kuna nõus substraati ei ole, võib marjaterad leida emase kala küljest või nõu põhjast. Olenevalt asukohast eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult emase kala küljest või kogutakse põhjast sifooniga 4. katsenädalal (põlvkond F0) või 18. katsenädalal (F1). Kõigist samast kontsentratsioonirühmast kogutud marjateradest moodustatakse enne inkubatsioonikambritesse paigutamist üks koondkogum.

▼ **M8**

37. Marjaterasid koos hoidvad kuduniidid eemaldatakse. Igalt sigimispaarilt (üks paar paralleelnõu kohta) kogutakse viljastatud marjaterad (kuni 20), millest moodustatakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumid, mis jaotatakse süstemaatiliselt sobivatesse inkubatsioonikambritesse (6. ja 7. liide). Kvaliteete stereomikroskoobi all on võimalik näha esimesi viljastamise/a-rengu tunnuseid, näiteks kõldkesta (koorioni) kerkimist, rakkude jagunemist või blastula kujunemist. Inkubatsioonikambri võib paigutada iga kontsentratsioonirühma jaoks valmis pandud eraldi inkubatsiooniakvaariumidesse (sel juhul tuleb nendes mõõta veekvaliteedi näitajaid ja uuritava kemikaali kontsentratsioone) või paralleelakvaariumisse, mis hakkab sisaldama koorunud vastseid (*nt* eelvastseid). Kui vaja on ka teist kogumispäeva (katse 23. päev), tuleb mõlemal päeval kogutud marjateradest moodustada koondkogum, mis jaotatakse seejärel süstemaatiliselt kontsentratsioonirühma paralleelnõudesse.

*Marjaterade kasvatamine koorumiseni*

38. Viljastatud marjaterasid loksutatakse näiteks marjainkubaatoris pidevalt õhumullide abil või marjainkubaatori üles-alla liigutamise teel. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (9. liide). Seitsmendal viljastamisjärgsel päeval loksutamine lõpetatakse või seda vähendatakse, et viljastatud marjaterad sadestuksid inkubaatori põhja. See soodustab koorumist, mis tavaliselt toimub järgmise ühe kuni kahe päeva jooksul. Igas menetlus- ja kontrollrühmas loendatakse (paralleelnõude lõikes koondatult) vastkoorunud isendid (noored vastsed; eelvastseid). Viljastatud marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul (tavaliselt 16 või 18 päeva pärast viljastamist), tunnistatakse eluvõimetuks ja jäetakse kõrvale.
39. Igasse paralleelnõusse pannakse 12 vastkoorunud isendit. Inkubatsioonikambritest kogutud vastkoorunud isenditest moodustatakse koondkogum, mis jaotatakse süstemaatiliselt paralleelnõudesse (7. liide). Selleks võib valida kontsentratsioonirühmast juhuslikult ühe vastkoorunud isendi ning lisada selle üksteise järel juhuslikult valitud paralleelakvaariumisse. Iga nõu peaks sisaldama võrdset arvu ( $n = 12$ ) koorunud vastseid (mitte rohkem kui 20 vastset nõu kohta). Kui vastsete arv ei ole kontsentratsiooni rühma kõikide paralleelnõude täitmiseks piisav, soovitatakse moodustada võimalikult palju 12 vastsega paralleelnõusid. Vastsete ohutuks käitlemiseks saab kasutada suure avaga klaaspipetti. Kõik üle jäävad vastsed surmatakse humaanselt anesteetikumi abil. Mõne nädala jooksul enne sigimispaaride ettevalmistamist tuleks iga paralleelnõu puhul registreerida esimese kudemissündmuse päev.

**Sigimispaaride ettevalmistamine***Uimede lõikamine ja genotüübilise soo kindlakstegemine*

40. Genotüübiline sugu tehakse uimest lõigatud tükkide abil kindlaks 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal (st põlvkonna F1 puhul 12.–13. katsenädalal). Kõik nõus olevad kalad tuimastatakse (kasutades heakskiidetud meetodit, *nt* IACUC) ning iga kala sabauime selja- või kõhupoolsest otsast võetakse väike koeproov, et teha kindlaks isendi genotüübiline sugu (29). Paralleelrühma kalu võib hoida paralleelnõus väikestes puurides (võimaluse korral üks kala puuri kohta). Teise variandina võib igas puuris hoida kahte kala, kui need on üksteisest eristatavad. Üks eristamise meetod on teha koeproovi võtmisel sabauime erinevad lõiked (*nt* ühel kalal seljapoolsest ja teisel kõhupoolsest otsast).

▼ **M8**

41. Riisikala genotüübiline sugu määratakse Y-kromosoomis asuva tuvastatud järjestusega geeni (*dmy*) põhjal. *Dmy* olemasolu näitab, et tegemist on XY-isendiga, olenemata kala fenotüübist, samas kui *dmy* puudumine osutab XX-isendile, olenemata fenotüübist (30, 31). Igast uimetükist eraldatakse desoksüribonukleinhape (DNA) ja *dmy* olemasolu või puudumise kindlakstegemiseks saab kasutada polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodeid (vt käesoleva lisa peatüki C.419. liide või (29) 3. ja 4. liide).

*Sigimispaaride moodustamine*

42. Genotüübilise soo andmete põhjal moodustatakse XX-XY sigimispaarid, olenemata välisest fenotüübist, mis võib uuritava kemikaaliga kokku puutudes muutuda. Iga kala genotüübilise soo kindlakstegemisele järgneval päeval valitakse igast paralleelnõust juhuslikult kaks XX-kala ja kaks XY-kala ning neist moodustatakse kaks XX-XY sigimispääri. Kui paralleelnõu ei sisalda kahte XX- või XY-kala, tuleb vastavad kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest. Eesmärk on saada soovitatud arvul paralleelseid sigimispääre nii igasse kontsentratsioonirühma (12 paari) kui ka kontrollrühma (24 paari). Sigimispääride moodustamisel tuleks välistada ilmsete kõrvalekalletega kalad (probleemid ujupõiega, deformeerunud selgroog, äärmuslikult suur või väike kasv jne). Põlvkonna F1 sigimisetapil peaks iga paralleelnõu sisaldama üksnes ühte sigimispääri.

**Noorkalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine***Sigimispääridesse mittekuuluvate kalade proovide võtmine*

43. Pärast sigimispääride moodustamist surmatakse valimata jäänud kalad humaanselt 12.–13. katsenädalal (põlvkond F1), et mõõta noorkalade lõppnäitajaid. Äärmiselt oluline on käidelda kalu nii, et säiliks sigimispääride valimise eesmärgil kindlaks tehtud genotüübilise soo tuvastamise võimalus. Kõigi kogutud andmeid analüüsitakse konkreetse kala genotüübilisest soost lähtudes. Iga kala kasutatakse erinevates lõppnäitajate mõõtmistes, mis hõlmavad järgmist: noorkalade ellujäämismäärad (7.–12./13. katsenädal, põlvkond F1), pikkuse (kui sabauime on geneetilise soo analüüsiks kasutatud proovide võtmise tõttu lühendatud, võib mõõta standardpikkust; kui *dmy* määramiseks on sabauime selja või kõhu poolt üksnes osaliselt kärbitud, võib mõõta üldpikkust) ja kehamassi (st märgmass, kuivatuspaberiga kuivatult) juurdekasv, maksa *vtg* mRNA (või VTG) ja pärakuuime papillaarjätkeid (vt tabelid 1 ja 2). Pange tähele, et kontsentratsioonirühma keskmise juurdekasvu arvutamiseks tuleb mõõta ka sigimispääride massid ja pikkused.

*Koeproovide võtmine ja vitellogeniisisalduse mõõtmine*

44. Maks eraldatakse ning säilitatakse temperatuuril  $\leq -70$  °C kuni *vtg* mRNA (või VTG) mõõtmiseni. Kala saba koos pärakuuimega konserveeritakse sobivas (nt Davidsoni) fiksaatoris või pildistatakse nii, et hiljem oleks võimalik loendada pärakuuime papillaarjätkeid. Soovi korral võib sellel etapil konserveerimiseks proove võtta ka muudest kudedest (nt suguäärmed). Maksa VTG kontsentratsioon tuleks määrata homoloogse ELISA meetodiga (riisikala puhul soovitatav menetlus on esitatud käesoleva lisa peatüki C.486. liites). Teise variandina on USA Keskkonnakaitseamet kirjeldanud *vtg* mRNA kvantitatiivse määramise meetodeid: *vtg* I geeni mRNA



▼ **M8**

eraldamine maksaproovist ja *vtg I* geeni kooptide loendamine (ühe nano grammi mRNA üldkoguse kohta) kvantitatiivse PCR-meetodiga (29). Selle asemel, et loendada *vtg* geeni kooptaid nii kontrollrühmas kui ka kontsentratsioonirühmades, võib vähem ressursinõudliku ja tehniliselt lihtsama meetodina uurida *vtg I* ekspressiooni suhtelist muutust kontrollrühma ja kontsentratsioonirühmade võrdluses.

*Teisesed sootunnused*

45. Tavaoludes on ainult suguküpsel isastel riisikaladel papillaarjätked, mis kasvavad teiseste sootunnustena mõnele pärakuuime kiirelülile ning mida saab kasutada endokriinfunktsiooni kahjustava toime biomarkerina. Pärakuuime papillaarjätkede (papillaarjätketega kiirelülile) loendamise meetod on esitatud 8. liites. Isendi pärakuuime papillaarjätkede arvu kasutatakse ka selleks, et liigitada isendid välise fenotüübi järgi isaseks või emaseks ning arvutada selle põhjal sooline jaotumine igas paralleelnõus. Rohkem kui 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse isaseks; 0 papillaarjätkega riisikala liigitatakse emaseks.

**Sigivuse ja viljakuse hindamine**

46. Sigivust ja viljakust hinnatakse põlvkonna F0 puhul 1.–3. katsenädalal ning põlvkonna F1 puhul 15.–17. katsenädalal. Igalt sigimispaarilt kogutakse 21 järjestikusel päeval marjaterasid. Igal hommikul eemaldatakse marjaterad ettevaatlikult võrku püütud emaste küljest ja/või kogutakse sifooni abil akvaariumi põhjast. Iga päev registreeritakse kõigi paralleelsete sigimispaaride sigivuse ja viljakuse näitajad. Sigivuse näitajana käsitatakse koetud marjaterade arvu ning viljakust mõõdetakse loendamise hetkeks viljastatud ja eluvõimeliste marjaterade arvu põhjal. Marjaterad tuleks loendada võimalikult kiiresti pärast kogumist.
47. Sigivuse registreerimiseks märgitakse iga päev üles iga paralleelse sigimispaari marjaterade arv, mida analüüsitakse soovitatud statistiliste meetoditega, kasutades paralleelnõude keskmisi väärtusi. Sigimispaari viljakuse näitaja on sellelt paarilt pärit viljastatud marjaterade arv, mis on jagatud sellelt paarilt pärit marjaterade koguarvuga. Statistiliselt analüüsitakse viljakust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta. Kooruvuse näitaja on vastkoorunud isendite arv, mis on jagatud paralleelnõusse pandud embrüote arvuga (tavaliselt 20). Statistiliselt analüüsitakse kooruvust suhtarvuna iga paralleelnõu kohta.

**Täiskasvanud kalade proovide võtmine ja lõppnäitajate hindamine***Sigimispaaridesse kuuluvate kalade proovide võtmine*

48. Pärast 17. katsenädalat (st pärast põlvkonna F2 edukat sigitamist) surmatakse põlvkonna F1 täiskasvanud kalad humaansel viisil ja hinnatakse nende erinevaid lõppnäitajaid (vt tabelid 1 ja 2). Pärakuuime papillaarjätkede loendamiseks (vt 8. liide) tehakse pärakuuimedest pildid ja/või eemaldatakse saba vahetult pärakuava tagant tehtava löikega ning fikseeritakse see hilisemaks papillaarjätkede loendamiseks. Soovi korral võib sellel etapil võtta arhiveerimiseks proovi sabauimest, mis võimaldab kontrollida geneetilist sugu (*dmy*). Vajadusel võib võtta koeproovi, et kontrollida konkreetsete kalade sugu korduva *dmy* analüüsi abil. Enne kogu keha sobivasse (nt Davidsoni) fiksaatorisse asetamist avatakse kehaõõnsus, et võimaldada selle perfusiooni fiksaatoriga. Ent kui enne fikseerimist kasutatakse sobivat fiksaatori sissepääsu soodustavat meetodit, siis ei ole vaja kehaõõnsust avada.

▼ **M8***Histopatoloogiline analüüs*

49. Iga kala analüüsitakse histoloogiliselt, et leida võimalikke patoloogiaid sugunäärmete koes (30, 29). Nagu on osutatud punktis 33, võivad süsteemsed või muud mürgised toimed mõjutada käesoleva katsemeetodiga hinnatavaid muid mehhanistlikke lõppnäitajad (VTG, teised sootunnused ja mõned sugunäärmete histopatoloogiaga seotud toimed). Seetõttu võidakse üksikasjalikult hinnata ka maksa ja neerude histopatoloogiat, et mehhanistlikes lõppnäitajates avalduvaid reaktsioone paremini mõista. Ent juhul, kui nimetatud üksikasjalikke hindamisi ei tehta, tuleks siiski tähele panna ja aruannetes kajastada histopatoloogilise hindamise käigus juhuslikult avastatud suuri kõrvalekaldeid. Kaaluda võib meetodit, mille puhul alustatakse analüüsi suurima kemikaalkontsentratsiooniga rühmast (võrreldes kontrollrühmaga) ja jätkatakse allapoole liikudes kontsentratsioonirühmani, kus toimet ei avaldu, kuid soovitatav on tutvuda asjakohaste histopatoloogia juhenditega (29). Üldjuhul töödeldakse kõiki proove / tehakse proovidest lõiked, mida patoloog seejärel analüüsib. Seoses allapoole liikumise meetodi kasutamisega tuleb märkida, et Rao-Scotti kohandusega Cochrane'i-Armitage'i lõiktestis (RSCABS) lähtutakse eeldusest, et dooside kasvades suureneb ka bioloogiline toime (patoloogia). Seetõttu on järelduste statistiline võimsus väiksem, kui vaadeldakse üksnes ühte suurt doosi ilma vahepealsete doosideta. Selline meetodi võib olla vastuvõetav juhul, kui suure doosi toime puudumises veendumiseks ei ole vaja teha statistilist analüüsi. Kõnealuse hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärme fenotüüp.

*Muud tähelepanekud*

50. MEOGRTga saadavate andmete abil saab samaaegselt hinnata (nt tõendite kaalukuse meetodiga) vähemalt kahte liiki kahjuliku toime radasid, mis viivad sigimisvõime häireni: a) endokriinse toime rajad, mille puhul esinevad endokriinfunktsiooni häired hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) teljel, ja b) muu kui endokriinse mürgisuse kaudu ellujäämist, kasvamist (pikkuses ja massis) ja sigimist pärssivad rajad. Käesolev katse hõlmab ka tavaliselt kroonilise mürgisuse katsetes (nt kogu elutsükli ja varase elujärgu katsed) mõõdetavaid lõppnäitajaid, mille abil saab hinnata nii endokriinse mürgisuse radasid kui ka muu kui endokriinse mehhanismi kaudu avalduvat mürgisust. Katse ajal tuleks iga päev vaadelda kalade käitumist ja registreerida ebatavaline käitumine. Lisaks tuleks registreerida suuremuse näitajad ja arvatada kalade ellujäämist kuni väljapraakimise etapini (6./7. katsenädal), väljapraakimisest kuni noorkalade proovide võtmiseni (9.–10. viljastamisjärgne nädal) ning paaride moodustamisest kuni täiskasvanud kalade proovide võtmiseni.

Tabel 1

## Ülevaade MEOGRT lõppnäitajatest (\*)

Arengujärk	Lõppnäitaja	Põlvkond
Embrüo (2. viljastamisjärgne nädal)	Koorumine (% ja koorumiseni kulunud aeg)	F1, F2
Maim (4. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
Noorkala (9. või 10. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	

## ▼ M8

Arengujärk	Lõppnäitaja	Põlvkond
	Vitellogeniin (mRNA või valk)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Sooline jaotumine välistunnuste järgi	
	1. kudemiseni kulunud aeg	
Täiskasvanu (12.-14. viljastamisjärgne nädal)	Paljunemine (sigivus ja viljakus)	F0, F1
Täiskasvanu (15. viljastamisjärgne nädal)	Ellujäämus	F1
	Kasv (pikkus ja mass)	
	Teisesed sootunnused (pärakuuime papillaarjätked)	
	Histopatoloogiline analüüs (sugunääre, maks, neerud)	

(\*) Neid lõppnäitajaid tuleb statistiliselt analüüsida.

## AJAKAVA

51. MEOGRT näitlik ajakava on esitatud tabelis 2. MEOGRT hõlmab 4-nädalast põlvkonna F0 täiskasvanud isendite ja 15-nädalast põlvkonna F1 kokkupuute ning teise põlvkonna (F2) kokkupuuteperioodi, mis kestab kuni koorumiseni (2. viljastamisjärgne nädal). Kokkuvõtte MEOGRT käigus läbi viidavatest tegevustest on esitatud 9. liites.

Tabel 2

## MEOGRT kokkupuute ja mõõtmise lõppnäitajate ajakava

MEOGRT kokkupuute ja lõppnäitajate ajakava																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Arengujärk					Embrüo				Vastne				Maim			Noorkala	Täiskasvanu		
Lõppnäitajad																			
Sigivus	F <sub>0</sub>																	F <sub>1</sub>	
Viljakus	F <sub>0</sub>																	F <sub>1</sub>	
Koorumine					F <sub>1</sub>														F <sub>2</sub>
Ellujäämus					F <sub>1</sub>								F <sub>1</sub>						F <sub>1</sub>
Kasv				F <sub>0</sub>									F <sub>1</sub>						F <sub>1</sub>
Vitellogeniin													F <sub>1</sub>						
Teisesed sootunnused													F <sub>1</sub>						F <sub>1</sub>
Histopatoloogiline analüüs																			F <sub>1</sub>
Katsenädal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

• Katseplaani hõlmab 7 paralleelrühma:  
 ○ 5 rühma, mida mõjutatakse uuritava kemikaaliga;  
 ○ 2 kontrollrühma (lahusti kasutamise korral 4).  
 • Rühmade koosseis:  
 ○ 12 paralleelnõud sigivuse, täiskasvanu isendite patoloogia ja SSC uurimiseks (10.–18. nädalat);  
 ○ 6 paralleelnõud koorumise, ellujäämise, vtg ning noorkalade SSC ja kasvu uurimiseks (1.–9. nädal)

SSC – teisesed sootunnused; näd – nädalat;  
 vtg – vitellogeniin

▼ **M8****ANDMED JA ARUANDLUS****Statistiline analüüs**

52. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide katsealuste kalade puhul, tuleks andmeid analüüsida mõlema genotüübilise soo (XY-isased ja XX-emased) kohta eraldi. Selle tegemata jätmine vähendab oluliselt mis tahes analüüsi statistilist võimsust. Andmete statistiline analüüs peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (32). Täiendavaid juhiseid statistilise analüüsi tegemiseks on esitatud 10. liites.
53. Katseplaani ja valitud statistilised testid peaksid tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada bioloogiliselt olulisi lõppnäitajate muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) (32). Konkreetsetest toime avaldumise kontsentratsioonidest aru andmine võib sõltuda asjaomasest õigusraamistikust. Kindlaks tuleks teha iga olulise tuvastatava või hinnatava lõppnäitaja protsentuaalne muutus. Katseplaani tuleks sellest lähtuvalt kohandada. On vähetõenäoline, et kõikide lõppnäitajate puhul täheldatakse sama protsentuaalset muutust ning et on võimalik koostada selline katseplaani, kus kõnealused kriteeriumid on täidetud kõikide lõppnäitajate puhul; seepärast on tähtis keskenduda nõuetekohase katse kavandamisel lõppnäitajatele, mis on asjaomase katse puhul olulised. Andmete töötlemise ja sobivaima statistilise testi või mudeli valimise lihtsustamiseks on 10. liites esitatud statistiline vooskeem ja juhised. Võib kasutada ka muid statistilisi meetodeid, kui need on teaduslikult põhjendatud.
54. Igas paralleelide rühmas on vaja analüüsida varieeruvust dispersioonanalüüsi või sagedustabeli abil ning kasutada selle analüüsi alusel valitud piisavaid ja asjakohaseid statistilisi analüüsimeetodeid. Igal eraldi kontsentratsioonil ja kontrollrühmas saadud tulemuste mitmeseks võrdlemiseks soovitatakse pideva tunnuse puhul kasutada muutujate sammuviisilise elimineerimisega meetodit (nt Jonckheere'i-Terpstra testi). Kui andmete puhul ei täheldata monotoonset kontsentratsioonist sõltuvust, tuleks kasutada Dunnetti või Dunni testi (pärast andmete sobivat teisendamist, kui see on vajalik).
55. Sigivuse puhul tuleks marjaterasid loendada iga päev, kuid analüüsis võib kasutada marjaterade koguarvu või kordusmõõtmise näitajaid. Kõnealuse lõppnäitaja analüüsimist on täpsemalt selgitatud 10. liites. Raskusastme kujul esitatavate histopatoloogia andmete jaoks on välja töötatud uus statistiline test: Rao-Scotti kohandusega Cochran'e-i-Armitage'i lõiktest (RSCABS) (33).
56. Protokollis tuleks kajastada kõik kemikaaliga kontsentratsioonirühmades ilmnenud lõppnäitajad, mis erinevad oluliselt vastavatest kontrollrühma väärtustest.

**Andmete analüüsiga seotud kaalutlused***Ebaõnnestunud kokkupuutetasemekatsete andmete kasutamine*

57. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelrühma või terve kokkupuutetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Määratluse kohaselt esineb selge mürgisus juhul, kui 3. ja 9. viljastamisjärgse nädala vahel mis tahes paralleelrühmas esinenud surmajuhtumite arv on  $> 4$  ja see ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Muud selge mürgisuse nähud on järgmised: veritsemine, ebatavaline

**▼M8**

käitumine, ebatavaline ujumisviis, isutus ja muud kliinilised haigustunnused. Subletaalse mürgisuse puhul võib olla vajalik kvalitatiivne hindamine; selle tegemisel peaks alati olema aluseks võrdlus lahendusveega (üksnes puhas vesi) kontrollrühmaga. Kui suurima kontsentratsiooniga rühma(de)s esineb selge mürgisus, soovitatakse need rühmad analüüsist välja jätta.

*Lahustiga kontrollid*

58. Lahusti kasutamist tuleks kaaluda üksnes viimase abinõuna, kui kõik muud kemikaali lisamise võimalused on läbi vaadatud. Kui kasutatakse lahustit, tuleb samal ajal teha kontrollkatse lahendusveega. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti võimalikku mõju. Seda tehakse lahustiga kontrollrühma ja lahendusveega kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõige asjakohasemad lõppnäitajad, mida tuleks kõnealuses analüüsis arvesse võtta, on kasvuga (massiga) seotud tegurid, kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende lõppnäitajate puhul tuvastatakse lahendusveega kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahustiga kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahendusveega kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovitatakse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahustiga ja lahendusveega) ühendatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahendusveega või ainult lahustiga kontrollrühmaga.

**Katseprotokoll**

59. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

*Uuritav kemikaal:*

— füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;

— kemikaali identimisandmed;

ühest koostisosast koosnev aine:

— füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;

— kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;

mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:

— võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

*Katsealune liik:*

— teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud marjaterade kogumise ja järgneva käitlemise meetod.

*Katsetingimused:*

— valgusrežiim(id);

— katseplaan (nt kambrite suurus, materjal ja veesisaldus, katsekambrite ja paralleelrühmade arv, vastkoorunud isendite arv paralleelnõu kohta);

**▼M8**

- põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);
- uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);
- meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja nominaalsed katsekontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali sisaldust tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku sisaldus, kloorijääkide sisaldus (kui on mõõdetud), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;
- nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku sisaldus;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

*Tulemused:*

- tõendid selle kohta, üldised nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;
- järgmised andmed kontrollrühma (ja selle kasutamise korral lahustiga kontrollrühma) ja kontsentratsioonirühmade kohta: koorumine (kooruvus ja koorumiseni kulunud aeg) põlvkondades F1 ja F2, koorumisjärgne ellujäämus põlvkonnas F1, kasv (pikkus ja kehamass) põlvkonnas F1, genotüübiline sugu ja sooline eristumine (nt pärakuuime papillaarjätmete ja sugunäärme histoloogia põhjal kindlaks tehtud teised sootunnused) põlvkonnas F1, fenotüübiline sugu põlvkonnas F1, teised sootunnused (pärakuuime papillaarjätmed) põlvkonnas F1, vtg mRNA (või VTG valk) põlvkonnas F1, põlvkonna F1 histopatoloogiline analüüs (sugunäär, maks ja neerud) ning põlvkondade F0 ja F1 paljunemise näitajad (sigivus ja viljakus); (vt tabelid 1 ja 2);
- statistilise analüüsi puhul kasutatud meetod (regressioonanalüüs või dispersioonanalüüs) ja andmetöötlusviis (kasutatud statistilised testid ja mudelid);
- täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;
- vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel  $p = 0,05$ ); vajaduse korral  $EC_x$  iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 90 % või 95 %) ja graafik selle arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, kontsentratsioonist sõltuvuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.

## ▼ M8

60. Lõppnäitajate mõõtmistulemuste puhul tuleb esitada keskväärtused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).

## KIRJANDUS

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (2) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D.E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S.W., Johnson, R., Hardman, R.C., Flynn, K. ja Au, D.W.T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1–36.
- (3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (4) Benoit, D.A., Mattson, V.R. ja Olson, D.L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (5) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925–1930.
- (6) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. ja Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552–2560.
- (7) Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H. ja Honjo, T. (2002). Effects of 17 $\beta$ -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (8) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. ja Kobayashi, K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692–1698.
- (9) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. ja Kobayashi, K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487–1496.
- (10) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja Tatarazako, N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 $\beta$ -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288–295.
- (11) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M. ja Tatarazako, N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 $\beta$ -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78–86.
- (12) Nakamura, A., Tamura, I., Takanobu, H., Yamamuro, M., Iguchi, T. ja Tatarazako, N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11–23.
- (13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Kättesaadav aadressil <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (14) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P. ja McLachlan, M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593–599.

## ▼M8

- (15) 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.), Majanduskoostöö ja Arengu organisatsioon, Pariis.
- (16) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (17) Denny, J.S., Spehar, R.L., Mead, K.E. ja Yousuff, S.C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) Koger, C.S., Teh, S.J. ja Hinton, D.E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287–1293.
- (19) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. ja Tanaka, M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (20) Gormley, K. ja Teather, K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330–338.
- (21) Käesoleva lisa peatükk C.15 „Kala embrüo ja rebukotiga vastsetega tehtav lühiajaline toksilisuse katse“.
- (22) Käesoleva lisa peatükk C.37 „21-päevane katse kaladega: lühiajaline sõelkatse östrogeense ja androgeense toime ning aromataasi inhibeerimise kontrollimiseks“.
- (23) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.
- (24) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.
- (25) Käesoleva lisa peatükk C.47 „Varases arengujärgus kaladele avalduva mürgisuse katse“.
- (26) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.
- (27) Wheeler, J.R., Panter, G.H., Weltje, L. ja Thorpe, K.L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (28) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M. ja Iguchi, T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.
- (29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (30) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M. ja Scharlt, M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S. ja Sakaizumi, M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations. *Zoological Science* 21: 613–619.
- (32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina), OECD Publishing, Pariis.
- (33) Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.



**▼M8***1. liide***MÕISTED**

**Asustustihedus** – kalade arv vee ruumalaühiku kohta.

**Biomassisisaldus** – kalade märgmass vee ruumalaühiku kohta.

**EC<sub>x</sub>** (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC<sub>50</sub> on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

**ELISA** – ensüümimmunosorptsioonanalüüs.

**HAS-telg** – hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

**IACUC** – Institutional Animal Care and Use Committee (institutsionaalne loomade hooldamise ja kasutamise komitee).

**IUPAC** – International Union of Pure and Applied Chemistry (Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit).

**Kemikaal** – aine või segu.

**Kooruvus** – vastkoorunud isendite arv: inkubaatorisse pandud embrüote arv.

**Letaalne mediaankontsentratsioon (LC<sub>50</sub>)** – uuritava kemikaali hinnanguline kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel letaalne 50 %-le katseorganismidest.

**Läbivoolukatse** – katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

**Pikkus sabauime hargnemiskohani** – kala pikkus ninamiku tipust kuni sabauime keskmiste kiirte otsani; kasutatakse kalade puhul, kelle selgroo lõppemiskohta on keeruline kindlaks teha ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Sigivus** – marjaterade arv.

**SMILES** – Simplified Molecular Input Line Entry Specification (lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem).

**Standardpikkus** – kala pikkus ninamiku tipust viimase selgroolüli tagaotsani või hüpuraalplaadi külje keskosa tagaotsani. Lihtsamalt öeldes ei hõlma see pikkus sabauime pikkust ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Täheldatava toime puudumise kontsentratsioon (NOEC)** – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) toimet ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähima täheldatava toime avaldumise kontsentratsiooni.

▼ **M8**

**Uuritav kemikaal** – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB** – tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**Viljakus** – eluvõimeliste marjaterade arv: sigivus.

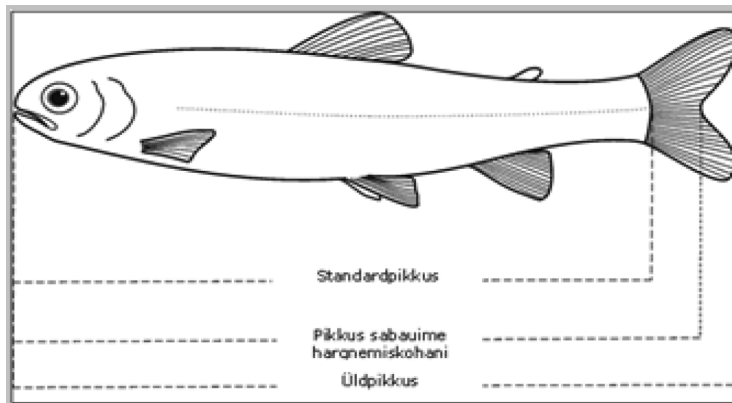
**VTG** – vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

**Vähima täheldatud toime avaldumise kontsentratsioon (LOEC)** – uuritava kemikaali väikseim kasutatud kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju võrdluses kontrolliga. Kemikaal peaks kõikidel kõnealusest kontsentratsioonist suurematel kontsentratsioonidel avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui kõnealusel kontsentratsioonil. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas kõnealune kontsentratsioon (ja sellest lähtuvalt ka täheldatava toime puudumise kontsentratsioon) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 5. ja 6. liites.

**Üldpikkus** – kala pikkus ninamiku tipust sabauime pikema hõlma tipuni; tavaliselt surutakse hõlmad mõõtmiseks keskjoonele kokku. Seda pikkust mõõdetakse piki sirgjoont, mitte mööda keha kumerust ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

*Joonis 1.*

**Kasutatavate eri pikkuste kirjeldus**



▼ **M8**

## 2. liide

## MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Piirsaldus
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Kloorijäägid	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilistes ühendites sisalduva kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼ **M8**

## 3. liide

## MEOGRT PUHUL KASUTATAVAD KATSETINGIMUSED

- |   |  |
|---|--|
| 1. Soovitatav liik                                  | Jaapani riisikala ( <i>Oryzias latipes</i> )   |
| 2. Katse tüüp                                       | Pideva läbivooluga katse   |
| 3. Vee temperatuur                                  | Nominaalne katsetemperatuur on 25 °C. Kogu katseperioodi keskmine temperatuur igas nõus on 24–26 °C.   |
| 4. Valgustuse kvaliteet                             | Luminofoorlambid (laia spektriga ja valgusvooga ~150 lm/m <sup>2</sup> ) (valgustihedusega ~150 lx).   |
| 5. Valgusrežiim                                     | 16 tundi valgust, 8 tundi pimedust   |
| 6. Biomassisisaldus                                 | F0: 2 täiskasvanut paralleelnõu kohta; F1: alguses kuni 20 marjatera (embrüot) paralleelnõu kohta, pärast koorumist 12 embrüot paralleelnõu kohta, seejärel sigimisetapis 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 2 täiskasvanut (XX-XY sigimispaar)   |
| 7. Katsekambri minimaalne kasutatav ruumala         | 1,8 l (nt katsekamber suurusega 18 x 9 x 15 cm)  |
| 8. Katselahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses     | Vähemalt 5 ja kuni 16 lahuse uuendamist päevas (või vooluhulk 20 ml/min)   |
| 9. Katseorganismide vanus katse alguses             | F0: > 12. viljastamisjärgne nädal, aga soovitatavalt mitte rohkem kui 16. viljastamisjärgne nädal  |
| 10. Organismide arv paralleelnõu kohta              | F0: 2 kala (isase ja emase paar); F1: kuni 20 kala (marjatera) paralleelnõu kohta (saadud põlvkonna F0 või F1 sigimispaaridelt)  |
| 11. Kontsentratsioonirühmade arv                    | 5 uuritava kemikaaliga töödeldavat kontsentratsioonirühma ja vajalikud kontrollrühmad  |
| 12. Paralleelnõude arv kontsentratsioonirühma kohta | Vähemalt 6 paralleelnõud uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma kohta ja vähemalt 12 paralleelnõud kontrollrühma ja lahustiga kontrollrühma (kui kasutatakse) kohta (põlvkonna F1 sigimisetapil paralleelnõude arv kahekordistatakse)   |
| 13. Organismide arv katses                          | Vähemalt 84 kala põlvkonnas F0 ja 504 kala põlvkonnas F1. (Lahustiga kontrolli kasutamise korral 108 kala põlvkonnas F0 ja 648 kala põlvkonnas F1.) Loendatav üksus on eelvastsejärgule järgnevas arengujärgus olev vastne.  |
| 14. Söötmisrežiim                                   | Kaladele söödetakse piiramatus koguses soolase vee krevettide ( <i>Artemia</i> spp.) 24 tunni vanuseid noortjärgus isendeid, millele vajadusel lisatakse kaubanduslikult müüdavat helvessööta (tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide on esitatud 5. liites). |

▼ **M8**

15. Aereerimine	Üksnes siis, kui lahustunud hapniku sisaldus hakkab langema alla 60 % küllastuskontsentratsioonist
16. Lahjendusvesi	Puhas pinnavesi, kaevuvesi, taastatud vesi või dekloritud kraanivesi
17. Kokkupuuteaeg	Esmaselt 19 nädalat (põlvkonnast F0 kuni põlvkonna F2 koorumiseni)
18. Bioloogilised lõppnäitajad (esmased)	Kooruvus (F1 ja F2); ellujäämus (F1, koorumisest kuni 4. viljastamisjärgse nädalani (vastsejärgu lõpp / maimujärgu algus), 4. kuni 9. (või 10.) viljastamisjärgse nädalani (maimust noorkalaks) ja 9. kuni 15. viljastamisjärgse nädalani (noorkalast kuni täiskasvanud kalade surmamiseni)); kas (F1, pikkus ja mass 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); teised sootunnused (F1, pärakuuime papillaarjätked 9. ja 15. viljastamisjärgsel nädalal); vitellogeniin (F1, <i>vfg</i> mRNA või VTG valk 15. viljastamisjärgsel nädalal); fenotüübiline sugu (F1, sugunäärme histoloogia põhjal 15. viljastamisjärgsel nädalal); paljunemine (F0 ja F1, sigivus ja viljakus 21 päeva vältel); aeg kudemiseni (F1); histopatoloogia (F1, sugunääre, maks ja neerud 15. viljastamisjärgsel nädalal)
19. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid	Lahustunud hapniku sisaldus $\geq 60$ % õhu küllastuskontsentratsioonist; vee keskmine temperatuur kogu katse vältel 24–26°C; sigimise õnnestumine $\geq 65$ % kontrollrühma(de) emaste puhul; keskmine päevane sigivus kontrollrühma(de)s $\geq 20$ marjatera; keskmine kooruvus kontrollrühmades $\geq 80$ % (nii põlvkonnas F1 kui ka põlvkonnas F2); kontrollrühmades keskmine koorumisjärgne ellujäämus 3. viljastamisjärgse nädalani $\geq 80$ % ja 3. viljastamisjärgsest nädalast kuni surmamiseni $\geq 90$ % (F1); uuritava kemikaali kontsentratsioon lahuses peab olema püsivalt vahemikus $\pm 20$ % keskmisest mõõdetud väärtusest.

▼ **M8**

## 4. liide

## TÜÜPILISTE KONTROLLVÄÄRTUSTEGA SEOTUD JUHISED

Tuleb arvestada, et nimetatud kontrollväärtused põhinevad vähesel arvul valideerimisuringutel ja neid võidakse täiendavate kogemuste valguses muuta.

*Kasv*

Kõigi proovis sisalduvate kalade massi ja pikkust mõõdetakse 9. (või 10.) ja 15. viljastamisjärgsel nädala. Kirjeldatud katse-eeskirjast lähtuvalt peaks kalade eeldatav märgmass 9. viljastamisjärgsel nädala olema isaste puhul 85–145 mg ja emaste puhul 95–150 mg. Eeldatav mass 15. viljastamisjärgsel nädalal peaks olema isaste puhul 250–330 mg ja emaste puhul 280–350 mg. Üksikisendite puhul võib küll esineda märkimisväärseid kõrvalekaldeid esitatud vahemikest, aga kui mõne kontrollrühma kaalutud keskmine näitaja peaks jääma nendest vahemikest oluliselt väljapoole, siis võib see osutada probleemidele, mis on tingitud söötmisest, temperatuuri reguleerimisest, vee kvaliteedist, haigustest või nende tegurite mis tahes kombinatsioonist.

*Koorumine*

Koorumise edukuse määr kontrollrühmades on üldjuhul 90 % kandis, kuid ka 80 % tase ei ole ebatavaline. Kui koorumise edukus jääb alla 75 %, võib see osutada arenevate marjaterade puudulikule loksutamisele või marjaterade hoole-tule käitlemisele (nt surnud marjaterade õigel ajal eemaldamata jätmine, mis põhjustab seentega saastumist).

*Ellujäämus*

Ellujäämus koorumisest kuni 3. viljastamisjärgse nädalani ja sealt edasi on kontrollrühmades tavaliselt vähemalt 90 %, kuid ka 80 % ellujäämus kontrollrühma kalade varastes elujärgkudes ei ole veel probleem. Muret tuleks tunda juhul, kui kontrollrühmades jääb ellujäämus alla 80 %, sest see võib osutada akvaariumide puudulikule puhastamisele, mis põhjustab kalavastsete surma haiguste või vähese lahustunud hapniku sisaldusest tingitud lämbumise tõttu. Suremust võivad põhjustada ka katsenõu puhastamise käigus tekitatud vigastused ja kalavastsete sattumine nõu äravoolusüsteemi.

*Vitellogeniini geen*

Kui *vitellogeniini* (*vtg*) geeni absoluuttasemed, mida väljendatakse koopiate arvuna ühe nanogrammi mRNA üldkoguse kohta, võivad erinevate kasutatavate menetluste või seadmete tõttu laborite vahel suuresti erineda, siis suhtarvuna peaks kontrollrühmades emaste kalade *vtg* tase olema ligi 200 korda kõrgem kui isastel. Vahel võivad emaste ja isaste näitajad erineda lausa 1 000–2 000 korda, aga alla 200 jääv suhtarv võib osutada probleemidele proovi saastumisega või kasutatud menetluse ja/või reaktiividega.

*Teisesed sootunnused*

Isaste kalade puhul on teiseste sootunnuste (papillaarjätketega lülide arv pära-kuuime kiirtel) normaalvahemik 9.–10. viljastamisjärgsel nädalal 40–80 papillaar-jätketega lüli. 15. viljastamisjärgseks nädalaks peaks see näitaja kontrollrühma isastel olema vahemikus 80–120 ja emastel 0. Teadmata põhjustel võivad mõnel üksikul isasel papillaarjätkeid puududa 9. viljastamisjärgsel nädalal, aga kuna kõigil kontrollrühma isastel kujunevad need välja 15. viljastamisjärgseks nädalaks, siis on see kõige tõenäolisemalt tingitud hilisest arengust. Kui papillaarjätkeid leitakse ka kontrollrühma emastelt, siis osutab see XX-isaste esinemisele populatsioonis.

**▼ M8***XX-isased*

XX-isaste tavapärane esinemissagedus temperatuuril 25°C kasvatatud kalade seas näib olevat kuni 4 % ning kõrgematel temperatuuridel see suureneb. Tuleks rakendada sobivaid meetmeid, et XX-isaste osakaalu populatsioonis vähendada. Kuna XX-isaste esinemine on arvatavasti seotud geneetiliste ja pärilike põhjustega, saab nende esinemist populatsioonis tõhusalt vähendada kasvatatava kalavaru jälgimisega ja XX-isaste väljapraakimisega kalade paljundamisel.

*Kudemisaktiivsus*

Enne sigivuse hindamist tuleks kudemisaktiivsust kontrollrühma paralleelnõudes iga päev jälgida. Kudemisaktiivsuse tundemärkide esinemist saab kontrollrühma paaridel vaatluse teel kvalitatiivselt hinnata. Enamik kontrollrühma paare peaks olema alustanud kudemist 12.–14. viljastamisjärgseks nädalaks. Kui selleks ajaks tekkinud kudevate paaride arv on väike, osutab see probleemidele kalade tervise, suguküpsuse või heaoluga.

*Sigivus*

Terved ja hästi söödetud riisikalad koevad 12.–14. viljastamisjärgsel nädalal üldjuhul iga päev, andes päevas 15–50 marjatera. Kontrollrühma soovituslikust 24 sigimispaarist 16 (> 65 %) peaks väljutama päevas rohkem kui 20 marjatera paari kohta ning see näitaja võib tõusta ka ligi 40 marjaterani päevas. Osutatud tasemest väiksem sigivus võib osutada sigimispaaride ebaküpsusele, alatoitumisele või haigustele.

*Viljakus*

Kontrollrühmas on viljastatud marjaterade osakaal tavaliselt 90 % kandis, aga haruldane ei ole ka 95 % või sellest kõrgem määr. Kui kontrollrühma marjaterade viljakus jääb alla 80 %, võib see osutada isendite haigustele või ebasoodsatele kasvatustingimustele.

## ▼M8

## 5. liide

## SÖÖTMISGRAAFIKU NÄIDE

Tabelis 1 on esitatud kalade tõhusat paljunemist toetava kasvu ja arengu tagamiseks sobiva söötmisgraafiku näide. Kõrvalekalded esitatud söötmisgraafikust võivad olla lubatud, aga soovitatavalt tuleks sel juhul katseliselt kontrollida, kas kasvu ja paljunemise näitajad jäävad nõutud tasemele. Soovitatud söötmisgraafiku järgimiseks tuleb enne katse algust kindlaks teha soolase vee krevettide kuivmass seda sisaldava vedelsööda mahuühiku kohta. Selleks võib kaaluda kindlaksmääratud koguse soolase vee krevette sisaldavat vedelsööta, mida on teadaoleva kaaluga alustel 60 °C juures 24 tundi kuivatatud. Vedelsöödas sisalduvate soolade massi arvessevõtmiseks kuivatatakse ka sama kogus vedelsööda valmistamiseks kasutatud soolalahust, mille kuivatamisjärgne mass lahutatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda kuivatamisjärgsest massist. Teise variandina võib soolase vee krevette enne kuivatamist filtreerida ja destilleeritud veega loputada, et poleks vaja mõõta puhta soolalahuse massi. Saadud andmete põhjal teisendatakse soolase vee krevettide kuivmass tabeli järgi iga kala kohta arvestatud, soolase vee krevette sisaldava vedelsööda koguseks. Lisaks soovitatakse soolase vee krevette sisaldava vedelsööda alikvoote igal nädalal uuesti kaaluda, et kontrollida söödetava krevetikoguse kuivmassi õigsust.

Tabel 1.

## Söötmisgraafiku näide

Aeg (pärast koorumist)	Soolase vee krevettide kogus (kuivmassi mg kala kohta päevas)
1. päev	0,5
2. päev	0,5
3. päev	0,6
4. päev	0,7
5. päev	0,8
6. päev	1,0
7. päev	1,3
8. päev	1,7
9. päev	2,2
10. päev	2,8
11. päev	3,5
12. päev	4,2
13. päev	4,5
14. päev	4,8
15. päev	5,2
16.–21. päev	5,6



**▼M8**

Aeg (pärast koorumist)	Soolase vee krevettide kogus (kuivmassi mg kala kohta päevas)
4. nädal	7,7
5. nädal	9,0
6. nädal	11,0
7. nädal	13,5
8. nädal – surmamine	22,5

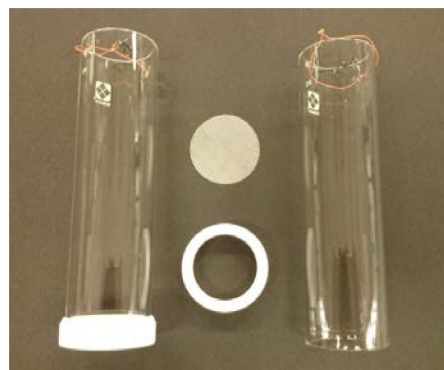
▼ **M8**

## 6. liide

## MARJATERADE INKUBATSIOONIKAMBRI NÄIDISED

*Näidis A*

See inkubaator koosneb ristuva kinnitusega tsentrifuugiklaasist, mida ühendab roostevabast terasest hülss ja hoiab paigal keeratav tsentrifuugikork. Korki läbib väike klaasist või roostevabast terasest toru, mis ulatub peaaegu tsentrifuugiklaasi ümara põhjani ning mille kaudu puhutakse õhumulle marjaterade suspensioonideks, saprofüütiliste seennakkuste leviku tõkestamiseks ning ka kemikaalide vahetamiseks inkubaatori ja seda sisaldava nõu vahel.

*Näidis B*

**▼ M8**

See inkubaator koosneb klaassilindrist (läbimõõt 5 cm ja pikkus 10 cm) ja roostevabast sõelast (sõelumiskoeffitsient 0,25  $\phi$  ja tihedus 32), mis kinnitatakse silindri põhja külge PTFE-võru abil. Tõstelati külge kinnitatud inkubaatorid langetatakse katsenõudesse ja neid loksutatakse vertikaalselt (u 5 cm amplituudiga) riisikala marjaterade jaoks sobiva sagedusega (u üks kord 4 s jooksul).

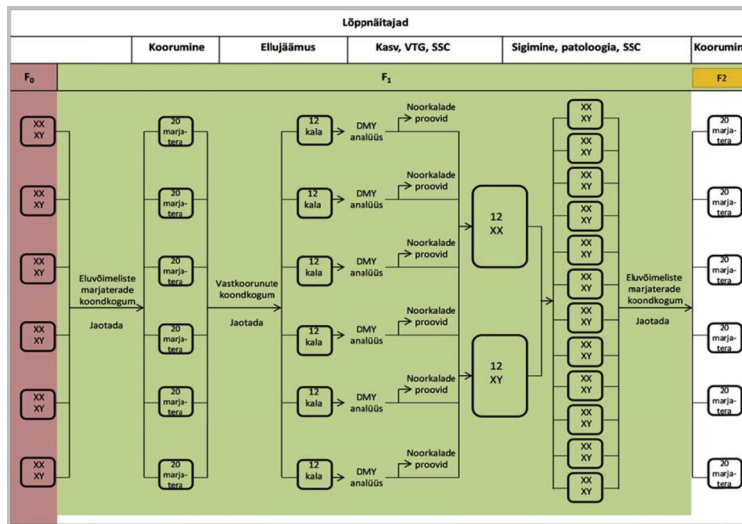
## ▼M8

## 7. liide

## MEOGRT PUHUL KASUTATAV PARALLEELPROOVIDE KOONDAMISE JA MOODUSTAMISE SKEEM

Joonis 1.

**Paralleelproovide koondamine ja moodustamine MEOGRT puhul. Joonisel kujutatu vastab ühele kontsentratsioonirühmale või poolele kontrollrühmast. Koondamise tõttu ei ole paralleelproovid kogu katse vältel pidevalt eraldi jälgitavad. Mõistet „marjatera“ kasutatakse eluvõimelise viljastatud marjatera tähenduses (samaväärne embrüoga)**

**Kontsentratsioonirühmad ja paralleelproovid**

Katsemetodis soovitatakse kasutada tehniliselt puhaste materjalidega viit uuritava kemikaali kontsentratsioonirühma ja negatiivset kontrolli. Paralleelproovide arv kontsentratsioonirühma kohta ei ole MEOGRTs alati ühetaoline ja kontrollrühma paralleelproovide arv peaks olema kaks korda suurem kui uuritava kemikaali ühes kontsentratsioonirühmas. Põlvkonnas F<sub>0</sub> on uuritava kemikaali igas kontsentratsioonirühmas kuus paralleelproovi ja negatiivse kontrolli rühmas 12 paralleelproovi. Lahustite kasutamist soovitatakse võimalusel alati vältida, aga nende kasutamise korral tuleb MEOGRT protokollis esitada nii lahusti kasutamise kui ka kasutatud lahusti valiku põhjendus. Lisaks on lahusti kasutamise korral vaja kahte liiki kontrollrühmasid: a) lahustiga kontroll ja b) negatiivne kontroll. Mõlemas kontrollrühmas peaks olema MEOGRT kõigis etappides täiskomplekt paralleelproove. Kirjeldatud paralleelproovide struktuur jääb samaks põlvkonna F<sub>1</sub> katseorganismi kogu kasvuperioodi vältel (ja põlvkonnas F<sub>2</sub> kuni selle kooremiseni). Ent täiskasvanud põlvkonna F<sub>1</sub> sigimispaaride moodustamise ajal tuleks paralleelsete sigimispaaride arv igas kontsentratsioonirühmas võimaluse korral kahekordistada. See tähendab, et igas uuritava kemikaali kontsentratsioonirühmas oleks 12 paralleelset paari ja kontrollrühmas oleks 24 paralleelset paari (lisaks vajaduse korral 24 paralleelset paari lahusti kontrollrühmas). Generatsiooni F<sub>1</sub> paaride koetud embrüote kooremise tehakse kindlaks sama paralleelproovide struktuuri alusel nagu põlvkonna F<sub>0</sub> koetud embrüote kooremisel, s.t algselt kuus paralleelproovi uuritava kemikaali iga kontsentratsioonirühma kohta ja 12 paralleelproovi kontrollrühma(de)s.

▼ **M8**

## 8. liide

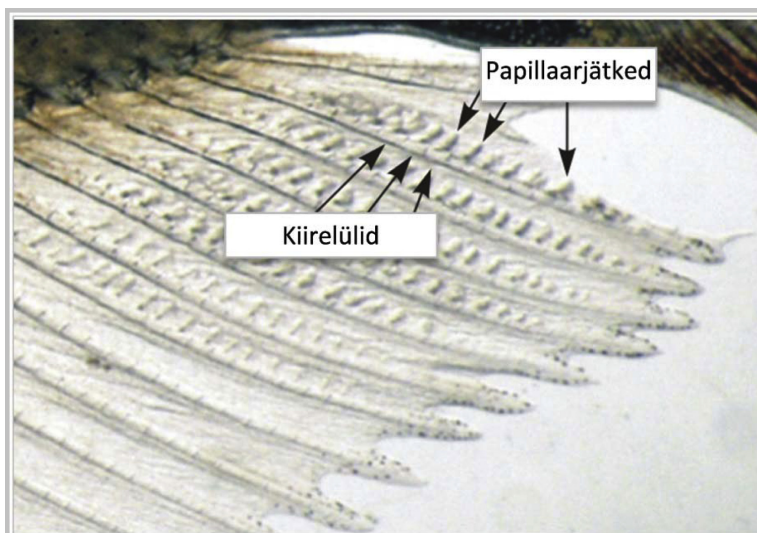
## PÄRAKUUIME PAPILLAARJÄTKETE LOENDAMINE

**Peamised materjalid ja reaktiivid**

- Stereomikroskoop (soovi korral koos kaameraga)
- Fiksaator (soovitatavalt Davidsoni fiksaator, Bouini fiksaatori kasutamine pole soovitatav) juhul, kui jätkeid ei loendata pildilt

**Loendamise kord**

Pärast lahangut tuleks pärakuuime pildistada, et pärakuuime papillaarjätkeid oleks lihtsam loendada. Kuigi pildistamine on soovitatav meetod, võib teise variandina pärakuuime Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris ligikaudu ühe minuti jooksul fikseerida. Papillaarjätke loendamise lihtsustamiseks tuleb hoida pärakuuime fikseerimise ajal tasapinnalisena. Pärakuuimega rümpa võib säilitada Davidsoni või muus sobivas fiksaatoris kuni analüüsimiseni. Loendada tuleb uime kiirelülid tagumiselt servalt välja ulatuvate papillaarjätketega kiirelülid arvu (vt **joonis 1**).

*Joonis 1.***Pärakuuime papillaarjätked**

▼ **M8**

## 9. liide

## MEOGRT ÜKSIKASJALIK AJAKAVA

**1.–3. katsenädal (põlvkond F0)**

Valikukriteeriumidele vastavad (vt punktid 16–20) põlvkonna F0 kudevad kalad kaasatakse katsesse kolmeks nädalaks, et arenevad sugurakud ja sugunäärmekeod saaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuda. Igas paralleelnõus on üks sigiv kalapaar (XX-emase ja XY-isase sigimispaar). Paari koetud marjaterasid kogutakse, loendatakse ja nende viljakust hinnatakse 21 järjestikusel päeval alates 1. katsepäevast.

**4. katsenädal (põlvkonnad F0 ja F1)**

Eelistatavalt tuleks katse järgmisel etapil kasutatavad viljastatud ja eluvõimelised marjaterad (embrüod) koguda ühel päeval, kuid embrüote ebapiisava arvu korral võib neid siiski koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüotega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Viljastatud marjaterade (embrüote) suremust kontrollitakse ja registreeritakse iga päev. Surnud marjaterad eemaldatakse inkubaatoritest (viljastatud marjaterade surma näitab eelkõige varastes etappides märkimisväärne läbipaistvuse kadu ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkude koaguleerumisest ja/või sadenemisest ja mille tulemusena marjaterad muutuvad valgeks ja läbipaistmatuks; OECD 2010).

Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumismenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetses kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot. Lisaks võib põlvkonnas F0 kasutada iga kontsentratsiooni- ja kontrollrühma kohta rohkem sigimispaare, et suurendada saadavate marjaterade arvu ja saavutada soovitatav tase 20 marjatera paralleelnõu kohta.

Põlvkonna F0 sigimispaarid surmatakse 24. katsepäeval humaanselt ning nende kehamass ja pikkus registreeritakse. Vajaduse korral võib põlvkonna F0 sigimispaare veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F1 sigitamist korrata.

**5.–6. katsenädal (põlvkond F1)**

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Igal päeval embrüost koorunud vastsed kogutakse kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumitesse ning jaotatakse süstemaatiliselt vastava kontsentratsioonirühma paralleelsete vastsenõude vahel nii, et ühes nõus on kuni 12 vastkoorunud isendit. Selleks valitakse vastkoorunud isendeid juhuslikkuse põhimõttel ning lisatakse need üksteise järel vastava kontsentratsioonirühma juhuslikult valitud paralleelnõudesse, kuni igas paralleelnõus on 12 vastkoorunud isendit. Kui vastkoorunud isenditest ei jätku kõikide paralleelnõude täitmiseks, tuleb tagada, et etapi F1 alguses oleks võimalikult paljudes paralleelnõudes 12 vastkoorunud isendit.

Marjaterad, mis ei ole koorunud kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja jooksul, tunnistatakse eluvõimetuks ja jäetakse kõrvale. Vastkoorunud isendite arv registreeritakse ja iga paralleelnõu kohta arvutatakse koorumise edukuse määr (kooruvus).

**▼M8****7.–11. katsenädal (põlvkond F1)**

Kalavastsete ellujäämist kontrollitakse ja registreeritakse iga päev kõikide paralleelnõude puhul. 43. katsepäeval registreeritakse igas paralleelnõus ellu jäänud kalade arv ja algselt paralleelnõusse asetatud vastkoorunud isendite arv (soovitatavalt 12). Selle põhjal saab arvutada protsentuaalse ellujäämise koorumisest kuni noorkala arengujärguni.

**12. katsenädal (põlvkond F1)**

Katsepäeval 78–85 võetakse iga kala sabaümest väike koeproov (uimetükk), mille põhjal tehakse kindlaks kõikide isendite genotüübiline sugu. Selle teabe põhjal moodustatakse sigimispaarid.

Kolme päeva jooksul pärast iga kala genotüübilise soo kindlakstegemist moodustatakse juhuslikkuse põhimõttel 12 sigimispaari iga kontsentratsioonirühma ja 24 sigimispaari kontrollrühma kohta. Igast paralleelnõust valitakse juhuslikult kaks XX- ja XY-kala, need rühmitatakse soo järgi koondkogumiteks ja sigimispaarid (XX-XY paarid) moodustatakse kummaski koondkogumist juhuslikult valitud kaladest. Moodustatakse 12 paralleelset paari kemikaali iga kontsentratsioonirühma ja 24 paralleelset paari kontrollrühma kohta ning igasse paralleelnõusse pannakse üks sigimispaar. Kui mõni paralleelnõu ei sisalda koondkogumisse lisamiseks kahte XX- või XY-kala, tuleb sobiva soolise genotüübiga kalad võtta sama kontsentratsioonirühma teistest paralleelnõudest.

Ülejäänud kalad (kuni kaheksa kala paralleelnõu kohta) surmatakse humaanselt ja neil mõõdetakse noorkala arengujärgu lõppnäitajad. Kõikide noorkalaproovide *dmy* andmed (XX või XY) säilitatakse, et tagada võimalus seostada kõiki lõppnäitajate andmeid iga isendi geneetilise sooga.

**13.–14. katsenädal (põlvkond F1)**

Kokkupuude kemikaaliga jätkub kogu selle aja vältel, mil sigimispaarid arenevad noorkalast täiskasvanuks. 98. katsepäeval (st üks päev enne marjaterade kogumise algust) eemaldatakse akvaariumidest ja emaste kalade küljest kõik seal olevad marjaterad.

**15.–17. katsenädal (põlvkond F1)**

Koetud marjaterasid kogutakse igast paralleelnõust 21 järjestikuse päeva jooksul ning hinnatakse nende sigivust ja viljakust.

**18. katsenädal (4. nädala tegevuste kordus) (põlvkonnad F1 ja F2)**

120. katsepäeva hommikul kogutakse igast paralleelnõust marjaterad. Kogutud marjaterasid hinnatakse, viljastatud marjaterad rühmitatakse (pärast kuduniitide eemaldamist) kontsentratsioonirühmade lõikes koondkogumiteks ning jaotatakse sealt süstemaatilisel inkubatsioonikambritesse nii, et igas inkubaatoris on 20 viljastatud marjatera. Inkubaatorid võib asetada iga kontsentratsioonirühma jaoks ette valmistatud eraldi inkubatsiooninõudesse või paralleelnõudesse, kuhu hiljem jäävad ka koorunud vastsed. Eelistatavalt tuleks embrüod koguda ühel päeval, aga kui nende arv ei ole piisav, võib embrüoid koguda ka kahe päeva vältel. Kahel päeval kogumise korral pannakse kõik esimesel päeval kogutud embrüod kontsentratsioonirühmade lõikes kokku teisel päeval kogutud embrüodega. Kõik kontsentratsioonirühma jaoks moodustatud koondkogumised olevad embrüod jaotatakse juhuslikult selle rühma paralleelsete inkubaatorite vahel nii, et igas inkubaatoris on 20 embrüot. Märkus. Kui marjaterasid on vaja koguda kahel päeval ainult ühe kontsentratsioonirühma puhul, tuleb seda kogumisenetlust kasutada kõikide kontsentratsioonirühmade (ja kontrollrühmade) puhul. Kui ka pärast teist kogumispäeva ei ole mõnes kontsentratsioonirühmas piisavalt

**▼M8**

embrüoid, et panna igasse inkubaatorisse 20 embrüot, siis tuleb selles konkreetsetes kontsentratsioonirühmas vaadeldavate embrüote arvu vähendada 15 embrüoni inkubaatori kohta. Kui embrüoid ei jätku ka juhul, kui igas inkubaatoris oleks 15 embrüot, tuleb vähendada paralleelsete inkubaatorite arvu nii, et igasse inkubaatorisse saaks panna 15 embrüot.

121. katsepäeval (või 122. katsepäeval, kui on vaja veenduda, et põlvkonna F2 sigitamine õnnestus) surmatakse põlvkonna F1 sigimispaarid humaanselt ja neil mõõdetakse täiskasvanud kalade arengujärgu lõppnäitajad. Vajaduse korral võib põlvkonna F1 sigimispaare veel 1–2 päeva elus hoida, et põlvkonna F2 sigitamist korrata.

**19.–20. katsenädal (põlvkond F2)**

Üks kuni kaks päeva enne eeldatavat koorumise algust peatatakse inkubeeritavate marjaterade loksutamine või vähendatakse seda, et koorumist kiirendada. Kui katse lõpeb põlvkonna F2 koorumisega, siis iga päev koorunud vastsed loendatakse ja seejärel kõrvaldatakse. (Embrüod, mis ei ole ka pikendatud inkubatsioonaja – st kontrollrühma koorumispäeva mediaaniga võrreldes kaks korda pikema aja – järel koorunud, tunnistatakse eluvõimetuks.)



▼ **M8**

## 10. liide

## STATISTILINE ANALÜÜS

MEOGRTga kogutavad bioloogiliste andmete kategooriad ei ole sellele katsele eriomased ja, kui patoloogiate andmed välja arvata, siis on sarnaste andmete nõuetekohaseks analüüsimiseks välja töötatud palju sobivaid statistilisi meetodeid, mille valik sõltub andmete omadustest: normaaljaotus, dispersiooni homogeensus, uuringuplaani sobivus hüpoteesi kontrollimiseks või regressioonanalüüsiks, parameetrilisteks või mitteparameetrilisteks testideks jne. Üldpõhimõttena on soovitatavad statistilised analüüsimeetodid valitud lähtuvalt ökotoksilisuse andmeid käsitlevast OECD juhendist (OECD 2006) ning joonisel 2 on esitatud MEOGRT andmete jaoks analüüsimeetodi valimise vooskeem.

Võib eeldada, et kõige sagedamini esinevad andmestikes monotoonsed sõltuvused. Lisaks tuleks kaaluda, kas kasutada ühepoolset või kahepoolset statistilist testi. Üldiselt soovitatakse kasutada ühepoolseid teste, välja arvatud juhul, kui need on mingil bioloogilisel põhjusel sobimatud. Käesolevas jaotises soovitatakse küll teatavaid statistilisi teste, aga kui konkreetset MEOGRTga kogutavate andmete jaoks töötatakse välja sobivamad ja/või võimsamad statistilised meetodid, tuleks nendest saadavate eeliste tõttu kasutada vastavaid uusi statistilisi teste.

MEOGRTga kogutavaid andmeid tuleks analüüsida iga genotüübilise soo lõikes eraldi. Pööratud sooga kalade (XX-isaste või XY-emaste) kohta kogutud andmete analüüsimiseks on kaks võimalikku strateegiat. 1) Jätta pööratud sooga kalade andmed (välja arvatud pööratud sooga kalade osakaal igas paralleelproovis) kogu katse ulatuses analüüsist välja. 2) Jätta kõikide pööratud sooga kalade kohta kogutud andmed andmestikku sisse ja teha analüüs genotüübi põhjal.

**Histopatoloogilised andmed**

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastme kujul, mida analüüsitakse hiljuti välja töötatud uue statistilise meetodiga: Rao-Scotti kohandusega Cochran'i-Armitage lõiktest (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). Rao-Scotti kohandus säilitab teabe katseparalleelide kohta; lõiktesti menetlusega on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste. RSCABSi tulemused näitavad iga diagnoosi puhul, millises kontsentratsioonirühmas on patoloogiate osakaal suurem kui kontrollrühmas ja milline on nende raskusaste.

**Sigivuse andmed**

Andmete monotoonse kontsentratsioonist sõltuvuse korral kasutatakse sigivuse analüüsidest sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere'i-Terpstra või Williamsi testi. Sammuviisilise elimineerimise testis tehakse kõik võrdlused olulisuse nivool 0,05 ja puuduvad võrdluste arvust sõltuvad kohandused. Eeldatakse, et andmete puhul esineb monotoonne kontsentratsioonist sõltuvus, aga seda saab ka kontrollida andmete visuaalse vaatlusega või pärast andmete järkudeks teisendamist kontsentratsioonirühmade keskväertuste lineaar- ja ruutkontrastide konstrueerimise teel. Kui ei esine olukorda, kus ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole oluline, siis kasutatakse trenditesti. Muul juhul kasutatakse kemikaali toime kindlakstegemiseks Dunnett testi – tingimusel, et andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga. Kui nimetatud tingimused ei ole täidetud, kasutatakse Dunnett testi koos Bonferroni-Holmi kohandusega. Kõik osutatud testid tehakse F-testist või Kruskali-Wallis testist sõltumatult. Täpsemad üksikasjad on esitatud dokumendis OECD 2006.

**▼M8**

Piisava statistilise põhjendatuse korral võib kasutada ka muid meetodeid, näiteks marjaterade arvu puhul üldistatud lineaarset mudelit koos vigade Poissoni jaotusega (Cameron ja Trividi, 2013). Muu meetodi kasutamise korral on soovitatav nõu pidada statistikutega.

**Igapäevane marjaterade loendus ühes põlvkonnas**

Kasutatakse dispersioonanalüüsi (ANOVA) mudelit, kus tunnus  $Y = Aeg * Aeg + Kotsentratsioon + *Kotsentratsioon + Aeg * Kotsentratsioon + *Aeg * Kotsentratsioon$  ja juhuslik mõju avaldub tegurites Paralleelproov(Põlvkond\*Kotsentratsioon) ning  $Aeg * Paralleelproov(Kotsentratsioon)$ , mis võimaldab põlvkonnades mõlemat liiki ebavõrdseid dispersioonikomponente. Tegur Aeg osutab siin marjaterade loendamise sagedusele (nt iga päev või kord nädalas). See on kordusmõõtmiste analüüs, mille puhul sama paralleelproovi kohta tehtud tähelepanekute korrelatsioonid on seotud andmete kordusmõõtmistega.

Konsentratsiooni peamist mõju kontrollitakse Dunnetti (või Dunnetti-Hsu) testiga, mis on kohandatav vastavalt võrdluste arvule. Lisaks on vaja kohandusi põlvkonna ja aja mõju arvessevõtmiseks, sest nende kahe teguri puhul puudub kontrolltase ning iga tasemete paar võib osutada huvi pakkuvaks võrdluseks. Kui olulisusnivooga 0,05 F-test näitab nimetatud kahe mõjuteguri puhul olulist peamist mõju, siis saab vastava teguri paare tasemete kaupa võrrelda olulisusnivooga 0,05 ilma täiendavaid kohandusi tegemata.

Mudel hõlmab kahe ja kolme teguriga vastasmõjusid, mistõttu näiteks aja peamine mõju ei pruugi olla statistiliselt oluline, kuigi aeg avaldab olulist mõju tulemustele. Seega kui mõni kahe või kolme teguriga (millest üks on aeg) vastasmõju on nivool 0,05 oluline, siis võib aja tasemete võrdlused olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta.

Järgmiseks uuritakse F-testidega konsentratsiooni olulisust ajas; need esitatakse dispersioonanalüüsi tabelis nn lõikudena. Kui näiteks põlvkonnas F1 aja 12 jooksul kasutatud konsentratsiooni lõik on nivool 0,05 oluline, siis võib selle konsentratsioonirühma võrdlused põlvkonnas F1 ajaga 12 olulisusnivool 0,05 sobivaks tunnistada ilma täiendavate kohandusteta. Sama kehtib nende testide puhul, millega uuritakse aja olulisust põlvkonnas F1 ja konsentratsioonis ning põlvkonna olulisust ajas ja konsentratsioonis.

Võrdluste suhtes, mis ei kuulu ühtegi eespool nimetatud kategooriasse, tuleks kasutada Bonferroni-Holmi meetodit p-väärtuste kohandamiseks. Lisateavet taoliste mudelite analüüsimise kohta võib leida allikatest Hocking (1985) ning Hochberg ja Tamhane (1987).

Teine võimalus on registreerida toorandmed ning esitada need uuringuraportis iga päeva kohta kui sigivusnäitaja (marjaterade arv) paralleelproovi kohta. Seejärel tuleks arvutada paralleelproovi toorandmete keskvärtus ja teha sellega ruutjuurteisendus. Paralleelproovide teisendatud keskvärtustega tuleks teha esmalt ühefaktoriline dispersioonanalüüs ning seejärel moodustada Dunnetti kontrastid. Kasulik võib olla ka see, kui vaadelda iga konsentratsioonirühma ja/või paralleelproovi sigivuse andmeid visuaalselt dispersioonidiagrammil, mis näitab andmete muutumist ajas. See võimaldab esitada mitteformaalseid hinnanguid ajas avalduva võimaliku toime kohta.

**Kõik ülejäänud bioloogilised andmed**

Statistiliste analüüside aluseks on eeldus, et õigesti valitud dooside korral on andmed monotoonsed. Seega eeldatakse, et andmed on monotoonsed ning nende monotoonsust hinnatakse formaalselt lineaar- ja ruutkontrastidega. Kui andmed on monotoonsed, soovitatakse kasutada paralleelproovide mediaanväärtuste suhtes Jonckheere'i-Terpstra trenditesti (vastavalt dokumendile OECD 2006). Kui ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole, siis tunnistatakse andmed mittemonotoonseks.

## ▼ M8

Kui andmed on mittemonotoonsed ja eriti kui see on tingitud nõrgemast reaktsioonist ühes või kahes kõige kõrgemas kontsentratsioonirühmas, siis tuleks kaaluda võimalust jätta need kontsentratsioonirühmad analüüsiandmestikust välja. Kõnealune otsus tuleb teha pädeva erialase hinnangu põhjal, võttes arvesse kõiki olemasolevaid andmeid, eriti andmeid, mis osutavad asjaomastel kontsentratsioonitasemetel esinevale selgele mürgisusele.

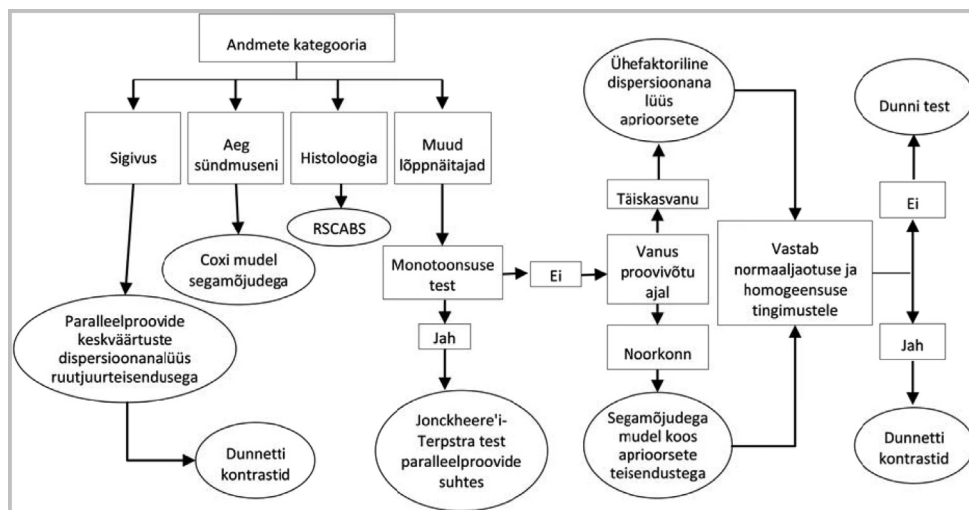
Kehamassi ja pikkuse puhul teisendusi ei soovitata, kuigi need võivad olla mõnikord vajalikud. Vitellogeniini käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada logaritmteisendust; teiseid sootunnuseid (päraakuime papillaarjätked) käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada ruutjuurteisendust; kooruvust, elulemust, soolist jaotumist ja viljastatud marjaterade osakaalu käsitlevate andmete puhul soovitatakse kasutada arkussiinus-ruutjuurteisendust. Koorumiseni ja esimese kudumiseni kulunud aega tuleks käsitada kui sündmuse toimumiseni kulunud aja andmeid ning andmeid kindla aja jooksul koorumata üksikembrüote või kuduta paralleelproovide kohta kui paremalt tsenseeritud andmeid. Koorumiseni kulunud aeg tuleks arvutada iga paralleelproovi koorumispäeva mediaani põhjal. Nimetatud lõppnäitajaid tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil.

Täiskasvanud kalade proovide bioloogilised andmed sisaldavad ühte mõõteväärtust paralleelproovi kohta, st igas paralleelnõus on üks XX-kala ja üks XY-kala. Seetõttu soovitatakse kasutada paralleelproovide keskväertuste suhtes ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Kui dispersioonanalüüsi eeldused on täidetud (normaaljaotus ja dispersiooni homogeensus, mida hinnatakse dispersioonanalüüsi jääkide põhjal vastavalt Shapiro-Wilksi ja Levene'i testiga), tuleks kontrollrühmast erinevad kontsentratsioonirühmad kindlaks teha Dunnetti kontrastide abil. Ent kui dispersioonanalüüsi eeldused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi. Sarnast menetlust soovitatakse kasutada protsentuaalsete andmete (viljakus, kooruvus ja ellujäämus) puhul.

Noorkalade proovidest kogutud andmetel on üks kuni kaheksa mõõteväärtust paralleelproovi kohta, st iga genotüübilise soo puhul võib paralleelproovi keskväertuse arvutamisel aluseks võetud isendite arv olla erinev. Seetõttu soovitatakse kasutada esmalt segamõjuga dispersioonanalüüsi mudelit ja seejärel Dunnetti kontraste – tingimusel, et normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensus tingimused on täidetud (segamõjuga dispersioonanalüüsi jääkide põhjal). Kui need tingimused ei ole täidetud, tuleks kontrollrühmast erinevate kontsentratsioonirühmade kindlakstegemiseks kasutada Dunni testi.

Joonis 2.

## MEOGRTga kogutud andmete analüüsimiseks soovitatavate statistiliste meetodite vookeem



▼ **M8**

**KIRJANDUS**

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. (Väljaande lisad on avaldatud eraldi dokumendina.) OECD Publishing, Pariis.
- (2) Cameron, A. C., ja Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data. 2. väljaanne. Econometric Society Monograph No 53. Cambridge University Press.
- (3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models. Brooks/Cole, Monterey, CA.
- (4) Hochberg, Y., ja Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

## ▼M8

## C.53. KULLESTE KASVU JA ARENGU KATSE (LAGDA)

## SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 241 (2015). Vajadus töötada välja ja valideerida katse, millega saab välja selgitada ja kirjeldada mürgiste kemikaalidega kokkupuute kahjulikke tagajärgi kahepaiksetele, tuleneb kartusest, et kemikaalid võivad juba keskkonnas esineva kontsentratsiooni juures avaldada kahjulikku mõju nii inimesele kui ka elusloodusele. Kulleste kasvu ja arengu katset (LAGDA) käsitlevas OECD katsejuhendis kirjeldatakse kahepaiksete liigiga tehtavat mürgisuse katset, mille käigus vaadeldakse kasvu ja arengut viljastamisest kuni varase noorlooma arengujärguni. Katsega (mis tavaliselt kestab 16 nädalat) hinnatakse kulleste varast arengut, moonet, ellujäämist, kasvu ja osalist suguküpsemist. Samuti võimaldab see mõõta mitmeid muid näitajaid, mille abil saab diagnostiliselt hinnata võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale või muid arengu- ja reproduktiivtoksilisi aineid. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod põhineb kannuskonnaga (*Xenopus laevis*) tehtud valideerimisuuringul, mille viis läbi Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseamet ja mida toetavaid uuringuid on tehtud Jaapanis (1). Kuigi kasvu ja arengu jälgimise katse meetodika jaoks, mille oluline komponent on geneetilise soo kindlakstegemise võimalus, võivad sobida ka muud kahepaikseliigid, on käesolevas katsemeetodis kirjeldatud konkreetsed meetodid ja vaadeldavad näitajad kohaldatavad üksnes *Xenopus laevis*'e suhtes.
2. LAGDA on kahepaiksega tehtav kõrgema taseme katse, mille eesmärk on koguda kahjuliku toime kohta kontsentratsiooni-toime seost kirjeldavat põhjalikumat teavet, mida saaks kasutada ohtude väljaselgitamiseks ja kirjeldamiseks ning ökoloogilise riski hindamiseks. Katse vastab endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tasemele, kus *in vivo* katsetega kogutakse andmeid ka kahjuliku mõju kohta endokriinfunktsiooniga seotud näitajatele (2). Katse üldpõhimõtte kohaselt viiakse *X. laevis*'e embrüod, mis on Nieuwkoop ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadiumis (3), kokkupuutesse uuritava kemikaali vähemalt nelja eri kontsentratsiooniga (mis üldjuhul erinevad üksteisest vähemalt poole logaritmintervalli võrra) ja kontrollaine(te)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NF-i järgi 62. staadiumi saabumise mediaanega ning 62. staadiumis ( $\leq 45$  päeva pärast viljastamist; tavaliselt 45. viljastamisjärgse päeva paiku) võetakse üks osaline vaheproov. Iga uuritava kontsentratsiooni juures tehakse neli paralleelproovi ja kontrollainega kaheksa paralleelproovi. Kokkupuute jooksul hinnatakse (osalise vaheprooviga ja katse lõpus võetava prooviga) nii üldise mürgisusega seotud näitajaid (suremus, ebatavaline käitumine ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka näitajaid, millega kirjeldatakse konkreetselt endokriinsüsteemi kahjustavaid toimemehhanisme, mis mõjutavad östrogenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse. Meetodis keskendutakse eelkõige võimalikule populatsiooni mõjutavale toimele (kahjulik mõju ellujäämusele, arengule, kasvule ja sigimisevõime arengule), et arutada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon, mis põhjustab mõõdetava näitaja muutumise  $\times$  protsendi võrra (EC<sub>x</sub>). Samas tuleb arvestada, et EC<sub>x</sub>-il põhinevad meetodid ei sobi sageli sellist tüüpi suurte uuringute jaoks, kus uuritavate kontsentratsioonide arvu suurendamine EC<sub>x</sub>-i kindlakstegemise eesmärgil võib olla ebaotstarbekas. Samuti tuleb tähele panna, et meetod ei hõlma sigimisetappi ennast. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.
3. Kuna uuritud kemikaalide arv on väike ja kõnealuse üsna keeruka katse valideerimises osales vähe laboreid, ei ole laboritevahelist korratavust seni katseandmetega dokumenteeritud ning võib eeldada, et OECD katsejuhend

## LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

## ▼ M8

nr 241 vaadatakse läbi ja seda muudetakse saadud kogemuste valguses pärast seda, kui on tehtud piisavalt uuringuid kõnealuse uue uuringukava toimivuse kinnitamiseks. LAGDA on oluline katse, mis aitab hinnata kahepaiksete populatsiooni vähenemise võimalikke mõjutegureid, kuna selles hinnatakse kemikaalidega kokkupuute mõju tundlikus kullesestaadiumis, kus kemikaalide kahjulik mõju ellujäämusele ja arengule, sealhulgas suguorganite normaalsele arengule, võib üle kanduda populatsioonile.

4. Katse on üles ehitatud nii, et sellega saaks tuvastada nii endokriinfunktsiooni kui ka muude mehhanismide kaudu tekkivat lõppmõju, ning osa selle diagnostilisi näitajaid on spetsiifilised põhiliste endokriinsüsteemi toimetehhanismide suhtes. Tuleb märkida, et enne LAGDA väljatöötamist puudus kirjeldatud ülesannet täitev valideeritud katsemeetod kahepaiksete jaoks.
5. Enne katse alustamist on oluline koguda andmeid uuritava kemikaali füüsikalise-keemiliste omaduste kohta, eelkõige selleks, et oleks võimalik valmistada piisavalt kemikaalilahuseid. Samuti tuleb kasutada piisavalt tundlikku analüüsimeetodit uuritava kemikaali kontsentratsioonide kontrollimiseks. Ligikaudu 16 nädalat kestva katse jaoks läheb vaja kokku 480 looma ehk *X. laevis*'e embrüot (lahusti kontrollproovi kasutamisel 640 embrüot), et tagada populatsiooniga seotud näitajate (nt kasv, areng ja suguküpsus) hindamiseks piisav statistiline võimsus.
6. Enne katsemeetodi kasutamist segu analüüsimiseks regulatiivsel eesmärgil tuleks kaaluda, kas meetodiga saadakse taotletava eesmärgi jaoks vastuvõetavad tulemused. Peale selle ei saa käesoleva katsemeetodiga hinnata otseselt sigivust ning järelikult see ei pruugi olla kasutatav kõrgemal tasemel kui endokriinfunktsiooni kahjustavate kemikaalide uurimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku 4. tase.

## KATSEMEETODI TEADUSLIK ALUS

7. Suur osa meie praegustest teadmistest kahepaiksete bioloogia kohta on saadud tänu kannuskonna (*Xenopus laevis*) kasutamisele laboratoorse mudelliigina. Seda liiki on laboris lihtne kasvatada, sellel ovulatsiooni esilekutsumiseks sobib inimese kooriongonadotropiin (hCG) ning loomavarud on hõlpsasti kättesaadavad kaubanduslikel eesmärkidel kasvatajatelt.
8. Sarnaselt kõikide selgroogsetega reguleerib kahepaiksete sigimisfunktsiooni hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg (4). Östrogeenid ja androgeenid täidavad selles endokriinsüsteemis vahendaja rolli ning juhivad sooliselt dimorfsete kudede arengut ja füsioloogiat. Kahepaiksete elutsükklis on kolm selgesti eristatavat etappi, mille vältel kõnealune telg on eriti aktiivne: 1) sugunäärmete diferentseerumine kullese arengu käigus, 2) teiseste sootunnuste kujunemine ja sugunäärmete küpsemine noorlooma staadiumis ning 3) täiskasvanud loomade sigimine. Vastuvõtlikkus endokriinfunktsiooni häiretele, mida põhjustavad teatavad kemikaalid (nt östrogeenid ja androgeenid) ning mis võib lõpuks viia organismide sigimisvõime kadumiseni, on kõigis nimetatud arenguetappides tõenäoliselt suurem.
9. Sugunäärmete areng algab NFi järgi 43. staadiumis, mil tekib bipotentsiaalne genitaalkurd. Sugunäärmete diferentseerumine algab NFi järgi 52. staadiumis, mil sugurakkude eellasrakud liiguvad säsikoosse (isastel) või jäävad arenevate sugunäärmete koorepiirkonda (emastel) (3). Asjaolust, et kõnealune sugunäärmete

## ▼M8

soolise diferentseerumise protsess on *Xenopus*'e puhul keemiliselt mõjutatav, teatati esimest korda 1950ndatel aastatel (5, 6). Kui kullest puutuvad sugunäärmete diferentseerumise perioodil kokku östradiooliga, toimub isastel soo arengu pöördumine ning neist saavad täiskasvanuna kõigi toimivate funktsioonidega emased (7, 8). Võimalik on ka soo arengufunktsionaalne pöördumine emasest isaseks, mida on esile kutsutud kullestesse munandikoe siirdamisega (9). Ent kui liigil *Xenopus tropicalis* kutsub kokkupuude aromataasi inhibiitoriga esile soo arengu funktsionaalse pöördumise (10), siis *Xenopus laevis*'e puhul ei ole katsed seda kinnitanud. Varasemates katsetes on mürgiste ainete mõju sugunäärmete diferentseerumisele hinnatud moondeetapil tehtavate sugunäärmekeue uurin-gutega ja soo arengu pöördumist oli võimalik kindlaks teha üksnes soolise jaotumise analüüsi abil. Kuni viimase ajani puudus võimalus *Xenopus*'e geneetilise soo kindlakstelemiseks. Ent hiljutine *X. laevis*'e sooga seotud markerite avastamine annab võimaluse teha kindlaks geneetilist sugu ja tuvastada vahetult loomad, kellel soo areng on pöördunud (11).

10. Isastel noorloomadel jätkub areng vere testosteroonisalduse kasvuga, millega kaasneb teiste sootunnuste kujunemine ja munandite areng. Emastel loomadel toodavad munasarjad östradiooli ning selle tagajärjel ilmub nende plasmasse vitellogeniin (VTG), munasarjades tekivad vitellogeniini toimed ootsüüdid ja arenevad munajuhad (12). Munajuhad on emase teiseid sootunnused, mis aitavad sigimise käigus ootsüütidel küpseda. Munajuha läbivatele ootsüütidele tekib kallerkest ning need kogunevad emakasse ja on siis valmis viljastamiseks. Munajuhade arengut näivad reguleerivat östrogeenid, kuna nende kujunemine on *X. laevis*'e (13) ja *X. tropicalis*'e (12) puhul korrelatsioonis vere östradioolisaldusega. Teatatud on munajuhade kujunemisest isastel, mida on põhjustanud kokkupuude polüklooritud bifenüüli ühenditega (14) ja 4-*tert*-oktülfenooliga (15).

## KATSE PÕHIMÕTE

11. Katsekava kohaselt viiakse NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad *X. laevis*'e embrüod vee kaudu kokkupuutesse uuritava kemikaaliga neljas eri kontsentratsioonis, samuti kontrollproovi(de)ga. Kokkupuudet jätkatakse 10. nädalani pärast kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega ning 62. staadiumis võetakse üks vaheproov. Kui kemikaalid on väga hüdrofoobsed, võib olla võimalik neid manustada söödaga, kuid seda kokkupuute tekitamise viisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel seni kuigi palju kasutatud. Iga uuritava kontsentratsiooniga tehakse neli paralleelkatset ja iga kontrollprooviga kaheksa paralleelkatset. Kokkupuute jooksul hinnatakse nii üldise mürgisusega seotud lõppnäitajaid (suremus, kõrvalekalded käitumises ning kasvu ja kehamassi juurdekasv) kui ka lõppnäitajaid (nt kilpnäärme histopatoloogia, sugunäärme ja -juhade histopatoloogia, väärarengud, plasma vitellogeniinisaldus (valikuline) ning genotüübiline/fenotüübiline sooline jaotumine), millega kirjeldatakse konkreetset endokriinsüsteemi kahjustavaid toimetehhanisme, mis mõjutavad östrogeenide, androgeenide või kilpnäärme vahendusel toimivaid füsioloogilisi protsesse.

## KATSE NÕUETEKOHASUSE KRITERIUMID

12. Kehtivad järgmised katse nõuetekohasuse kriteeriumid.

— Lahustunud hapniku kontsentratsioon peaks kogu katse vältel olema  $\geq 40$  % küllastuskontsentratsioonist õhus.

**▼M8**

- Vee temperatuur peaks olema vahemikus  $21 \pm 1$  °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C.
  - Katselahuse pH tuleks hoida vahemikus 6,5–8,5 ning paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus ei tohiks ületada 0,5.
  - Tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud rahuldavalt hoida vahemikus  $\pm 20$  % mõõtmistulemuste keskvaärtusest.
  - Kokkupuuteperioodil esinenud suremus peaks olema kõikides kontrollrühmade paralleelproovides  $\leq 20$  %.
  - Uuringu alustamiseks valitud kudu eluvõimelisus peaks olema  $\geq 70$  %.
  - Kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kuluv mediaanaeg peaks olema  $\leq 45$  päeva.
  - Katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt  $1,0 \pm 0,2$  g ja  $11,5 \pm 3$  g.
13. Kuigi see ei ole nõuetekohasuse kriteerium, soovitatakse analüüsil kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni kolme rikkumata paralleelprooviga. Töödeldud rühma näitajaid rikkuvaks liigseks suremuseks peetakse kahes või enam paralleelproovis esinevat rohkem kui nelja surmajuhtu ( $> 20$  %), mis ei saa olla tingitud tehnilisest veast. Analüüsiks peaks olema võimalik kasutada vähemalt kolme töötlemiskontsentratsiooni, mille puhul ei ilmne selget mürgisust. Selge mürgisuse tunnused on muu hulgas katseorganismi hõljumine pinnal, lebamine nõu põhjas, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine, ärritajatele mitte-reageerimine, morfoloogilised kõrvalekalded (*nt* jäsemedeformatsioonid), veritsevad haavandid ja kõhuturse.
14. Kui leitakse kõrvalekaldeid katse nõuetekohasuse kriteeriumidest, tuleks kaaluda selliste kõrvalekallete mõju katsetulemuste usaldusväärsusele ning esitada need kõrvalekalded ja kaalutlused katseprotokollis.

**MEETODITE KIRJELDUS****Seadmed**

15. Tavapärased laboriseadmed, eeskätt järgmised seadmed:

- a) temperatuuri reguleerimise seade (*nt* kütteseadmed või jahutid, mis on reguleeritavad temperatuurile  $21 \pm 1$  °C);



**▼M8**

- b) termomeeter;
- c) stereomikroskoop ja lahkamiseks vajalikud vahendid;
- d) mikroskoobiga ühendatav digifotoaparaat vähemalt 4-megapikselse lahutusvõimega (vajadusel);
- e) analüütiline kaal, millega on võimalik kaaluda 0,001 mg või 1 µg täpsusega;
- f) lahustunud hapniku mõõtur ja pH-meeter;
- g) valgustustiheduse mõõtur, mis näitab tulemust luksides.

**Vesi***Päritolu ja kvaliteet*

16. Kasutada võib kohapeal kättesaadavat lahjendusvett (nt allikavesi või aktiivsõega filtreeritud kraanivesi), mis võimaldab *X. laevis* e normaalsel kasvu ja arengut, ning olemas peavad olema tõendid selles vees aset leidva normaalse kasvu kohta. Kuna kohaliku vee kvaliteet võib olenevalt asukohast oluliselt erineda, tuleb teha vee kvaliteedi analüüs, eriti juhul, kui puuduvad varasemad andmed selle vee kasutamise kohta kulleste kasvatamiseks. Raskemetallide (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja kationide (nt  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), pestitsiidide, orgaanilise süsiniku ja hõljuvaine sisaldus tuleks kindlaks teha enne katse algust ja/või kui lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, siis näiteks iga kuue kuu järel. Mõned nõuetekohase lahjendusvee keemilised omadused on esitatud 2. liites.

*Jodiidi kontsentratsioon katses kasutatavas vees*

17. Selleks et kilpnääre saaks sünteesida normaalset moonet toetavaid kilpnäärmehormoone, peab kullestele olema vee ja sööda kaudu kättesaadav piisav kogus jodiidi. Praegu ei ole empiirilisi suuniseid söödas või vees sisalduva jodiidi minimaalse kontsentratsiooni kohta, mis on vajalik normaalse arengu tagamiseks. Siiski võib jodiidi kättesaadavus mõjutada kilpnäärmesüsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele ainetele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust, millele tasub tähelepanu pöörata kilpnäärme histopatoloogilise uuringu tulemuste tõlgendamisel. Varasemate uurimuste põhjal on katse edukalt läbi viidud, kui jodiidi (I) kontsentratsioon lahjendusvees on olnud vahemikus 0,5–10 µg/l. Ideaaljuhul peaks jodiidi kontsentratsioon lahjendusvees olema kogu katse vältel 0,5 µg/l (seda lisatakse veele naatrium- või kaaliumsoola kujul). Kui katses kasutatav vesi saadakse deioniseeritud veest kunstlikult, tuleks sellele lisada jodiidi kontsentratsioonis vähemalt 0,5 µg/l. Katseprotokollis tuleks registreerida katses kasutatud vees (lahjendusvees) mõõdetud jodiidikontsentratsioonid ning jodiidi või muude soolade lisamine katsevette (kui neid kasutatakse). Lisaks veele võib mõõta ka sööda joodisisaldust.

**Kokkupuutesüsteem**

18. Katse väljatöötamisel kasutati läbivooluga lahjendussüsteemi. Süsteemi kõik veega kokkupuutuvad osad peaksid olema klaasist, roostevabast terasest ja/või muust keemiliselt inertsest materjalist. Kokkupuutenõudeks peaksid olema klaasist või roostevabast terasest akvaariumid kasuliku ruumalaga vahemikus 4,0–10,0 l (veesügavusega vähemalt 10–15 cm). Süsteem peaks võimaldama kasutada kõiki kokkupuutekontsentratsioone, kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma (kui see on vajalik) nii, et iga kontsentratsiooniga töödeldavas rühmas on neli ja igas kontrollrühmas kaheksa paralleelproovi. Vooluhulk igas nõus peaks olema konstantne, nii et püsiks bioloogilised tingimused ja säiliks kokkupuude kemikaaliga. Soovitavalt peaks vooluhulk olema piisav (nt vähemalt viis nõu täielikku veevahetust päevas), et

▼ **M8**

vältida kemikaali kontsentratsiooni vähenemist katseorganismide ja akvaariumis leiduvate veemikroobide ainevahetuse, abiootilise lagunemise (hüdrolüüs, fotolüüs) või kadude (aurustumine, sorptsioon) tagajärjel. Katsenõud tuleks kokkupuutesüsteemis kohtadele asetada juhuslikkuse alusel, et vähendada asukoha, sealhulgas temperatuuri, valgustugevuse ja muude väikeste erinevuste võimalikku mõju. Lisateavet läbivooluga kokkupuutesüsteemide koostamise kohta võib leida kalade, suurselgrootute ja kahepaiksetega tehtavaid ägeda mürgisuse katseid käsitlevast ASTMi standardjuhendist (16).

**Kemikaali lisamine: katselahuste valmistamine**

19. Katselahuste valmistamiseks kokkupuutesüsteemis tuleks uuritava kemikaali põhilahust manustada kokkupuutesüsteemi sobiva pumba või muu seadme abil. Põhilahuse vooluhulka tuleb enne kokkupuute alustamist kalibreerida vastavalt katselahustega tehtud analüüsi tulemustele, ning seda tuleb katse jooksul regulaarselt volumetriselt kontrollida. Katselahust tuleb igas nädaliga päev mahu järgi vähemalt viis korda uuendada.
  
20. Meetod, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks süsteemi, sõltub kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Seetõttu tuleks enne katset koguda asjaomase kemikaali kohta lähteandmeid, et kontrollida selle sobivust katses kasutamiseks. Uuritava kemikaali kohta on kasulik teada selle struktuurivalemit, molekulmassi, puhtust, püsivust vees ja valguse käes,  $pK_a$ -d,  $K_{ow}$ -d, lahustuvust vees (soovitavalt selles, mida kasutatakse katses) ja aururõhku, samuti kiire biolagundatavuse katse tulemusi (katsemeetod C.4 (17) või C.29 (18)). Lahustuvuse ja aururõhu põhjal võib arvutada Henry konstandi, mis võimaldab hinnata, kas katse ajal võib esineda uuritava kemikaali kadu aurustumise tõttu. Katset läbiviimist ilma eespool osutatud andmeteta tuleks hoolikalt kaaluda, sest uuringu kavandamisel tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalise-keemilisi omadusi ning ilma sellekohaste andmeteta võib katse tulemuste tõlgendamine osutuda raskeks või võimatuks. Uuritava kemikaali kvantitatiivseks määramiseks katselahustes peaks olema olemas usaldusväärne teadaoleva dokumenteeritud täpsuse ja avastamispiiriga analüüsimeetod. Vees lahustuvat uuritavat kemikaali võib lahustada lahendusvee alikvootides kontsentratsioonis, mis võimaldab kemikaali lisada läbivoolusüsteemi kaudu vajalikus katsekontsentratsioonis. Toatemperatuuril vedelate või tahkete ja vees mõõdukalt lahustuvate kemikaalide puhul võib olla vajalik vedelikul või tahkel materjalil (nt klaasvill) põhinev küllastuskolonn (19). Väga hüdrofoobseid uuritavaid kemikaale võib olla võimalik manustada söödaga, kuid seda kokkupuuteviisi ei ole käesoleva katsemeetodi rakendamisel kuigi palju kasutatud.
  
21. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks tuleks uuritavat kemikaali lahendusvees lihtsalt mehaaniliselt segada või loksutada (kasutades nt segurit ja/või ultraheli töötlust). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne/-süsteeme või passiivse doseerimise meetodeid (20). Eelistatavalt tuleks kasutada ilma kaaslahustita katsesüsteemi, kuid kuna uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalise-keemilised omadused, tuleb kokkupuutevee valmistamisel tõenäoliselt kasutada erinevaid läheneemisviise. Lahustite ja kandeainete kasutamist tuleks kõigi vahenditega vältida, sest 1) teatavad lahustid võivad olla ise mürgised ja/või põhjustada

▼ **M8**

soovimatuid või ootamatuid reaktsioone; 2) kemikaalide uurimine nende vees lahustuvusest kõrgemal kontsentratsioonil (nagu lahusteid kasutades sageli juhtub) võib raskendada toimet avaldava kontsentratsiooni täpset määramist; 3) lahustite kasutamine pikaajalistes katsetes võib põhjustada mikroobide tegevusega seotud märkimisväärset biokile moodustumist, mis võib mõjutada keskkonnatingimusi ja kokkupuutekontsentratsioonide säilitamise võimet ning 4) kui puuduvad varasemad andmed, mille kohaselt lahusti ei moonuta uuringu tulemust, tuleb lahusti kasutamiseks teha lahusti kontrollprooviga töötlemine, mis aga mõjutab oluliselt loomade heaolu, kuna katse jaoks on sel juhul vaja rohkem loomi. Raskesti uuritava kemikaali korral võib lahustit kasutada viimase võimalusena ning arvesse tuleb võtta OECD juhendit raskesti uuritavate ainete ja segude veekeskkonnas avalduva mürgisuse uurimise kohta (21), et teha kindlaks parim meetod. Lahusti valiku määravad uuritava kemikaali keemilised omadused ja olemasolevad varasemad kontrollandmed lahusti kasutamise kohta. Varasemate andmete puudumise korral tuleks lahusti sobivus kindlaks teha enne lõplikku uuringut. Kui lahusti kasutamine on vältimatu ja ilmneb mikroobne aktiivsus (biokile teke), on soovitatav biokile tekkimine igas nõus kogu katse jooksul (vähemalt kord nädalas) registreerida/protokollida. Ideaaljuhul peaks lahusti kontsentratsioon olema lahusti kontrollrühmas ja kõigis töödeldavates rühmades pidevalt ühtlane. Kui lahusti kontsentratsioon ei ole pidevalt ühtlane, tuleks lahusti kontrollrühmas kasutada töödeldavates rühmades kasutatavat suurimat lahusti kontsentratsiooni. Lahusti kandevaine kasutamise korral ei tohiks lahusti suurim kontsentratsioon ületada 100 µl/l või 100 mg/l (21) ja soovitatav on hoida lahusti kontsentratsioon võimalikult väike ( $nt \leq 20 \mu\text{l/l}$ ), et vältida lahusti võimalikku mõju mõõdetavatele näitajatele (22).

**Katseloomad***Katseliik*

22. Katseliik *X. laevis* on valitud järgmistel põhjustel: 1) seda kasvatatakse laborites kõikjal maailmas, 2) see on kaubanduses lihtsalt kättesaadav ning 3) sellel on võimalik kindlaks teha geneetilist sugu.

*Täiskasvanute hooldus ja järglaste saamine*

23. *X. laevis*'e nõuetekohast hooldust ja järglaste saamist on kirjeldatud standardjuhendis (23). *X. laevis*'e kasvatuskohta ja hooldamist on kirjeldanud ka Read (24). Sigimise esilekutsumiseks süstitakse kolmele kuni viiele täiskasvanud emas- ja isaslooma paarile kõhuõõnde inimese kooriongonadotropiini (hCG). Emas- ja isasisenditele süstitakse näiteks vastavalt ligikaudu 800–1 000 RÜd ja 500–800 RÜd hCG-d, mis on lahustatud 0,6–0,9 % füsioloogiliseks lahuses (või Ringeri lahuses, mis on kahepaiksetel kasutatav isotooniline füsioloogiline lahus). Süstemaht peaks olema ligikaudu 10 µl kehamassi grammi kohta (~1 000 µl). Sigimispäree hoitakse seejärel suurtes nõudes, häirimata ja püsivates tingimustes, et esile kutsuda kopulatsiooni. Igas sigimisnõus peaks olema roostevabast terasvõrgust topeltpõhi (nt võrguavadega 1,25 cm), millest munad kukuvad läbi nõu põhjale. Hilisel pärastlõunal hCG-ga süstitud konnad koevad enamiku mune järgmise päeva hommikupoolikul. Kui on koetud ja viljastatud piisav kogusmune, eemaldatakse täiskasvanud isendid sigimisnõust. Seejärel kogutakse munad kokku ja nende kallerkest eemaldatakse L-tsüsteiini abil (23). Selleks valmistatakse 2 % L-tsüsteiini lahus, mille pH viiakse 1 M NaOH abil väärtuseni 8,1. Saadud lahus temperatuuriga 21 °C lisatakse ühe kudu mune sisaldavasse 500 ml koonilisse kolbi, mida keerutatakse ettevaatlikult üks kuni kaks

**▼M8**

minutit. Seejärel loputatakse mune põhjalikult 6–8 korda 21 °C kasvatamisveega. Seejärel pannakse munad kristallisaatorisse ning kontrollitakse, kas nende eluvõimelisus on > 70 % ning alanud rakkude jagunemisega embrüote seas ei esine olulisel määral kõrvalekaldeid.

**KATSEPLAAN****Uuritavad kontsentratsioonid**

24. Soovitav on kasutada vähemalt kemikaali nelja kontsentratsiooni ning lisaks sobivaid kontrollproove (sealhulgas lahusti kontrollproov, kui see on vajalik). Üldiselt soovitatakse, et kontsentratsioonide jada lahjendustegur ei oleks üle 3,2.
25. Käesoleva katsemeetodi puhul tuleks suurima uuritava kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võimaluste piires kasutada kahepaiksetega tehtud varasemate uuringute tulemusi, et vältida selgelt mürgiseid kontsentratsioone. Kõnealuse kontsentratsiooni kindlaksmääramisel võib kasutada näiteks kvantitatiivse struktuur-aktiivsussõltuvusest, analoogmeetoditest ja varasematest kahepaiksetega tehtud uuringutest saadavat teavet. Sellised uuringud on näiteks kahepaiksete metamorfoosi katse (katsemeetod C.38 (25)), konnaembrüo teratogeneesi katse – *Xenopus* (23) ja/või näiteks katsemeetodite C.48, C.41 ja C.49 kohaselt kaladega tehtud katsed (26–28). Enne LAGDA-t võib läbi viia vahemiku leidmise katse. Soovitavalt tuleks vahemiku leidmiseks kasutatavat kokkupuudet alustada 24 tunni jooksul pärast viljastamist ning see peaks kestma 7–14 päeva (vajadusel kauem). Uuritavad kontsentratsioonid valitakse nii, et nende vahe ei oleks suurem kui 10-kordne. Vahemiku leidmise katse tulemuste põhjal tuleks valida suurim LAGDA-s kasutatav uuritav kontsentratsioon. Pange tähele, et kui on vaja kasutada lahustit, siis saab lahusti sobivuse (st kas see võib mõjutada uuringu tulemusi) samuti välja selgitada vahemiku leidmise katse osana.

**Töödeldavate rühmade ja kontrollrühmade paralleelnõud**

26. Iga uuritava kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt nelja ja kontrollproovidega (sh vajadusel lahusti kontrollprooviga) vähemalt kaheksat paralleelnõud (st vajaliku statistilise võimsuse tagamiseks peaks katsenõude arv tavalises ja vajadusel lahusti kontrollrühmas olema kaks korda suurem kui igas töödeldavas rühmas). Ühes paralleelnõus olevate loomade arv ei tohiks olla suurem kui 20. Väikseim lubatud loomade arv on 15 (viis NFi järgi 62. staadiumis võetava osaproovi jaoks ja kümme noorlooma staadiumi kasvatamiseks). Ent igasse paralleelnõusse lisatakse täiendavaid loomi, et võimaliku suremuse korral ei langeks loomade arv alla 15 looma alampiiri.

**KATSE KÄIK****Katse ülevaade**

27. Katsed alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10. staadium) ja see kestab kuni noorlooma staadiumini. Iga päev kontrollitakse loomade suremust ja kõrvalekaldeid käitumises. NFi järgi 62. staadiumis võetakse kulltest osaproov (kuni 5 looma paralleelnõu kohta) ja mõõdetakse neil erinevaid näitajaid (tabel 1). Kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, st läbinud moonde (või 70. päeval pärast katse alustamist, kui see saabub varem), vähendatakse juhuslikkuse alusel (aga ilma osaproovi võtmata) loomade arvu (10 loomani nõu kohta; vt punkt 43) ning alles jäänud

**▼M8**

loomadel jätkatakse kokkupuudet, kuni on möödunud veel 10 nädalat kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast alates. Katse lõpus (noorloomade proov) tehakse täiendavad mõõtmised (tabel 1).

**Kokkupuutetingimused**

28. Katse parameetrite täielik ülevaade on esitatud 3. liites. Kokkupuuteperioodil tuleks katselahustes iga päev mõõta lahustunud hapnikku, temperatuuri ja pH-d. Elektrijuhtivust, leelisust ja karedust mõõdetakse kord kuus. Katselahuse temperatuuride (päevisisene) erinevus paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 1,0 °C. Samuti ei tohiks pH mõõtmisel paralleelnõude ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vaheline erinevus olla suurem kui 0,5.
29. Kokkupuutenõudest võib iga päev sifooni abil eemaldada alles jäänud sööda ja jäätmed, vältides sealjuures hoolikalt nõude ristsaastumist. Loomadele tuleb tekitada võimalikult vähe stressi ja traumasid, eriti nende ümbertõstmise ja käsitemise ning akvaariumi puhastamise ajal. Vältida tuleb stressi tekitavaid tingimusi/tegevusi (nt vali ja/või lakkamatu müra, akvaariumidele koputamine, nõu vibratsioon).

**Uuritava kemikaaliga kokkupuute kestus**

30. Kokkupuutekatset alustatakse äsja koetud embrüotega (NFi järgi 8.–10. staadium) ning seda jätkatakse kümne nädala möödumiseni kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanajast ( $\leq 45$  päeva alates katse algusest). Üldjuhul kestab LAGDA 16 nädalat (maksimaalselt 17 nädalat).

**Katse alustamine**

31. Katse alustamiseks tuleb valida sellised vanemloomad, kes on kontrollitult suutnud anda geneetilisel kindlakstehtavast soost järglasi (5. liide). Kui täiskasvanud loomad on kudenud, kogutakse embrüod, millelt eemaldatakse tsüsteiiniga töötlemise teel kallerkest ja mille eluvõimelisust kontrollitakse (23). Tsüsteiiniga töötlemine võimaldab embrüoid kontrolli ajal käsitseda, ilma et need pindade külge kleepuksid. Kontroll tehakse stereomikroskoobi all ja eluvõimetud embrüod eemaldatakse sobiva suurusega pipeti abil. Eelistatult tuleks katses kasutada ühte kudu, milles eluvõimeliste embrüote osakaal on üle 70 %. NFi järgi 8.–10. staadiumis olevad embrüod jaotatakse juhuslikkuse alusel ettenähtud koguses lahjendusveti sisaldavate katsenõude vahel, kuni igas nõus on 20 embrüot. Embrüoid tuleks ümberpaigutamise ajal käsitseda ettevaatlikult, et vähendada sellest tingitud stressi ja vältida nende vigastamist. Kui viljastamisest on möödunud 96 tundi, peaksid kulleled olema veesambas ülespoole liikunud ja hakanud kinnituma nõu külgedele.

**Söötmissrežiim**

32. Sööt ja söödaratsiooni muutmine *X. laevis*'e eri arengustaadiumides on LAGDA meetodika puhul väga oluline. Kulleste ülesöötmise suurendab tavaliselt skolioosi esinemissagedust ja raskusastet (8. liide) ning sellest tuleks hoiduda. Teisalt põhjustab kulleste alasöötmine kontrollrühmas väga suuri erinevusi loomade arengu kiiruses, mis võib vähendada katse tulemuste

▼ **M8**

statistilist võimsust või selgust. Läbivoolusüsteemides kasutatavat *X. laevis* 'e kulleste ja noorloomade sööta ja söötmisrežiimi käsitlevad soovitusel on esitatud 4. liites, kuid tingimusel, et katseorganismide kasv ja areng on rahuldav, on lubatud ka muud variandid. Oluline on arvestada, et kui mõõdetakse endokriinsüsteemiga seotud näitajaid, ei tohi sööt sisaldada endokriinsüsteemi mõjutavaid aineid, näiteks sojajahu.

*Kulleste söötmine*

33. Kulleste puhul soovitatakse söödana kasutada kasvatamisvees (või lahjendusvees) kokku segatud forelli noorkalade sööda, *Spirulina* vetika tablettide ja kuldkala söödaahelveste (nt helbed TetraFin<sup>®</sup>, Tetra, Saksamaa) segu. Kõnealust segu antakse kullestele tööpäevadel kolm korda päevas ja nädalavahe- tusel kord päevas. Lisaks söödetakse kulleseid alates kaheksandast viljasta- misjärgsest päevast tööpäevadel kaks korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas 24 tunni vanuste elusate soolavähivastsetega (*Artemia* spp.). Kulleste söödaratsioon peaks olema igas katsenõus ühesugune ning võimal- dama katse tulemuste korratavuse ja ülekantavuse tagamiseks katseloomade piisavat kasvu ja arengut: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise mediaanaeg kontrollrühmas peaks olema  $\leq 45$  päeva ja 2) kontrollrühma loomade kesk- mine kehamass 62. staadiumis peaks olema  $1,0 \pm 0,2$  g.

*Noorloomade söötmine*

34. Pärast moonet tuleks söötmisrežiimis kasutada kvaliteetset uppuvat konna- sööta, nt Sinking Frog Food 3/32 (Xenopus Express, FL, Ameerika Ühend- riigid) (4. liide). Kui noorkonnad on veel väikesed, jahvatatakse graanuleid põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmril, et vähendada nende suurus. Kui noorloomad on piisavalt suured täismõõdus graanulite söömiseks, ei ole jahvatamine või peenestamine enam vajalik. Loomi tuleks sööta kord päevas. Noorloomade söötmine peaks võimaldama organismide piisavat kasvu ja arengut: soovitatavalt peaks noorloomade keskmine keha- mass kontrollrühmas katse lõpetamise ajaks olema  $11,5 \pm 3$  g.

**Analüütiline keemia**

35. Enne katse alustamist tuleb hinnata uuritava kemikaali püsivust (nt lahustu- vust, lagundatavust ja lenduvust) ning kõik vajalikud analüüsimeetodid tuleb valida olemasolevate andmete või teadmiste põhjal. Kui kemikaali annusta- takse lahjendusveega, on soovitatav enne katse algust analüüsida kõikidest paralleelnõudest võetud uuritavaid lahuseid, et kontrollida süsteemi toimivust. Kokkupuuteperioodil määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid sobi- vate ajavahemike järel, eelistatavalt igal nädalal iga töödeldava rühma vähe- malt ühes paralleelnõus, jälgides, et eri nädalatel kasutataks sama töödeldava rühma erinevaid paralleelnõusid. Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud kogu katse jooksul säilitada rahuldavalt vahemikus  $\pm 20$  % nimikontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda kas nimi- või mõõdetud väärtustel. Lisaks ei tohi ühegi töödeldava rühma sees mõõdetud katsekontsentratsioonide variatsioonikoefitsient kogu katse vältel ühegi kont- sentratsiooni puhul ületada 20 % Kui mõõdetud kontsentratsioonid ei jää nimikontsentratsiooniga võrreldes vahemikku 80–120 % (nt kui uuritakse tugevalt biolagunevaid või adsorbeeruvaid kemikaale), tuleb määrata toimet avaldavad kontsentratsioonid ning esitada need suhtarvuna läbivoolukatsete kontsentratsioonide aritmeetilise keskmise suhtes.

## ▼M8

36. Lahjendusvee ja põhilahuse vooluhulkasid tuleb kontrollida sobivate ajavahemike järel (nt kolm korda nädalas) kogu kokkupuuteperioodi vältel. Kui kasutatakse kemikaale, mille esinemist ei ole võimalik mõne või ühegi nimikontsentratsiooni juures tuvastada (nt seepärast, et nad lagunevad kiiresti või adsorbeeruvad katsenõule või akumuleeruvad suurel määral katseloomade kehasse), soovitatakse kõikides kambrites katselahuse uuendamise sagedust kohandada nii, et uuritavad kontsentratsioonid püsiksid võimalikult ühtlased.

**Vaatlused ja näitajate mõõtmine**

37. Kokkupuute käigus hinnatakse nii mürgisusele osutavaid näitajaid (sh suremus, ebatavaline käitumine, näiteks kliinilised haiguse ja/või üldised mürgisuse sümptomid ning pikkusel ja kehamassil põhinevad kasvunäitajad) kui ka patoloogilisi näitajaid, mis võivad reageerida nii üldisele mürgisusele kui ka östrogenide, androgeenide või kilpnäärme kaudu mõjuvatele endokriinsetele toimemehhanismidele. Lisaks võib katse lõpetamisel mõõta plasma VTG kontsentratsiooni. VTG mõõtmine võib aidata mõista uuringu tulemusi endokriinsete mehhanismide valguses, kui uuritakse võimalikke endokriinfunktsiooni kahjustavaid kemikaale. Tabelis 1 on esitatud ülevaade mõõdetavatest näitajatest ja mõõtmisaegadest.

Tabel 1

**Ülevaade LAGDA näitajatest**

Näitajad (*)	Iga päev	Vaheproov (kulleste proov)	Katse lõpetamisel (noorkonnade proov)
Suremus ja kõrvalekalded	X		
NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg		X	
Histo(pato)loogia (kilpnääre)		X	
Morfoloogia (kehamassi ja pikkuse juurdekasv)		X	X
Maksa somaatiline indeks (LSI)			X
Geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine			X
Histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhad, neerud ja maks)			X
Vitellogeniin (VTG) (valikuline)			X

(\*) Kõiki näitajaid analüüsitakse statistiliselt.

**Suremus ja igapäevased vaatlused**

38. Kõiki katsenõusid tuleb iga päev kontrollida surnud loomade suhtes ja iga nõu puhul tuvastatud suremus registreeritakse. Surnud loomad tuleks katsenõust eemaldada kohe, kui neid märgatakse. Surnud loomad liigitatakse arengustaadiumi põhjal (NFi järgi) järgmistesse rühmadesse: enne 58. staadiumit (esijäsemete moodustumist), 58.–62. staadium, 63.–66. staadium (62. staadiumi ja saba täieliku resorbeerumise vahel), pärast 66. staadiumit (kullesejärgne staadium). Suremuse määr üle 20 % võib osutada sobimatutele katsetingimustele või uuritava kemikaali selgele mürgisusele. Loomade

▼ **M8**

suremine kemikaalist sõltumatutel põhjustel on kõige tõenäolisem esimestel arengupäevadel pärast kudemist ja moonde haripunkti ajal. Taolistel põhjustel tekkinud suremust võib olla võimalik tuvastada kontrollrühma andmete põhjal.

39. Lisaks tuleks registreerida igasugune täheldatud ebatavaline käitumine, selgelt nähtavad väärendid (nt skolioos) ja haavandid. Vaadeldud skolioosijuhud tuleks loendada (esinemissagedus) ja neile tuleks määrata raskusaste (nt ebaoluline – NR, kerge – 1, mõõdukas – 2, raske – 3; 8. liide). Mõõduka ja raske skolioosi esinemist tuleks püüda kogu uuringu vältel piirata (nt et see jääks kontrollrühmades alla 10 %), kuigi ka kontrollrühmades esinev suurem esinemissagedus ei ole tingimata põhjus katse katkestamiseks. Normaalse käitumisega kulleled hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted liiguvad ja nad reageerivad ärritajatele. Ebatavalise käitumise näideteks on pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, kõht ülespidi või ebakorrapärane ujumine, pinnale mittetõusmine ja ärritajatele mitte reageerimine. Pärast moonet tuleks lisaks eespool nimetatud ebatavalisele käitumisele registreerida ka töödeldavate rühmade vahel esinevad suured erinevused sööda tarbimises. Olulisteks väärenditeks ja kahjustusteks võivad muu hulgas olla morfoloogilised kõrvalekalded (nt deformeerunud jäsemed), veritsevad haavandid, kõhuturse, bakteri- või seennakkused. Noorkonnade peas vahetult söõrmete taga esinevad haavandid võivad osutada ebapiisavale niiskustasemele. Kõnealused otsustused on kvalitatiivsed ja neid tuleks võrdluses kontrollrühma loomadega käsitada kui haiguse või stressi kliinilisi tunnuseid. Kui selliste tunnuste esinemissagedus on kokkupuutenõudes suurem kui kontrollnõudes, tuleks neid käsitada selge mürgisuse tunnustena.

**Kulleste osaproov***Kulleste osaproovi kirjeldus*

40. NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kulleled tuleks nõudest eemaldada ning kasutada neid proovi võtmiseks või viia nad kokkupuutekatse järgmiseks etapiks üle uude nõusse või eraldada nad vaheseinaga teistest samasse nõusse jäävatest kullestest. Kulleseid kontrollitakse iga päev ning iga kullese puhul registreeritakse uuringupäev, mil see jõuab NFi järgi 62. staadiumisse. Kõnealune hinnang antakse eelkõige peakuju põhjal. Isend tunnistatakse NFi järgi 62. staadiumisse jõudnuks siis, kui pea suurus on nii palju vähenenud, et selle laius on ligikaudu võrdne kullese kehatüve laiusega ja esijäsemed on kohakuti südame keskjoonega.
41. Eesmärk on võtta igast paralleelnõust prooviks viis NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud kullest. Seda tuleks teha täiesti juhuslikult, aga juhusliku valiku numbrid peaksid olema eelnevalt otsustatud. **Joonisel 1** on esitatud paralleelnõu hüpoteetiline näidis. Kui nõus on elus kõik 20 kullest, tuleks selle nõu esimese isendi NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise hetkel valida vahemikust 1–20 viis juhuslikku numbrit. Kuller nr 1 on isend, kes jõudis NFi järgi 62. staadiumisse esimesena, ja kuller nr 20 on isend, kes jõudis selles nõus 62. staadiumisse viimasena. Kui nõus on elus 18 kullest, siis valitakse viis juhuslikku numbrit sarnasel moel vahemikust 1–18. Seda tuleks teha iga paralleelnõu puhul siis, kui esimene kuller jõuab seal NFi järgi 62. staadiumisse. Kui NFi järgi 62. staadiumis olevatest kullestest proovide võtmise ajal esineb surmajuhtumeid, tuleb juhuslikku valikut korrata, lähtudes veel NFi järgi 62. staadiumi eelsesolekusse jäänud kulleste arvust ja nõu kohta viie proovini jõudmiseks vajalike võtmata proovide arvust. Päeval, kui mõni kuller jõuab NFi järgi 62. staadiumisse, vaadatakse



## ▼M8

varem koostatud proovivõtutabelist, kas see kullas tuleb võtta proovi või eraldada kokkupuutekatse jätkamiseks füüsiliselt ülejäänud kullestest. Esitatud näites (joonisel 1) tuleb esimene NFi järgi 62. staadiumisse jõudnud isend (lahter 1) ülejäänud kullestest füüsiliselt eraldada ja jätta kemikaaliga kokkupuutesse; ühtlasi tuleb registreerida uuringupäev, millal isend NFi järgi 62. staadiumisse jõudis. Järgnevat isendeid nr 2 ja nr 3 koheldakse samuti nagu esimest, aga isend nr 4 (selle konkreetse näite puhul) võetakse proovi, et mõõta juurdekasvu ja kilpnäärme histoloogiat. Sama toimingut korratakse kuni 20. isendi lisamiseni teistele NFi järgi 62. staadiumi järgses katsetapis olevatele isenditele või proovi võtmiseni. Kasutatav juhusliku valiku kord peab tagama igale katseorganismile ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Selle saavutamiseks võib kasutada mis tahes juhusliku valiku meetodit, aga samas kehtib nõue, et iga kullas tuleb NFi järgi 62. staadiumi proovide võtmise perioodil mingil hetkel võrgu abil nõust välja tõsta.

Joonis 1

## Hüpoteetiline näide NFi järgi 62. staadiumi proovivõturežiimi kohta ühe paralleelnõu puhul



42. Kulleste osaproovi võtmisel mõõdetakse järgmised näitajad: 1) NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (st päevade arv viljastamisest 62. staadiumisse jõudmiseni), 2) välised vääringud, 3) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus) ning 4) kilpnäärme histoloogia.

*Kulleste humaanne surmamine*

43. Osaproovi võetud NFi järgi 62. staadiumis olevate kulleste (viis isendit paralleelnõu kohta) surmamiseks tuleks nad asetada 30 minutiks vajalikus koguses (nt 500 ml) anesteetikumilahusesse (nt trikaiinmetaansulfonaadi (MS-222, CASi nr 886-86-2) 0,3 % lahus). MS-222 lahust tuleks puhverdada naatriumvesinikkarbonaadiga kuni pH ligikaudse väärtuseni 7,0, sest puhverdama MS-222 lahus on happeline, ärritab konnade nahka ning põhjustab halba imendumist ja tarbetut lisastressi organismidele.
44. Kullese eemaldamiseks katsenõust ja surmamislahusesse asetamiseks kasutatakse sõelvõrku. Loom on nõuetekohaselt surmatud ja lahanguks valmis siis, kui ta ei reageeri välistele ärritajatele (nt tagajäseme pigistamisele pintsettidega).

*Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)*

45. Iga kullese märgmassi (milligrammi täpsusega) ja pikkust ninamikust pärakuavani (0,1 mm täpsusega) tuleks mõõta kohe, kui kullas on anesteetikumi mõjul reaktsioonivõimeks muutunud (joonis 2a). Pildialalüüsi tarkvara kasutades võib ninamiku ja pärakuava vahekaugust mõõta ka fotodelt. Liigse

▼ **M8**

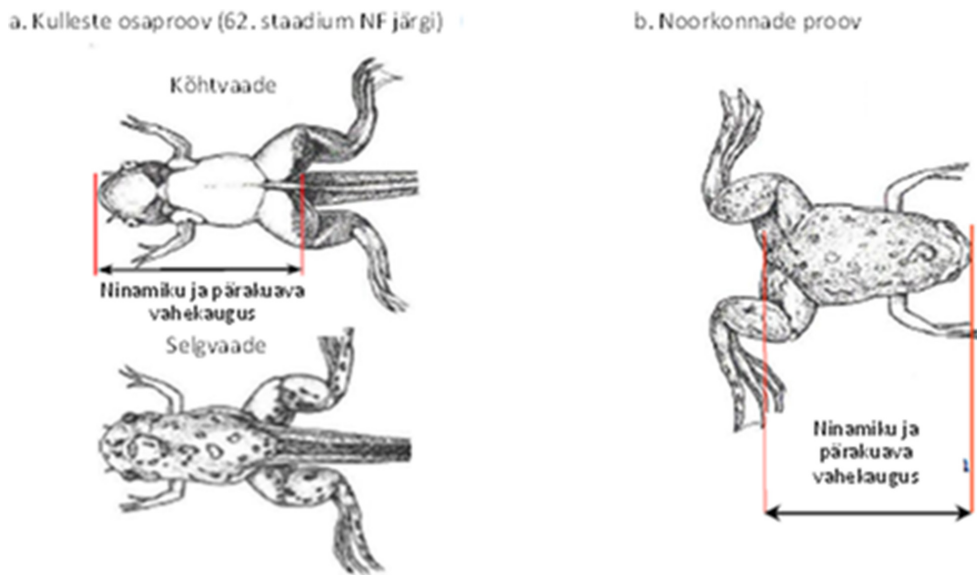
vee eemaldamiseks tuleks kulleled enne kaalumist kuivatuspaberiga kuivatada. Pärast kasvunäitajate (kehamass ning ninamiku ja pärakuava vahedkaugus) mõõtmist tuleks registreerida (soovitavalt elektrooniliselt) või üles märkida tuvastatud suured morfoloogilised kõrvalekalded ja/või mürgisuse kliinilised tundemärgid, näiteks skolioos (vt 8. liide), petehhia ja verejooksud. Petehhia avaldub nahkapillaaride punaste või lillade täppverevalumitena.

*Koeproovide võtmine ja fikseerimine*

46. Kulleste osaproovi puhul kasutatakse histoloogiliseks analüüsiks kilpnääret. Alakeha lõigatakse esijäsemete tagant maha ja kõrvaldatakse. Lühendatud rümp fikseeritakse Davidsoni fikseerimislahuses. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede ligikaudne ruumala. Fikseerimislahust tuleb huvi pakkuvate kudede nõuetekohaseks fikseerimiseks piisavalt loksutada või keerutada. Kõik koeproovid jäetakse Davidsoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formalini lahuses (1, 29).

*Kilpnäärme histoloogia*

47. Kõigil kulleseproovidel tehakse (pärast kudede fikseerimist) kilpnäärme histoloogiline analüüs: diagnoos ja raskusastme määramine (29, 30).



**Joonis 2.** LAGDAs kasutatavad ninamiku ja pärakuava vahedkauguse mõõtmise punktid NF-i järgi 62. staadiumis (a) ja noorkonnadel (b). NF-i järgi 62. staadiumi (a) iseloomulikud tunnused: pea laius on võrdne kehatüve laiusega, haistmisnärvi pikkus on väiksem kui haistmissibula läbimõõt (selgvaates) ja esijäsemed on südamega samal joonel (kõhtvaates). Piltide allikas: Nieuwkoop ja Faber (1994).

**Kulleste kokkupuute lõpetamine**

48. Kulleste algset arvu arvestades võib eeldada, et väike osa isenditest ei arene normaalselt ega lõpeta moonet (NF-i järgi 66. staadium) mõistliku aja jooksul. Kullesestaadiumis kasutatav kokkupuuteaeg ei tohiks ületada 70 päeva. Kõik

**▼M8**

selle perioodi lõpuks alles jäänud kulleseid tuleks surmata (vt punkt 43) ning seejärel mõõta nende märgmass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus, kindlaks teha nende arengustaadium Nieuwkoop ja Faberi (1994) järgi ning märkida üles nende väärarengud.

**Praakimine NFi järgi 66. staadiumi järel**

49. Alates NFi järgi 66. staadiumist (saba täielik resorbeerumine) tuleks kokkupuutekatse lõpuni alles jätta kümme isendit nõu kohta. Seega tuleks praakimine läbi viia siis, kui kõik loomad on jõudnud NFi järgi 66. staadiumisse, või 70 päeva möödumisel (olenevalt sellest, kumb on varasem). NFi järgi 66. staadiumi järel kokkupuutekatsest eemaldatavad loomad valitakse juhuslikult.
50. Loomad, kellega kokkupuutekatset ei jätkata, surmatakse (vt punkt 43). Igal loomal mõõdetakse arengustaadium, märgmass ning ninamiku ja pärakuava vahekaugus (joonis 2b), samuti tehakse üldine lahang. Fenotüübiliseks sooks (sugunäärme morfoloogia põhjal) märgitakse emane, isane või ebaselge.

**Noorkonnade proov***Noorkonnade proovi kirjeldus*

51. Alles jäänud loomad jäetakse kemikaaliga kokkupuutesse kümnenda nädalani pärast lahendusvee (ja/või vajadusel lahusti) kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega. Kokkupuuteperioodi lõpuks alles jäänud loomad (kuni 10 konna paralleelnõu kohta) surmatakse, nende erinevaid näitajaid mõõdetakse või hinnatakse ning need registreeritakse: 1) morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus), 2) fenotüübiline/genotüübiline sooline jaotumine, 3) maksa mass (maksa somaatiline indeks), 4) histopatoloogia (sugunäärmed, sugujuhjad, maks ja neerud) ning valikuliselt 5) plasma VTG-sisaldus.

*Konnade humaanne surmamine*

52. Moonde läbinud noorkonnad surmatakse anesteetikumi (nt sobiva fosfaadipuhvriga 10 % MS-222 lahus) süstimisega kõhuõõnde. Konnadelt proovide võtmist võib alustada pärast seda, kui nad ei reageeri enam ärritajatele (tavaliselt umbes kaks minutit pärast süsti, kui kasutatakse 10 % MS-222 lahust annuses 0,01 ml konna kehamassi grammi kohta). Kuigi noorkonnad võib panna ka suurema kontsentratsiooniga anesteetikumilahusesse (MS-222), on kogemused näidanud, et selle meetodi korral kulub nende tuimastamiseks rohkem aega ja see võib proovide võtmist raskendada. Süst tagab tõhusa ja kiire surmamise enne proovide võtmist. Proovide võtmist ei tohiks alustada enne, kui konnade reaktsioonivõime kadumist on kontrollitud veendumaks, et loomad on surnud. Kui konnadel ilmneb märkimisväärselt kannatuste tunnuseid (mis on väga raskekujulised ja konnade surm on usaldusväärselt prognoositav) ja nad on surmaeelses seisundis, tuleks nad tuimastada ja surmata ning arvestada nende andmetega suremuse analüüsimisel. Haigestunud konnade surmamise juhud tuleb üles märkida ja neid katseprotokollis kajastada. Olenevalt sellest, millisel uuringuetapil konn surmatakse, võidakse konna säilitada histopatoloogiliseks analüüsiks (konnade fikseerimine võimalikuks histopatoloogia uuringuks).

*Morfoloogilised näitajad (kehamass ja pikkus)*

53. Märgmassi ning ninamiku ja pärakuava vahekaugust (joonis 2b) mõõdetakse samuti nagu kulleste osaproovi puhul.

▼ **M8***Plasma VTG -sisaldus (valikuline)*

54. VTG on laialdaselt kasutatav biomarker, mis näitab kokkupuudet östrogeen-sete kemikaalidega. LAGDA puhul võib plasma VTG-sisaldust soovi korral mõõta noorkonnade proovides (eelkõige võib see olla vajalik juhul, kui uuritav kemikaal võib olla östrogeen).
55. Surmatud noorkonna tagajäsemed lõigatakse maha ja vereproov võetakse hepariniseeritud kapillaartoruga (aga sobida võib ka mõni muu vereproovi võtmise meetod, nt südame punktsioon). Veri lastakse mikrotsentrifuugianumase (nt mahuga 1,5 ml) ja seda tsentrifuugitakse plasma eraldamiseks. Plasmaproove tuleks hoida –70 °C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni VTG määramiseni. VTG kontsentratsiooni plasmas saab mõõta ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga (6. liide) või mõne muu meetodi, näiteks massispektromeetria abil (31). Suurema tundlikkuse tõttu eelistatakse liigispetsiifiliste antikehade kasutamist.

*Geneetilise soo määramine*

56. Iga noorkonna geneetilist sugu hinnatakse Yoshimoto *et al.* (11) välja töötatud markerite põhjal. Geneetilise soo määramiseks eemaldatakse lahkamise ajal osaliselt (või tervikuna) üks tagajäse (või muu kude), mida säilitatakse mikrotsentrifuugianumas (konnade koeproove võib võtta mis tahes koest). Koeproove hoitakse –20 °C juures või sellest madalamal temperatuuril kuni desoksüribonukleiinhappe (DNA) eraldamiseni. Koest DNA eraldamiseks võib kasutada müügilolevaid komplekte ning markeri esinemise või puudumise analüüsiks kasutatakse polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit (5. liide). Üldjuhul on histoloogilise ja genotüübilise soo kokkulangevus kontrollrühmade noorkonnade seas proovi võtmise hetkel üle 95 %.

*Koeproovide võtmine ja fikseerimine histopatoloogilise analüüsi jaoks*

57. Viimase proovivõtu ajal võetakse loomadelt histoloogilise analüüsi tegemiseks sugunäärmed, sugujuhjad, neerud ja maksad. Kõhuõõs avatakse ning maks lõigatakse välja ja kaalutakse. Järgmiseks eemaldatakse alakõhust ettevaatlikult seedeorganid (nt magu, sooled), et paljastada sugunäärmed, neerud ja sugujuhjad. Sugunäärmetel leitud suured morfoloogilised kõrvalekalded tuleb üles märkida. Lõpuks tuleb eemaldada tagajäsemed, kui neid ei ole vereproovi võtmiseks juba varem eemaldatud. Eemaldatud maksad ja *in situ* jäetud sugunäärmetega rümp tuleb kohe asetada Davidsoni fikseerimislahusesse. Fikseerimislahuse kogus nõus peaks olema vähemalt 10 korda suurem kui kudede ligikaudne ruumala. Kõik koeproovid jäetakse Davidsoni fikseerimislahusesse vähemalt 48 tunniks, aga mitte rohkem kui 96 tunniks. Seejärel loputatakse neid deioniseeritud vees ja säilitatakse neutraalse puhvriga 10 % formaliiini lahuses (1, 29).

*Histopatoloogiline analüüs*

58. Kõiki noorkonnadelt võetud proove analüüsitakse histoloogiliselt, et leida sugunäärmete, sugujuhjade, neerude ja maksakoe patoloogiaid, panna diagnoos ja määrata raskusaste (32). Hindamise käigus selgitatakse välja ka sugunäärmete (nt munajuhjad, munandid, intersoolised organid) fenotüüp ning neid vaatlusandmeid saab koos isendi geneetilise soo mõõtmise andmetega kasutada fenotüübilise/genotüübilise soolise jaotumise arvutamiseks.

▼ **M8****ANDMED JA ARUANDLUS****Statistiline analüüs**

59. LAGDaga saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed (kehamass, ninamiku ja pärakuava vahekaugus, maksa somaatiline indeks, VTG), 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (päevade arv katse algusest kuni NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul.
60. Katseplaan ja valitud statistilised testid peaksid soovitatavalt tagama piisava statistilise võimsuse, et tuvastada näitajate bioloogiliselt olulisi muutusi katses, mille puhul tuleb esitada täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) või toimet avaldav kontsentratsioon (EC<sub>x</sub>). Andmete statistiline analüüs (üldjuhul paralleelproovide keskväärtuste põhjal) peaks eelistatavalt toimuma vastavalt meetoditele, mida on kirjeldatud OECD koostatud juhendis ökotoksilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsete meetodite rakendamise kohta (33). Käesoleva katsemeetodi 7. liites on esitatud soovitatav otsustuskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks ja juhised andmete töötlemiseks ning LAGDA puhul sobivaima statistilise testi või mudeli valimiseks.
61. Kuna genotüübiline sugu tehakse kindlaks kõikide konnade puhul, tuleks noorkonnade proovi andmeid (nt kasv, maksa somaatiline indeks) analüüsida mõlema genotüübilise soo kohta eraldi.

**Andmete analüüsiga seotud kaalutlused***Rikutud paralleelproovide ja töödeldud rühmade kasutamine*

62. Paralleelproove ja töödeldud rühmasid võib rikkuda selgest mürgisusest, haigusest või tehnilisest veast tingitud liiga kõrge suremus. Kui mõni töödeldud rühm on haiguse või tehnilise vea tagajärjel rikutud, peaks analüüsiks alles jääma kolm rikkumata töödeldud rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi. Kui suure kontsentratsiooniga töödeldavates rühmades esineb selge mürgisus, oleks analüüsiks eelistatavalt vaja vähemalt kolme eri kontsentratsioonidega töödeldavat rühma, milles on kolm rikkumata paralleelproovi (vastavalt OECD katsejuhendites esitatud maksimaalse talutava kontsentratsiooni põhimõttele (34)). Lisaks suremusele võib selge mürgisuse tunnuseks olla ka teatav käitumine (nt pinnal hõljumine, nõu põhjas lebamine, ümberpööratud asendis või ebakorrapärane ujumine), morfoloogiline kahjustus (nt veritsev haavand, kõhuturse) või normaalse toitumise pärsitus, mis ilmneb kvalitatiivses võrdluses kontrollrühma loomadega.

*Lahusti kontrollrühm*

63. Katse lõpetamisel tuleb hinnata lahusti (kui seda kasutatakse) võimalikku mõju. Seda tehakse lahusti kontrollrühma ja lahendusvee kontrollrühma statistilise võrdlemisega. Kõnealuses analüüsis vaadeldavad kõige olulisemad näitajad on seotud kasvuga (kehamass ja pikkus), kuna neid võib mõjutada üldine mürgisus. Kui nende näitajate puhul tuvastatakse lahendusvee kontrollrühma ja lahusti kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi, tuleb parimatest erialateadmistest lähtudes hinnata, kas see ohustab katse nõuetekohasust. Kui kahe kontrollrühma näitajad erinevad, tuleks kemikaaliga kokku puutunud rühmi võrrelda lahusti kontrollrühmaga, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust lahendusvee kontrollrühmaga. Kui kahe kontrollrühma vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei ole, soovita-takse võrrelda uuritava kemikaaliga kokku puutunud rühmi mõlema kontrollrühma (lahusti ja lahendusvesi) koondatud näitajatega, välja arvatud juhul, kui on teada, et eelistada tuleb võrdlust ainult lahendusvee või ainult lahusti kontrollrühmaga.

**▼M8****Katseprotokoll**

64. Katseprotokoll peaks sisaldama järgmist teavet.

*Uuritav kemikaal:*

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;
- Ühest koostisosast koosnev aine –
  - füüsiline välimus, lahustuvus vees ja muud asjakohased andmed füüsikalis-keemiliste omaduste kohta;
  - kemikaali identimisandmed, näiteks IUPACi või CASi nimetus, CASi number, SMILESi või InChI kood, struktuurivalem, puhtus, võimaluse ja vajaduse korral lisandite keemiline määratlus jne, sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus;
- Mitmest koostisosast koosnev aine, tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal või segu:
  - võimalikult täpne omaduste kirjeldus lähtuvalt koostisosade keemilisest määratlusest (vt eespool), kvantitatiivsest sisaldusest ja asjakohaseid füüsikalis-keemilisi omadusi käsitlevatest andmetest.

*Katsealune liik:*

- teaduslik nimetus, liin (kui on), päritolu ning viljastatud munade kogumise ja järgneva käitlemise meetod;
- skolioosi esinemissagedus kasutatud kasvandusloomade varasemates kontrollrühmades.

*Katsetingimused:*

- valgusrežiim(id);
- katseplaan (nt nõude suurus, materjal ja veesisaldus, katsenõude ja paralleelnõude arv, katsealuste organismide arv paralleelnõu kohta);
- põhilahuste valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (lahusti kasutamise korral tuleks esitada selle nimetus ja kontsentratsioon);
- uuritava kemikaali annustamismeetod (nt pump, lahjendussüsteem);
- meetodiga saavutatav tuvastamise tõhusus ja uuritavad nimikontsentratsioonid, määramispiir, katsenõudes mõõdetud väärtuste keskmised ja standardhälbed ja nende arvutamise meetod ning tõendid selle kohta, et mõõtmistulemused kajastavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni tõelises lahuses;
- lahjendusvee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, jääk-kloori sisaldus (kui on mõõdetud), joodi üldsisaldus, orgaanilise süsiniku üldsisaldus (kui on mõõdetud), hõljuvaine sisaldus (kui on mõõdetud), katselahuse soolsus (kui on mõõdetud) ja kõik muud mõõdetud näitajad;
- uuritavad nimikontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed;
- vee kvaliteet katsenõudes: pH, temperatuur (iga päev) ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;

**▼ M8**

- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt sööda liik, päritolu, lisatud kogus ja söötmissagedus).

*Tulemused:*

- tõendid selle kohta, et nõuetekohasuse kriteeriumid on kontrollrühmades täidetud;
  - järgmised andmed kontrollrühma (ja lahusti kasutamise korral lahusti kontrollrühma) ja töödeldud rühmade kohta: suremus ja täheldatud kõrvalekalded, NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg, kilpnäärme histoloogia (ainult kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (ainult noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (ainult noorkonnade proovis), sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (ainult noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (ainult noorkonnade proovis, kui on mõõdetud);
  - statistilise analüüsi ja andmetöötluse meetod (kasutatud statistiline test või mudel);
  - täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud näitaja puhul;
  - vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) iga hinnatud näitaja puhul (tasemel  $\alpha = 0,05$ ); vajaduse korral EC<sub>x</sub> iga hinnatud näitaja puhul koos usaldusvahemikuga (nt usaldusnivool 95 %) ja selle arvutamiseks kasutatud lähendatud mudeli graafik, kontsentratsiooni-vastuse kõvera tõus, regressioonimudeli võrrand ning mudeli hinnangulised parameetrid ja nende standardviga;
  - kõik kõrvalekalded katsemeetodist ja nõuetekohasuse kriteeriumidest ning nende võimalik mõju katse tulemustele.
65. Näitajate mõõtmistulemuste kohta tuleb esitada keskvaartused ja nende standardhälbed (võimaluse korral nii paralleelrühmade kui ka kontsentratsioonide lõikes).
66. Kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg tuleks arvutada paralleelnõude mediaanväärtuste keskvaartusena ja esitada koos standardhälbega. Sarnaselt tuleks töödeldud rühmade puhul arvutada töödeldud rühma mediaanväärtus, mis esitatakse paralleelnõude mediaanväärtuste keskvaartusena koos standardhälbega.

**KIRJANDUS**

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013), *Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report*.
- (2) OECD (2012a), „Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 150, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (3) Nieuwkoop, P.D. ja Faber, J. (1994), *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas, W. ja Lutz, I. (2006), „Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters“, *Journal of Chromatography*, A 1 130, lk 16–27.

## ▼M8

- (5) Chang, C., Witschi, E. (1956), „Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*“, *Journal of the Royal Society of Medicine*, nr 93, lk 140–144.
- (6) Gallien, L. (1953), „Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage“, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, nr 237, lk 1 565.
- (7) Villalpando, I. ja Merchant-Larios, H. (1990), „Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles“, *International Journal of Developmental Biology*, nr 34, lk 281–285.
- (8) Miyata, S., Koike, S. ja Kubo, T. (1999), „Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*“, *Zoological Science*, nr 16, lk 335–340.
- (9) Mikamo, K. ja Witschi, E. (1963), „Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes“, *Genetics*, nr 48, lk 1 411.
- (10) Olmstead, A.W., Kosian, P.A., Korte, J.J., Holcombe, G.W., Woodis, K. ja Degitz, S.J. (2009)a, „Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor“, *Aquatic Toxicology*, nr 91, lk 143–150.
- (11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja Ito, M. (2008), „A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, nr 105, lk 2 469–2 474.
- (12) Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009)b, „Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*“, *General and Comparative Endocrinology*, nr 160, lk 117–123.
- (13) Tobias, M.L., Tomasson, J. ja Kelley, D.B. (1998), „Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*“, *Journal of Neurobiology*, nr 37, lk 441–448.
- (14) Qin, Z.F., Qin, X.F., Yang, L., Li, H.T., Zhao, X.R. ja Xu, X.B. (2007), „Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*“, *Aquatic Toxicology*, nr 84, lk 321–327.
- (15) Porter, K.L., Olmstead, A.W., Kumsher, D.M., Dennis, W.E., Sprando, R.L., Holcombe, G.W., Korte, J.J., Lindberg-Livingston, A. ja Degitz, S.J. (2011), „Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure“, *Aquatic Toxicology*, nr 103, lk 159–169.
- (16) ASTM (2002), „Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians“, ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine“.
- (18) Käesoleva lisa peatükk C.29 „Kiire biolagundatavus – CO<sub>2</sub> suletud nõudes (vabaruumi katse)“.
- (19) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. ja Hammermeister, D.E. (1999), „Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays“, *Chemosphere* nr 39, lk 539–551.



## ▼ M8

- (20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., McLachlan, M.S. (2012), „A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests“, *Chemosphere*, nr 86(6), lk 593–599.
- (21) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 23. Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (22) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. ja Pickford, D.B. (2006), „Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review“ (ülevaade), *Aquatic Toxicology*, nr 76, lk 69–92.
- (23) ASTM (2004), „Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX)“, ASTM E1439-98, Philadelphia, PA, USA.
- (24) Read, B.T. (2005), *Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis**, Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Ühendkuningriik, 84 lk.
- (25) Käesoleva lisa peatükk C.38 „Kahepaiksete metamorfoosi katse“.
- (26) Käesoleva lisa peatükk C.48 „Lühiajaline kalade paljunemise katse“.
- (27) Käesoleva lisa peatükk C.41 „Kalade sugulise arengu katse“.
- (28) Käesoleva lisa peatükk C.49 „Ägeda mürgisuse katse kalaembrüotega“.
- (29) OECD (2007), „Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 82, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (30) Grim, K.C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D.C. ja Tietge, J. (2009), „Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances“, *Toxicological Pathology*, nr 37, lk 415–424.
- (31) Luna, L.G. ja Coady, K.(2014), „Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry“, *Analytical and Bioanalytical Techniques*, nr 5(3), lk 194.
- (32) OECD (2015), „Guidance on histopathology techniques and evaluation“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 228, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (33) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, *Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment*, nr 54, Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon, Pariis.
- (34) Hutchinson, T.H., Bögi, C., Winter, M.J. ja Owens, J.W. (2009), „Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology“, *Aquatic Toxicology*, nr 91(3), lk 197–202.

▼ **M8***1. liide***MÕISTED**

**Lõppnäitaja:** näitaja, mis iseloomustab mõju populatsiooni tasandil.

**Kemikaal:** aine või segu.

**ELISA:** ensüümimmunosorptsioonanalüüs.

**ECx:** (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel on katseorganismidele avalduva mõju ulatus x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Näiteks EC50 on kontsentratsioon, mille puhul kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi vältel avaldub kemikaali mõju katses uuritavale näitajale 50 protsendil kemikaaliga kokku puutuvast populatsioonist.

**dpf:** päeva pärast viljastamist.

**Läbivoolukatse:** katse, mille puhul katselahused voolavad kokkupuuteperioodi vältel pidevalt läbi katsesüsteemi.

**HAS-telg:** hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg.

**IUPAC:** Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liit (International Union of Pure and Applied Chemistry).

**Vähim täheldatud toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC):** uuritava kemikaali väikseim uuritav kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse kemikaali statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) mõju võrdluses kontrollprooviga. Kemikaal peaks kõigi LOEC-st suuremate kontsentratsioonide juures avaldama vähemalt sama tugevat kahjulikku mõju kui LOEC juures. Kui nimetatud kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleks lisada ammendav selgitus, kuidas LOEC (ja sellest lähtuvalt ka NOEC) on valitud. Sellekohased juhised on esitatud 7. liites.

**Letaalne mediaankontsentratsioon (LC50):** uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures kemikaal on katse vältel hinnanguliselt letaalne 50 %-le katseorganismidest.

**Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC):** uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata kindlaksmääratud kokkupuuteperioodi jooksul kontrolliga võrreldes statistiliselt olulist ( $p < 0,05$ ) toimet ja mis on LOEC-st vahetult madalam.

**SMILES:** lihtsustatud molekulaarse sisendrea sisestamissüsteem (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

**Uuritav kemikaal:** iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

**UVCB:** tundmatu või muutuva koostisega aine, kompleksne reaktsioonisaadus või bioloogilist päritolu materjal.

**VTG:** vitellogeniin on fosfolipoglükoproteiin, mis on munarebu valkude eelkäija ja mida tavaliselt leidub kõikide ovipaarsete liikide seksuaalselt aktiivsetes emasloomades.

▼ **M8**

## Liide 2

## MÕNED NÕUETEKOHASE LAHJENDUSVEE KEEMILISED OMADUSED

Koostisosa	Kontsentratsiooni piirnorm
Tahked osakesed	5 mg/l
Orgaanilise süsiniku üldsisaldus	2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	1 µg/l
Jääk-kloor	10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bife- nüülide summaarne üldsisaldus	50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	25 ng/l
Alumiinium	1 µg/l
Arseen	1 µg/l
Kroom	1 µg/l
Koobalt	1 µg/l
Vask	1 µg/l
Raud	1 µg/l
Plii	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Tsink	1 µg/l
Kaadmium	100 ng/l
Elavhõbe	100 ng/l
Hõbe	100 ng/l

▼ **M8**

## 3. liide

## LAGDA KATSETINGIMUSED

1. Katseliik	<i>Xenopus laevis</i>
2. Katse tüüp	Pideva läbivooluga katse
3. Vee temperatuur	Nimitemperatuur on 21 °C. Keskmise temperatuur kogu katse vältel $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatuuride erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada $1,0^\circ\text{C}$ ).
4. Valgustuse kvaliteet	Luminofoorlambid (laia spektriga), valgustihedus vee pinnal 600–2 000 lx ( $\text{lm}/\text{m}^2$ )
5. Valgusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust
6. Uuritava lahuse ruumala ja katsenõu	4–10 l (vee sügavus vähemalt 10–15 cm) Klaasist või roostevabast terasest nõu
7. Uuritavate lahuste uuendamine kogu ruumala ulatuses	Konstantne, nii et säiliks nii bioloogilised tingimused kui ka kemikaaliga kokkupuude (nt lahuse uuendamine kogu ruumala ulatuses viis korda päevas).
8. Katseorganismide vanus katse alguses	Nieuwkoop'i ja Faberi (NF) järgi 8.–10. staadium
9. Organismide arv paralleelnõu kohta	Kokkupuute alguses 20 looma (embrüot) paralleelnõu kohta ja alates NF'i järgi 66. staadiumist kuni kokkupuute lõpetamiseni 10 looma (noorkonna) paralleelnõu kohta
10. Töödeldavate rühmade arv	Vähemalt neli uuritava kemikaaliga töödeldavat rühma ja vajalikud kontrollrühmad
11. Paralleelnõude arv töödeldavate rühma kohta	Neli paralleelnõud uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja kaheksa paralleelnõud kontrollrühma kohta
12. Organismide arv uuritava kontsentratsiooni kohta	Vähemalt 80 looma uuritava kemikaali ühe kontsentratsiooniga töödeldava rühma kohta ja vähemalt 160 paralleelset looma kontrollrühma kohta
13. Lahjendusvesi	<i>X. laevis</i> 'e normaalset kasvu ja arengut võimaldav vesi (nt allikavesi või aktiivsõega filtreeritud kraanivesi)
14. Aereerimine	Ei ole nõutav, kuid nõude aereerimine võib osutuda vajalikuks juhul, kui lahustunud hapniku sisaldus langeb alla soovitatavat piir-taset ja uuritava lahuse vooluhulka ei saa enam suurendada.
15. Lahustunud hapniku sisaldus uuritavas lahuses	Lahustunud hapnik: $\geq 40\%$ küllastuskontsentratsioonist õhus või $\geq 3,5\text{ mg/l}$

▼ **M8**

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 16. Uuritava lahuse pH                | 6,5–8,5 (erinevus paralleelproovide ja töödeldavate rühmade vahel ei tohiks ületada 0,5)   |
| 17. Katselahuse karedus ja leelisus   | 10–250 mg CaCO <sub>3</sub> /l   |
| 18. Söötmissrežiim                    | (Vt 4. liide)  |
| 19. Kokkupuuteaeg                     | Alates NFi järgi 8.–10. staadiumist kümnenda nädalani pärast vee ja/või lahusti kontrollrühmas NFi järgi 62. staadiumi saabumise mediaanaega (maksimaalselt 17 nädalat)  |
| 20. Bioloogilised näitajad            | Suremus (ja välised kõrvalekalded), NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg (kulleste proovis), kilpnäärme histoloogia (kulleste proovis), kasv (kehamass ja pikkus), maksa somaatiline indeks (noorkonnade proovis), geneetiline/fenotüübiline sooline jaotumine (noorkonnade proovis), sugunäärmete, sugujuhade, neerude ja maksa histopatoloogilise analüüsi tulemused (noorkonnade proovis) ja plasma VTG-sisaldus (noorkonnade proovis, valikuline)   |
| 21. Katse nõuetekohasuse kriteeriumid | Lahustunud hapniku sisaldus peaks olema > 40 % küllastuskontsentratsioonist õhus; keskmine veetemperatuur peaks olema vahemikus 21 ± 1 °C ning temperatuuride erinevus paralleelproovide ja eri kontsentratsioonidega töödeldavate rühmade vahel peaks olema < 1,0°C; uuritava lahuse pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5; suremus kontrollrühma igas paralleelnõus peaks olema ≤ 20 % ja NFi järgi 62. staadiumisse jõudmise keskmine aeg kontrollrühmas peaks olema ≤ 45 päeva; katseorganismide keskmine mass NFi järgi 62. staadiumisse jõudmisel ja katse lõpetamisel peaks olema kontrollrühmades ja lahusti kontrollrühmades (kui neid kasutatakse) vastavalt 1,0 ± 0,2 g ja 11,5 ± 3 g; tuleks esitada tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 20 % mõõdetud keskväärtusest. |

## ▼M8

## 4. liide

## SÖÖTMISREŽIIM

Kuigi käesoleva söötmissrežiimi kasutamine on soovitatav, on lubatud ka muud variandid tingimusel, et katseorganismid kasvavad ja arenevad piisava kiirusega.

**Kulleste söötmine***Kulleste sööda ettevalmistamine*

A. Forelli noorkalade sööt ja vetikad/TetraFin® (või samaväärne sööt) mahuvahekorras 1:1

- Forelli noorkalade sööt: 50 g forelli noorkalade sööta (väikesed graanulid või pulber) segatakse blenderis suurel kiirusel 20 sekundi vältel 300 ml sobiva filtreeritud veega.
- Vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu: 12 g spirulina vetika tablette segatakse blenderis suurel kiirusel 40 sekundi vältel 500 ml filtreeritud veega, 12 g Tetrafin®-i (või samaväärset sööta) segatakse 500 ml filtreeritud veega ning seejärel segud ühendatakse, et saada 1 l söödasegu, mis sisaldab 12 g/l spirulina vetikaid ja 12 g/l Tetrafin®-i (või samaväärset sööta).
- Forelli noorkalade sööda segu ja vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu segatakse kokku võrdses mahuvahekorras.

B. Soolavähivastsed:

15 ml soolavähimarjal lastakse kooruda 1 l soolvees (selle valmistamiseks lisatakse 1 l deioniseeritud veele 20 ml NaCl). Pärast 24 tundi toatemperatuuril pideva valguse käes aereerimist korjatakse soolavähivastsed. Aereerimine peatatakse 30 minutiks, et soolavähivastsed saaksid põhja sadestuda. Nõu pinnal ujuvad tsüstid valatakse ära ja kõrvaldatakse ning soolavähivastsses filtreeritakse sobivate filtritega ning neile lisatakse 30 ml filtreeritud vett.

*Söötmissrežiim*

Tabelis 1 esitatakse ülevaade kulleste kokkupuuteperioodil kasutatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta esmaspäevast reedeni kolm korda päevas ja nädalavahetustel üks kord päevas.

Tabel 1.

X. laevis'e kulleste söötmissrežiim läbivoolusüsteemis.

Aeg (*) (pärast viljastamist)	Forelli noorkalade sööt: vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu		Soolavähivastsed	
	Tööpäeval (kolm korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)	Tööpäeval (kaks korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)
4.–14. päev (0–1. nädal)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. päev) 1 ml (alates 16. päevast)	0,5 ml (8.–15. päev) 1 ml (alates 16. päevast)
2. nädal	0,67 ml	2,4 ml		
3. nädal	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nädal	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. nädal	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

## ▼M8

Aeg (*) (pärast viljastamist)	Forelli noorkalade sööt: vetikate/TetraFin®-i (või samaväärse sööda) segu		Soolavähivastsed	
	Tööpäeval (kolm korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)	Tööpäeval (kaks korda päevas)	Nädalavahetusel (üks kord päevas)
6. nädal	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8.–10. nädal	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(\*) Nullpäev on hCG süstimise päev.

#### Sööda muutmine üleminekul kullest noorkonna staadiumisse

Pärast kulleste moonet hakatakse neid toitma noorkonnadele ette nähtud sööda-seguga, mida on kirjeldatud allpool. Üleminekuperioodil tuleks kulleste sööda-segu kogust järk-järgult vähendada ja noorkonnade sööda kogust suurendada. Selleks võib kullsesööda kogust proportsionaalselt vähendada ja noorkonna-sööda kogust proportsionaalselt suurendada, võttes aluseks viieliikmelised kulle-serühmad vastavalt sellele, kuidas nad läbivad NFi järgi 62. staadiumi ja lähe-nevad NFi järgi 66. staadiumis moonde lõpule.

#### Noorkonnade söötmine

##### Noorkonnade sööt

Kui moone on lõppenud (66. staadium) tuleks söötmissrežiimis täielikult üle minna 3/32-tollisele kvaliteetsele uppuvale konnasöödale (nt Xenopus Express™, FL, Ameerika Ühendriigid, või samaväärne sööt).

##### Graanulite peenestamine kullese noorkonnaks arenemise etapil

Uppuva konnasööda graanuleid jahvatatakse põgusalt kohviveskis, blenderis või peenestatakse uhmis, et vähendada nende suurust ligikaudu 1/3 võrra. Liiga pikalt töötlemine muudaks graanulid pulbriks ja seda ei soovitata.

##### Söötmissrežiim

**Tabelis 2** esitatakse ülevaade noorkonna ja täiskasvanud konna staadiumis kasu-tatava sööda liigi ja koguse kohta. Loomi tuleks sööta kord päevas. Oluline on märkida, et moondeperioodil jätkatakse loomade söötmist soolavähivastsetega seni, kuni > 95 % loomadest on moonde läbinud.

Loomi ei tohiks sööta katse lõpetamise päeval, et sööt ei moonutaks kehamassi mõõtmise tulemusi.

Tabel 2.

**X. laevis**'e noorkonnade söötmissrežiim läbivoolusüsteemis. Tuleb arvestada, et moonde-eelses staadiumis loomad (k.a need, kelle moone kemikaaliga töötlemise tõttu hilineb) ei suuda süüa peenestamata graanuleid

Aeg (*) (nädalat pärast moonde mediaanpäeva)	Peenestatud graanulid (mg noorkonna kohta)	Terved graanulid (mg noorkonna kohta)
Vastavalt moonde läbinud loomade arvule	25	0
0–1. nädal	25	28

**▼M8**

Aeg (*) (nädalat pärast moonde mediaanpäeva)	Peenestatud graanulid (mg noorkonna kohta)	Terved graanulid (mg noorkonna kohta)
2.–3. nädal	0	110
4.–5. nädal	0	165
6.–9. nädal	0	220

(\*) Nullnädala esimene päev on kontrollrühma loomade moonde mediaanpäev.



▼ **M8**

## 5. liide

## GENEETILISE SOO MÄÄRAMINE

*Xenopus laevis*'e puhul kasutatav geneetilise soo määramise meetod põhineb Yoshimoto *et al.* (2008) esitatud kirjeldusel. Genotüübi määramise meetodika üksikasju saab vajaduse korral lugeda viidatud publikatsioonist. Kasutada võib ka muid sobivaks tunnustatud meetodeid (nt kõrge läbilaskevõimega qPCR).

**X. laevis**'e praimerid

*DM-W marker*

*Otsepraimer:* 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

*Pöördpraimer:* 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

*Positiivne kontroll*

*Otsepraimer:* 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

*Pöördpraimer:* 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

**DNA puhastamine**

DNA puhastamiseks lihas- või nahakoest kasutatakse näiteks verele ja kudede le ette nähtud Qiagen DNeasy komplekti (kat nr 69 506) või muud sarnast toodet vastavalt selle kasutusjuhendile. DNA voolutamisel segamiskolonnist võib kasutada vähem puhvrit, et saada suurema kontsentratsiooniga proove, kui seda peetakse PCRi jaoks vajalikuks. Pange tähele, et DNA on küllaltki püsiv ja seetõttu tuleks rakendada meetmeid, et vältida ristsaastumist, mis võib põhjustada isaste ekslikku emaseks pidamist või vastupidi.

**PCR**

*Tabelis 1* on esitatud ülevaade analüüsimetoodikast, milles kasutatakse Sigma toodetud ensüümi JumpStart™ Taq.

*Tabel 1.*

**Sigma toodetud ensüümil JumpStart™ Taq põhinev analüüsimetoodika**

Põhisegu	1x (µl)	[Lõplik]
NFW ( <sup>1261</sup> )	11	—
10x puhver	2,0	—
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-d (igaüks 10 mM)	0,4	200 µM
Primeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördprimeri marker (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
Pöördprimeri kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 ühikut/µl
DNA matriits	1,0	~200 pg/µl

(\*) Nukleaasivaba vesi

Märkus. Põhisegu tuleks valmistada varuga, et kompenseerida pipeti kasutamisel tekkivaid kadusid (näide: 24 reaktsiooni jaoks 25-kordne kogus).

**▼ M8***Reaktsioon:*

Põhisegu	19,0 µl
Matriits	1,0 µl
Kokku	20,0 µl

*Termotsükleri programm:*

1. etapp	94°C	1 min
2. etapp	94°C	30 s
3. etapp	60°C	30 s
4. etapp	72°C	1 min
5. etapp	Tagasi 2. etappi.	35 tsükli
6. etapp	72°C	1 min
7. etapp	4°C	hoida

Polümeraasi ahelreaktsiooni saadustega võib kohe teha analüüsi geelis või hoida neid 4°C juures.

**Elektrofoores agarooisgeeliga (3 %) (analüüsimetoodika)***50X TAE*

Tris	24,2 g
Jää-äädikhape	5,71 ml
Na <sub>2</sub> (EDTA)·2H <sub>2</sub> O	3,72 g

Lisada vett mahuni 100 ml

*1X TAE*

H <sub>2</sub> O	392 ml
50X TAE	8 ml

*3: 1 agaroois*

3 osa NuSieve™ GTG™ agarooisi

1 osa madala elektroendoosmoosiga Fisheri agarooisi

*Meetod*

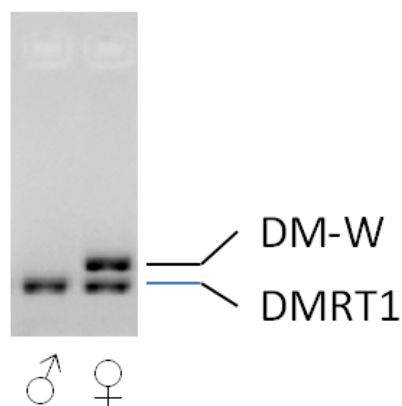
1. Valmistada 3 % geel: 43 ml 1X TAE puhvrile lisada 1,2 g agarooissegule. Keerutada segu suurte klompide eemaldamiseks.
2. Kuumatada agarooissegule mikrolaineahjus kuni täieliku lahustumiseni (vältida ülekeemist). Lasta veidi jahtuda.
3. Lisada 1,0 µL etiidiimbromiidi (10 mg/ml). Keerutada kolbi. Etiidiimbromiid on mutageenne aine ning seetõttu tuleks kõnealusel etapil tehnilise võimaluse korral kasutada muid kemikaale, et vältida ohtu töötajate tervisele<sup>(1)</sup>.
4. Valada geel kammi abil vormi. Lasta täielikult jahtuda.

<sup>(1)</sup> Vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu 29. aprilli 2004. aasta direktiivi 2004/37/EÜ (töötajate kaitse kohta tööl kantserogeenide ja mutageenidega kokkupuutest tulenevate ohtude eest (kuues üksikdirektiiv nõukogu direktiivi 89/391/EMÜ artikli 16 lõike 1 tähenduses) (ELT L 158, 30.4.2004, lk 50)) artikli 4 lõikele 1.

**▼M8**

5. Lisada geel seadmesse. Katta geel 1X TAE puhvriga.
6. Lisada igale 10 µl PCRi produktile 1 µl 6x laadimisvärvi.
7. Kanda proovid pipetiga süvenditesse.
8. Rakendada ~20 minuti jooksul ühtlast 160 V pinget.

**Joonisel 1** on kujutatud agarosgeelipilti, millel on näha isas- ja emasisendite iseloomulikud ribamustrid.



**Joonis 1.** Agarosgeelipilt, millel on näha isase (♂) isendi ribamuster (üks riba ~203 bp: DMRT1) ja emase (♀) isendi ribamuster (kaks riba ~259 bp: DM-W ja 203 bp: DMRT1).

**KIRJANDUS**

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. ja Ito, M. (2008), „A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, nr 105, lk 2469–2474.

▼ **M8**

## 6. liide

## VITELLOGENIINI MÕÕTMINE

Vitellogeniini (VTG) mõõdetakse ensüümimmunosorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodiga, mis töötati algselt välja lepamaimu VTG uurimiseks (Parks *et al.*, 1999). Praegu ei ole *X. laevis*'e analüüsi jaoks müügil antikehasid. Ent arvestades kõnealuse valgu kohta kättesaadavate andmete rohkust ja soodsate kaubanduslike antikehade valmistamise teenuste olemasolu, võib eeldada, et laboritel on lihtne välja töötada ELISA meetodika kõnealuse näitaja mõõtmiseks (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) kirjeldavad ka analüüsimeetodit, mida on kohandatud *X. tropicalis*'e jaoks, nagu allpool näidatud. Meetodi kohaselt kasutatakse *X. tropicalis*'e VTG vastast antikeha, kuid teadaolevalt toimib see ka *X. laevis*'e VTG puhul. Kasutada võib ka mittekonkurentseid ELISA meetodeid, mille puhul alumine avastamispiir võib olla madalam kui allpool kirjeldatud meetodiga.

**Materjalid ja reaktiivid**

- Eeladsorbeertud 1. antikeha seerum
- Segada üks osa *X. tropicalis*'e VTG 1. antikeha seerumit kahe osa kontrollisase plasmaga ja jätta u 75 minutiks toatemperatuurile, panna 30 minutiks jääle, tsentrifuugida 4°C juures ühe tunni jooksul kiirendusega > 20K × G, eemaldada supernatant, võtta alikvoot, hoida temperatuuril –20°C.
- 2. antikeha
- Kitse anti-küüliku IgG-HRP konjugaat (nt Bio-Rad 172-1019)
- VTG etalon
- Puhastatud *X. laevis*'e VTG kontsentratsiooniga 3,3 mg/ml
- TMB (3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin) (nt KPL 50-76-00 või Sigma T0440)
- Kitse normaalseerum (NGS)(nt Chemicon® S26 – 100 ml)
- 96 süvendiga ensüümimmuunanalüüsiks kasutatavad polüstüreenist mikroitiiterplaadid (nt ICN 76-381-04, Costar 53590, Fisher 07-200-35)
- 37°C hübridisatsiooniahhi (või kiiresti tasakaalustuv õhuinkubaator) plaatidele, vesivann katseklaasidele
- Muud tavapärased laboriseadmed, kemikaalid ja materjalid

**Koostised**

*Kattepuhver (50 mM karbonaatpuhver, pH 9,6):*

NaHCO <sub>3</sub>	1,26 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,68 g
vesi	428 ml

*10X fosfaatpuhvri lisandiga soolalahus (PBS) (0,1 M fosfaati, 1,5 M NaCl):*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,83 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	20,1 g
NaCl	71 g
vesi	810 ml

**▼ M8***Pesupuhver (PBST):*

10X PBS	100 ml
vesi	900 ml

1 M HCl abil reguleerida pH väärtusele 7,3, seejärel lisada 0,5 ml Tween-20

*Analüüsipuhver:*

Kitse normaalseerum (NGS)	3,75 ml
Pesupuhver	146,25 ml

**Proovide võtmine**

Vereproov võetakse hepariniseeritud mikrohematokriti katseklaasiga ja asetatakse jääle. Pärast 3 minuti vältel tsentrifugimist tehakse katseklaasile täke, see murtakse lahti ja plasma valatakse 0,6 ml mikrotsentrifuugjanumatesse, mis sisaldavad 0,13 ühikut lüofiliitunud aprotiniini. (Need anumad valmistatakse juba varem ette: neisse lisatakse vajalik kogus aprotiniini, mis külmutatakse ja lüofiliitakse vaakumkuivatis madalal kuumusel kuivamiseni.) Plasmat hoitakse kuni analüüsi tegemiseni temperatuuril  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Plaadi puhul kasutatav meetodika***Plaadi katmine*

Segada 20  $\mu\text{l}$  puhastatud VTGd 22 ml karbonaatpuhvriga (lõppkontsentratsioon 3  $\mu\text{g/ml}$ ). Lisada 200  $\mu\text{l}$  96 süvendiga plaadi igasse süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna  $37^{\circ}\text{C}$  juures 2 tunniks (või  $4^{\circ}\text{C}$  juures ööks) inkubeerima.

*Plaadi blokeerimine*

Blokeerimislahuse valmistamiseks lisatakse 38 ml karbonaatpuhvriks 2 ml kitse normaalseerumit (NGS). Eemaldada kattelahus ja raputada kuivaks. Lisada igasse süvendisse 350  $\mu\text{l}$  blokeerimislahust. Katta kleepuva kattekilega ja panna  $37^{\circ}\text{C}$  juures 2 tunniks (või  $4^{\circ}\text{C}$  juures ööks) inkubeerima.

*Standardlahuste valmistamine*

5,8  $\mu\text{l}$  puhastatud VTG etalonainet segatakse borosilikaadist ühekordses 12  $\times$  75 mm katseklaasis 1,5 ml analüüsipuhvriga. Nii saadakse kontsentratsioon 12 760 ng/ml. Seejärel tehakse lahjenduste seeria: selleks lisatakse iga kord 750  $\mu\text{l}$  eelmise kontsentratsiooniga lahust 750  $\mu\text{l}$  analüüsipuhvrile, et saada lõppkontsentratsioonid 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

*Proovide ettevalmistamine*

Alustuseks võtta plasmat, mis on analüüsipuhvril lahustatud vahekorras 1: 300 (1  $\mu\text{l}$  plasmat segatud 299  $\mu\text{l}$  analüüsipuhvriga) või 1: 30. Kui oletatakse, et VTG sisaldus on suur, võib kasutada täiendavaid või suuremaid lahjendusi. B/B<sub>0</sub> tuleks püüda hoida etalonainete vahemikus. Kui proovide eeldatav VTG sisaldus ei ole märkimisväärne, näiteks kontrollrühma (suguküpsemata) emaste ja isaste puhul, kasutatakse lahjendusvahekorda 1: 30. Sellest väiksema lahjendusega proovidel võivad ilmned ebasoovitavad maatrikseffektid.

Lisaks soovitatakse igal plaadil analüüsida positiivset kontrollproovi. Selleks kasutatakse kõrge indutseeritud VTG sisaldusega plasmat. Plasma lahjendatakse algselt kitse normaalseerumis, jagatakse alikvootideks ja säilitatakse  $-80^{\circ}\text{C}$  juures. Iga plaadi jaoks sulatatakse üks alikvoot, mida lahjendatakse täiendavalt analüüsipuhvril ja mida töödeldakse samuti nagu uuritavat proovi.

**▼M8***1. antikehaga inkubeerimine*

Esimese antikeha ettevalmistamiseks tehakse eeladsorbeeritud 1. antikeha seerumit analüüsipuhvris lahjendus vahekorras 1: 2000 (nt 8 µl seerumit 16 ml analüüsipuhvri kohta). Segada 300 µl 1. antikeha lahust katseklaasis 300 µl proovi/standardlahusega. Sarnaselt valmistatakse 300 µl analüüsipuhvri ja 300 µl antikehalahusega ette katseklaas B<sub>0</sub>. Lisaks tuleks ette valmistada mittespetsiifilise sideme (NSB) katseklaas, kuhu lisatakse üksnes 600 µl analüüsipuhvrit (ilma antikehadeta). Katseklaasid kaetakse Parafilm-kilega ja keerutatakse ettevaatlikult nende sisu segamiseks. Inkubeerida tund aega 37°C veevannis.

*Plaadid pesemine*

Plaadid tuleb pesta vahetult enne 1. antikehaga inkubeerimise lõppu. Selleks raputatakse plaat tühjaks ja patsutatakse kuivatuspaberiga kuivaks. Seejärel täidetakse süvendid 350 µl pesulahusega, valatakse tühjaks ja patsutatakse kuivaks. Selleks on hea kasutada mitme kanaliga pipetti või plaadipesurit. Pesemist korratakse veel kaks korda nii, et kokku tehakse kolm pesu.

*Plaadid täitmine*

Pärast plaadi pesemist eemaldada katseklaasid veevannist ja keerutada neid õrnalt. Lisada igast proovist, standardlahusest ning B<sub>0</sub>- ja NSB-klaasist 200 µl plaadi kahte süvendisse. Katta plaat kleepuva kattekilega ja panna 37°C juures üheks tunniks inkubeerima.

*2. antikehaga inkubeerimine*

Eelmise etapi inkubatsiooniosa lõpus tuleks plaati taas kolm korda pesta nagu enne. 2. antikehaga lahjenduse valmistamiseks segatakse 2,5 µl 2. antikeha seerumit 50 ml analüüsipuhvriga. Lisada igasse süvendisse 200 µl 2. antikeha lahjendust, katta kinni, nagu eespool kirjeldatud, ja inkubeerida 37°C juures üks tund.

*Substraadi lisamine*

Pärast 2. antikehaga inkubeerimist tuleb plaati kolm korda pesta, nagu eespool kirjeldatud. Seejärel lisada igasse süvendisse 100 µl TMB substraati. Lasta reaktsioonil 10 minutit toimuda, eelistatavalt nii, et plaat ei ole ereda valguse käes. Reaktsiooni peatamiseks lisada 100 µl 1 M fosforhapet. Seepeale muutub vedeliku värv sinisest erekollaseks. Mõõta plaadilugeriga neelduvus lainepikkusel 450 nm.

*Suhtarvu B/B<sub>0</sub> arvutamine*

Kõikidest mõõtmistulemustest lahutatakse NSB keskväärts. Iga proovi ja standardlahuse B/B<sub>0</sub> arvutamiseks jagatakse neelduvuse väärtus (B) proovi keskmise neelduvusega B<sub>0</sub>.

*Standardkõvera loomine ja tundmatute koguste kindlakstegemine*

Standardkõvera luuakse arvutitarkvaraga (nt Slidewrite™ või Sigma Plot®), mis ekstrapoleerib standardlahuste B/B<sub>0</sub> väärtusi kasutades proovi B/B<sub>0</sub> põhjal uuritava valguse koguse. Tavaliselt märgitakse logaritmilisel skaalal esitatud kogus graafikul sigmoidikuulise kõverana. Ent kitsa standardlahuste vahemiku kasutamise korral võib see olla ka lineaarne. Proovi koguseid korrigeeritakse lahjendusteguri arvessevõtmiseks ning tulemused esitatakse VTG sisaldusena milligrammides plasma milliliitri kohta.

*Alumise avastamispiiri määramine*

Sageli, eriti normaalsete isaste puhul, ei ole selge, kuidas esitada väga väikeste väärtustega tulemusi. Sel juhul tuleks 95 % usalduspiiri kasutades otsustada, kas märkida väärtuse kohta protokollis null või mõni muu number. Kui proovi tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse (B<sub>0</sub>) usaldusvahemikku,

**▼M8**

tuleks tulemuseks märkida null. Alumine avastamispiir on kõige väiksem standardlahuse kontsentratsioon, mis erineb püsivalt nullkontsentratsiooniga standardlahusest ehk väärtus, mille puhul kaks usaldusvahemikku ei kattu. Prooviga saadud tulemuse korral, mis jääb alumise avastamispiiri usaldusvahemikku või on sellest suurem, märgitakse arvatud väärtus. Kui prooviga saadud tulemus jääb nullkontsentratsiooniga standardlahuse ja alumise avastamispiiri usaldusvahemiku vahele, tuleks vastava proovi tulemuseks märkida pool alumise avastamispiiri väärtusest.

**KIRJANDUS**

Olmstead, A.W., Korte, J.J., Woodis, K.K., Bennett, B.A., Ostazeski, S. ja Degitz, S.J. (2009), „Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*“, *General and Comparative Endocrinology*, nr 160, lk 117–123.

Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A. ja Sullivan, C.V. (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, nr 123, lk 113–125.

▼ **M8**

## 7. liide

## STATISTILINE ANALÜÜS

LAGDaga saadakse kolme liiki andmeid, mida tuleb statistiliselt analüüsida: 1) kvantitatiivsed pidevandmed, 2) arengu kiirust näitavad sündmuseni kulunud aja andmed (aeg NFi järgi 62. staadiumini) ning 3) järjestusandmed, mis esitatakse histopatoloogilise analüüsi põhjal raskusastme või arengustaadiumi kujul. Joonisel 1 on esitatud soovitatav otsustuskeem statistilise analüüsimeetodi leidmiseks. Lisaks on allpool esitatud mõned kommentaarid, mis võivad olla vajalikud LAGDaga kogutud mõõtmisandmete statistilise analüüsi tegemiseks. Analüüsimeetodite otsustuskeemi järgi tuleb suremuse, kasvu (kehamass ja pikkus) ja maksa somaatilise indeksi (LSI) mõõtmistulemusi analüüsida vastavalt harule „Muud lõppnäitajad“.

**Pidevandmed**

Pidevate näitajate andmete puhul tuleks kõigepealt kontrollida nende monotoonsust. Selleks tehakse andmetega dispersioonanalüüsi mudeli jaoks sobiv astakteisendus ning võrreldakse lineaar- ja ruutkontraste. Kui andmed on monotoonsed, tuleks paralleelproovide mediaanväärtuste suhtes rakendada sammuviisilise elimineerimisega Jonckheere-Terpstra trenditesti ilma edasiste analüüsideda. Teine variant, mida saab kasutada normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga andmete puhul, on sammuviisilise elimineerimisega Williamsi test. Kui andmed ei ole monotoonsed (ruutkontrast on oluline ja lineaarkontrast ei ole), tuleks neid analüüsida segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli abil. Seejärel tuleks hinnata andmete normaaljaotust (eelistatavalt Shapiro-Wilki või Anderson-Darlingi testiga) ja dispersiooni homogeensust (eelistatavalt Levene'i testiga). Mõlemad testid tehakse segamõjuga dispersioonanalüüsi mudeli jääkidega. Normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse formaalsete testide asemel võib kasutada ka eksperthinnangut, kuid formaalseid teste tuleb eelistada. Kui andmed on normaaljaotuse ja homogeense dispersiooniga, siis on segamõjuga dispersioonanalüüsi eeldused täidetud ja kontsentratsiooni oluline toime tehakse kindlaks Dunnetti testiga. Mittenormaaljaotuse või heterogeense dispersiooni korral Dunnetti testi eeldused ei kehti ning vaja on leida normaliseeriv ja dispersiooni ühtlustav teisendus. Kui selline teisendus leitakse, tehakse kontsentratsiooni oluline toime kindlaks Dunni testiga. Võimaluse korral tuleks eelistada ühepoolset testi kahepoolsele, aga seda, kumb neist on konkreetse näitaja puhul asjakohane, tuleks otsustada eksperdi hinnangu põhjal.

*Suremus*

Suremuse andmeid tuleks analüüsida kogu katset hõlmava ajavahemiku ulatuses ning need tuleks esitada konkreetsetes nõus surnud isendite protsendina. Ettenähtud aja jooksul moonet mitteläbinud kulleste, kulleste osaprooviks välja võetud kulleste, väljapraagitud noorkonnade ja katse läbiviija vea tagajärjel sumud loomade andmed tuleks analüüsist välja jätta ning mitte lisada neid protsendimäära arvutamise valemis nimetajasse. Enne mis tahes statistilist analüüsi tuleks suremuse protsendi andmetega teha arkussiinus-ruutjuurteisendus. Teine variant on kasutada astmelise elimineerimisega Cochran-Armitage'i testi, mida võidakse üledispersiooni korral täiendada Rao-Scotti kohandusega.

*Kehamass ja pikkus (kasvuandmed)*

Isaste ja emaste sootunnused ei ole moonde ajal eristatavad ja seetõttu tuleks kulleste osaproovis mõõdetud kasvuandmeid analüüsida soost sõltumatult. Seevastu noorkonnade kasvuandmeid tuleks analüüsida geneetiliste sugude lõikes. Kõnealuste näitajate puhul võib vajalik olla logaritmitteisendus, sest suurusandmetes esineb sageli logaritmilist normaaljaotust.



## ▼ M8

*Maksa somaatiline indeks (LSI)*

Maksa massi käsitlevate andmete normaliseerimiseks tuleks need esitada osakaaluna kehamassist (st LSI kujul) ja neid tuleks analüüsida eraldi geneetiliste sugude lõikes.

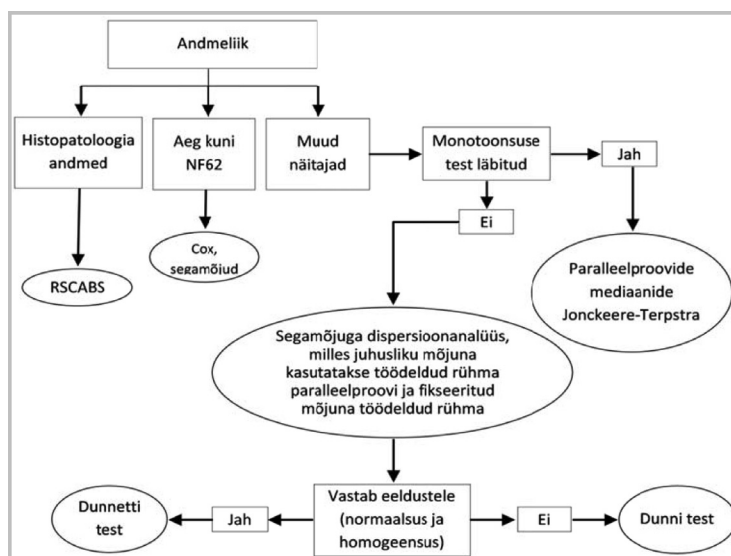
**NFi järgi 62. staadiumisse jõudmiseks kulunud aeg**

Moondeni kulunud aeg tuleks liigitada sündmuse toimumiseni kulunud aja andmete kategooriasse, kus surmajuhte ja 70 päeva jooksul NFi järgi 62. staadiumisse mittejõudnud isendite andmeid käsitatakse paremalt tsenseeritud andmetena (st tegelik väärtus on suurem kui 70 päeva, aga uuring lõppes enne, kui loomad jõudsid NFi järgi 62. staadiumisse). Katse lõpetamise päeva kindlaksmääramise aluseks tuleks võtta lahjendusveega kontrollrühmades NFi järgi 62. staadiumi (moonde) läbimiseni kulunud mediaanaeg. Moonde lõpetamiseni kulunud mediaanaeg tuleks kindlaks teha Kaplan-Meieri hinnangufunktsioonidega ajapiiri määramiseks. Kõnealust näitajat tuleks analüüsida segamõjudega proportsionaalseid ohte käsitleva Coxi mudeli abil, milles võetakse arvesse uuringu paralleelproovide struktuuri.

**Histopatoloogilised andmed (raskusastmed ja arengustaadiumid)**

Histopatoloogilised andmed esitatakse raskusastmete või arengustaadiumite kujul. Testis RSCABS (Rao-Scotti kohandusega Cochran-Armitage'i lõiktest) kasutatakse iga histopatoloogilise raskusastme suhtes Rao-Scotti kohandusega astmelise elimineerimise Cochran-Armitage'i trenditesti (Green *et al.*, 2014). Rao-Scotti kohandus võimaldab testis arvesse võtta katses rakendatud paralleelnõude kasutamise kava. Nn lõiktesti meetodikas on arvesse võetud bioloogilist eeldust, et kemikaali kontsentratsioonide suurenedes kasvab ka raskusaste, säilitades samal ajal subjektide individuaalsed skoorid ja tuues välja tuvastatud toimete tugevuse. Lisaks sellele, et RSCABSi meetodika võimaldab kindlaks teha, millised töödeldud rühmad erinevad statistiliselt kontrollrühmadest (st neis esinevad patoloogiad on raskekujulisemad kui kontrollrühmades), aitab see ka välja selgitada, millise raskusastme juures erinevus tekib, andes seeläbi analüüsi jaoks hädavajalikku taustteavet. Sugunäärmete ja sugujuhade arenguga seotud andmeid on vaja täiendavalt töödelda, kuna RSCABSi aluseks on eeldus, et toime tugevus kasvab koos annusega. Kõnealusel juhul avaldub toime tavalisest aeglasemas või kiiremas arengus. Seetõttu tuleks arenguga seotud andmeid esmalt analüüsida esitatud kujul, et tuvastada kiirenenud arengut, ning seejärel enne teist analüüsi manuaalselt ümber pöörata, et tuvastada arengu mahajäämusi.

Joonis 1

**LAGDaga kogutud andmete statistilise analüüsi otsustuskeem.**

▼ **M8**

**KIRJANDUS**

Green, J.W., Springer, T.A., Saulnier, A.N. ja Swintek, J. (2014), „Statistical analysis of histopathology endpoints“, *Environmental Toxicology and Chemistry*, nr 33, lk 1 108–1 116.

▼ **M8**

## 8. liide

## SKOLIOOSI JÄLGIMISE JA SELLE ESINEMISE VÄHENDAMISEGA SEOTUD KAALUTLUSED

Idiopaatiline skolioos, mis avaldub *Xenopus laevis*’e kullestel tavaliselt kõverdunud saba kujul, võib raskendada uuritavate populatsioonide morfoloogia ja käitumise vaatlemist. Nii katseorganismide kasvatamise ajal kui ka katse tingimustes tuleb püüda skolioosi esinemist vähendada või see välistada. Lõplikus katses ei tohiks mõõduka ja raske skolioosi levimus soovitatavalt ületada 10 %, kuna see tagab suurema kindluse, et katsega on võimalik tuvastada just keemikaalust tingitud toimet muidu tervete kulleste arengule.

Lõpliku katse ajal tehtavate igapäevaste vaatluste käigus tuleks registreerida nii avastatud skolioosijuhtude arv kui ka raskusaste. Väärarengu kirjelduses tuleks märkida selle asukoht (nt pärakuavast ees- või tagapool) ja kõverdumise suund (nt külmine või selja poolt kõhu poole). Raskusastmeid võib liigitada järgmiselt:

NR – ebaoluline: kõverdumist ei esine;

- 1) – kerge: väike külmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav üksnes puhkeolekus;
- 2) – mõõdukas: külmine kõverdumine pärakuavast tagapool; nähtav kogu aeg, aga ei takista liikumist;
- 3) – raske: külmine kõverdumine pärakuavast eespool VÕI liikumist takistav mis tahes kõverdumine VÕI mis tahes kõverdumine selja poolt kõhu poole.

USA Keskkonnakaitseameti juures tegutsev insektsiidide, fungitsiidide ja rodentitsiidide käsitlev teadusnõukogu (FIFRA SAP 2013) on läbi vaadanud *X. laevis*’ega (NF-i järgi 51. kuni 60. või kõrgemas staadiumis) tehtud viieteistkümne kahepaiksete moonde katse koondandmed skolioosi kohta ning on esitanud üldised soovitused selle kõrvalekalde levimuse vähendamiseks uuritavates populatsioonides. Need soovitused on asjakohased ka LAGDA puhul, kuigi see katse hõlmab pikemat arenguperioodi.

**Varasemad kudemisnäitajad**

Üldjuhul tuleks sigimispaarid moodustada kvaliteetsetest tervetest täiskasvanud isenditest. Skolioosiga järglasi andvate sigimispaaride kõrvaldamine võib aja jooksul selle esinemissagedust vähendada. Konkreetsemalt võib kasu olla sellest, kui kasutatakse vähem loodusest püütud sigimisloomi. LAGDA kokkupuuteperiood algab siis, kui embrüod on NF-i järgi 8.–10. arengustaadiumis, ning katse alguses ei ole praktiliselt võimalik kindlaks teha, kas konkreetsetel isenditel tekib skolioos. Seega tuleks lisaks skolioosi varasema esinemise kontrollimisele katsesse kaasatud loomade seas dokumenteerida ka kurnade haiguslood (sh skolioosi levimus nende kulleste seas, kellel lastakse areneda). Kasu võib olla ka sellest, kui jälgida uuringus kasutamata jäänud kurnaosa edasist arengut ja nende vaatluste tulemused teatavaks teha (FIFRA SAP 2013).

**Vee kvaliteet**

Oluline on tagada piisavalt hea vee kvaliteet nii labori kasvukeskkonnas kui ka katse ajal. Lisaks veeorganismidele mõjuva mürgisuse katsete jaoks tavapäraselt kontrollitavatele veekvaliteedi näitajatele võib olla kasulik jälgida ja korrigeerida ka võimalikke toiteainete puudujääke (nt C-vitamiini-, kaltsiumi- või fosforivaegus) või liigne seleeni- ja vasesisaldus, mille puhul on täheldatud skolioosi põhjustavat mitmesuguse tugevusega toimet laboris kasvatatud *Rana* ja *Xenopus*’e liikidele (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; andmed publikatsioonist FIFRA SAP 2013). Üldiselt saab vee kvaliteeti ja katsealuste liikide tervist parandada sobiva söötmissrežiimi valimise (vt 4. liide) ja nõu regulaarse puhastamisega.

**▼ M8****Söötmise**

Konkreetsed soovitusel LAGDA puhul edukaks osutunud söötmissrežiimi kohta on esitatud 4. liites. Soovitatavalt tuleks kasutatavat sööta kontrollida bioloogiliste mürgainete, herbitsiidide ja muude *X. laevis*'el või teistel veeloomadel skolioosi põhjustavate pestitsiidide suhtes (Schlenk ja Jenkins 2013). Näiteks on leitud seos mõnede koliinesteraasi inhibiitorite ja skolioosi vahel nii kaladel (Schultz *et al.* 1985) kui ka konnadel (Bacchetta *et al.* 2008).

**KIRJANDUS**

Bacchetta, R., Mantecca, P., Andrioletti, M., Vismara, C. ja Vailati, G. (2008), „Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos”, *Science of the Total Environment*, nr 392, lk 110–118.

Schultz, T.W., Dumont, J.N. ja Epler, R.G. (1985), The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide“, *Toxicology*, nr 36, lk 185–198.

Leibovitz, H.E., Culley, D.D. ja Geaghan, J.P. (1982), „Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels”, *Journal of the World Aquaculture Society*, nr 13, lk 322–328.

Marshall, G.A., Amborski, R.L. ja Culley, D.D. (1980), „Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae”, *Journal of the World Aquaculture Society*, nr 11, lk 445–453.

Martinez, I., Alvarez, R., Herraes, I. ja Herraes, P. (1992), „Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles”, *Anatomical Records*, nr 233(2), lk 314–320.

Schlenk, D. ja Jenkins, F. (2013), „Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance”, *US EPA FIFRA SAP Minutes*, nr 2013-03. 21.–23. mai 2013. Washington, DC.