



Sisukord

II Muud kui seadusandlikud aktid

MÄÄRUSED

- ★ Komisjoni määrus (EL) 2016/266, 7. detsember 2015, millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määrust (EÜ) nr 440/2008, millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ⁽¹⁾ 1

⁽¹⁾ EMPs kohaldatav tekst

II

(Muud kui seadusandlikud aktid)

MÄÄRUSED

KOMISJONI MÄÄRUS (EL) 2016/266,

7. detsember 2015,

millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määrust (EÜ) nr 440/2008, 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)

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrust (EÜ) nr 1907/2006, 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 ja 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, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 13 lõiget 2,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni määruses (EÜ) nr 440/2008 ⁽²⁾ on esitatud kemikaalide füüsikalise-keemiliste omaduste, toksilisuse ja ökotoksilisuse määramise katsemeetodid, mida kasutatakse määruse (EÜ) nr 1907/2006 kohaldamisel.
- (2) Määrust (EÜ) nr 440/2008 on vaja ajakohastada tehnika arengu arvessevõtmiseks ning vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivile 2010/63/EL ⁽³⁾ katseteks kasutatavate loomade arvu vähendamiseks ning et lisada sellesse uued ja ajakohastatud katsemeetodid, mille on hiljuti vastu võtnud Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (OECD). Käesoleva eelnõuga seoses on konsulteeritud sidusrühmadega.
- (3) Käesolevas kohandamismääruses on esitatud kaksikümmend katsemeetodit: üks uus meetod füüsikalise-keemilise omaduse määramiseks, üksteist uut ja kolm ajakohastatud meetodit ökotoksilisuse hindamiseks ning viis uut meetodit, millega hinnatakse kemikaalide säilivust ja käitumist keskkonnas.
- (4) Määrust (EÜ) nr 440/2008 tuleks seepärast vastavalt muuta.
- (5) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas määruse (EÜ) nr 1907/2006 artikli 133 kohaselt asutatud komitee arvamusega,

⁽¹⁾ ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.

⁽²⁾ 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) (ELT L 142, 31.5.2008, lk 1).

⁽³⁾ 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).

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 440/2008 lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse lisale.

Artikkel 2

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

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 7. detsember 2015

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

—

LISA

Määruse (EÜ) nr 440/2008 lisa muudetakse järgmiselt.

1) Lisa algusse A osa ette lisatakse järgmine märkus:

„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 määratluse, kvantitatiivse sisalduse ja asjakohaste omaduste kohta.”

2) Lisatakse peatükk A.24:

„A.24. JAOTUSKOEFIITSIENT (N-OKTANOOL/VEESI): KÕRGEFEKTIIVSE VEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) MEETOD

SISSEJUHATUS

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

1. Jaotuskoeffitsient (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 jaotuskoeffitsient 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) ⁽¹⁾ 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 isokraatilist HPLC töörežiimi.
5. P_{ow} väärtus sõltub keskkonnatingimustest, näiteks temperatuurist, pH-st, ioonset 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 kavandatav OECD juhend pH mõõtmisel põhineva meetodi kohta ioniseeritud ainete jaoks (6)), mida saaks kasutada alternatiivmeetodina. Ehkki kõnealune kavandatav 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).

⁽¹⁾ 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.

MEETODI PÕHIMÕTE

- Pöördfaasilise HPLC jaoks kasutatakse analüütilisi kolonne, mis on täidetud müügiloleva tahke täidisega, mis sisaldab ränidioksiidiga kovalentselt seotud pikki süsivesinikuaahelaid (nt C_8 , C_{18}).
- 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 võrrandiga:

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

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

- Uuritava aine jaotuskoeffitsiendi arvutamiseks süsteemis oktanool/vesi määratakse katseliselt mahtuvustegur k ning sisestatakse see siis järgmise võrrandisse:

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

kus

a ja b on lineaarse regressiooni kordajad.

Selle võrrandi lahendamiseks leitakse regressioonanalüüsi teel lineaarne seos süsteemis oktanool/vesi tähtsatava võrdlusainete jaotuskoeffitsiendi logaritmi ja nende võrdlusainete mahtuvusteguri logaritmi vahel.

- Pöördfaasilisel HPLC-l põhinev meetod võimaldab määrata jaotuskoeffitsiendi P_{ow} logaritmitud väärtusi 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 $\log P_{ow}$ väärtus määratakse keskkonnaohtlikkuse alusel klassifitseerimiseks või keskkonnaohu hindamiseks, tuleks katse teha pH väärtuste vahemikus, mis vastab looduskeskkonnas esinevatele pH väärtustele, 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 $\log P_{ow}$ väärtusele 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} väärtuse ja sellele vastava piigi protsentuaalse pindala põhjal (8). Arvutustes tuleks arvesse võtta kõiki piike, mille pindala on vähemalt 5 % piikide kogupindalast (9):

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

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

- Enne meetodi kasutamist peaks olema teada aine dissotsiatsioonikonstant, struktuurivalem ja lahustuvus liikuvast faasist. 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 jaotuskoefitsiendi $\log P_{ow}$ 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 mahtuvusteguri 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 uuritava 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 kasutatavad 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 arvutatud 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 jaotuskoefitsiente 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.

Tabel 1.

Soovitavad võrdlusained.

	CASi number	Võrdlusaine	$\log P_{ow}$	pK_a
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	Atseetaniliid	1,0	
5	100-51-6	Bensüülalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoksüfenool	1,3	$pK_a = 10,26$
7	122-59-8	Fenoksüaadikhape	1,4	$pK_a = 3,12$

	CASi number	Võrdlusaine	log P _{ow}	pK _a
8	108-95-2	Fenool	1,5	pK _a = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenool	1,5	pK _a = 3,96
10	100-47-0	Bensonitriil	1,6	
11	140-29-4	Fenüülatsetonitriil	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 _a = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobensoehape	1,8	pK _a = 3,47
16	106-47-8	4-kloroaniliin	1,8	pK _a = 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 _a = 4,19
20	106-44-5	p-kresool	1,9	pK _a = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kaneelhape	2,1	pK _a = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
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 _a = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenool	2,4	pK _a = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetüleen	2,4	
28	1912-24-9	Atrasiin	2,6	
29	93-89-0	Etüülbensoaat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-diklorobensonitriil	2,6	
31	535-80-8	3-klorobensoehape	2,7	pK _a = 3,82

	CASi number	Võrdlusaine	log P _{ow}	pK _a
32	108-88-3	Tolueen	2,7	
33	90-15-3	1-naftool	2,7	pK _a = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroaniliin	2,8	
35	108-90-7	Klorobenseen	2,8	
36	1746-13-0	Allüülfenüüleeter	2,9	
37	108-86-1	Bromobenseen	3,0	
38	100-41-4	Etüülbenseen	3,2	
39	119-61-9	Bensofenoone	3,2	
40	92-69-3	4-fenüülfenool	3,2	pK _a = 9,54
41	89-83-8	Tümoole	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklorobenseen	3,4	
43	122-39-4	Difenüülamiin	3,4	pK _a = 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 _a = 6
48	92-52-4	Bifenüül	4,0	
49	120-51-4	Bensüülbensoaat	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sec-butüülfenool	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklorobenseen	4,2	
52	143-07-7	Dodekaanhape	4,2	pK _a = 5,3
53	101-84-8	Difenüüleeter	4,2	
54	85-01-8	Fenantreen	4,5	
55	104-51-8	n-butüülbenseen	4,6	

	CASi number	Võrdlusaine	log P _{ow}	pK _a
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	

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 vedelikukromatograafi. Paljude keemiliste rühmade tuvastamiseks sobib UV-detektor, mis töötab lainepikkusel 210 nm, või murdumisnäitaja detektor. Polaarse rühmade esinemine liikumatus faasis võib HPLC-koloni efektiivsust oluliselt vähendada. Seepärast peaks polaarse rühmade sisaldus liikumatus faasis olema võimalikult väike (16). Võib kasutada müügiloolevaid 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 lahuse 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 polaarsust või koloni pikkust.
19. Uuritav aine ja võrdlusained peavad olema liikuv faasis piisaval määral lahustuvad, et võimaldada nende tuvastamist. Lisaaineid võib metanooli ja vee segu kasutada üksnes erandjuhul, kuna need muudavad koloni omadusi. Sellisel juhul tuleb kontrollida, et lisaaine ei mõjuta uuritava aine ja võrdlusainete retentsiooniga. Metanooli ja vee segu sobimatuse korral võib kasutada muid orgaanilise lahusti ja vee segusid, nt etanooli ja vee, atsetonitriili 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 kalibrimiseks kasutatavad ained liikuv faasis. Kui uuritava aine ja võrdlusainete lahustamiseks kasutatakse liikuva faasi lahusest erinevat lahustit, tuleks enne ainete süstimist kasutada lõplahjenduse tegemiseks liikuva faasi lahust.

Katsetingimused

22. Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui ± 1 °C.

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 jaotuskoefitsient saadakse arvutatud mahtuvusteguri interpoleerimisel kaliibrimisgraafiku abil. Väga väikeste ja väga suurte jaotuskoefitsiendi 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 jaotuskoefitsiendi 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;
 - uuritava aine keskmine retentsiooniaeg ja interpoleeritud $\log P_{ow}$ väärtus;
 - segu puhul elueerimisprofiili 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.
- (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 Inczedy J. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromat.* 3: 1669.
-

Liide

P_{ow} arvutamise meetodid

SISSEJUHATUS

1. Käesolevas liites tutvustatakse lühidalt P_{ow} arvutamist. Lisateave on kättesaadav käsiraamatutes (1, 2).
2. P_{ow} arvutatud väärtusi kasutatakse:
 - katsemeetodi valimiseks: log P_{ow} väärtuste vahemiku –2 kuni 4 puhul loksutamismeetod ja log P_{ow} väärtuste vahemiku 0–6 puhul HPLC-meetod;
 - HPLC kasutustingimuste (võrdlusained, metanooli ja vee suhe) valimiseks;
 - katseliselt saadud väärtuste usaldusvääruse 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_{ow} osaväärtused. Log P_{ow} saamiseks liidetakse alaosade log P_{ow} osaväärtused ja molekulisisesid 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_{ow} väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Veamäär sõltub kasutatud alaosade konstantide usaldusväärsest, oskusest võtta arvesse molekulisisesid vastasmõjusid (nt vesiniksidedmed) 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 aromaadne 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 aromaatsete ainete puhul. π väärtused on kättesaadavad paljude asendajate kohta (4, 5).

Rekkeri meetod

6. Rekkeri meetodi (8) kohaselt arvutatakse log P_{ow} väärtus järgmiselt:

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

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 regressioonanalüüsi (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:

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

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 heterotsükliid, antrakinoon, asobenseen) osaväärtused saab seejärel kombineerida Hanschi π 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 molekulisiseste 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).
- (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, π , Derived from Partition Coefficients J. *Amer. Chem. Soc.* 86: 5175.
 - (8) Rekker, R. F. The Hydrophobic Fragmental Constant. *Pharmacochemistry 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).”
- 3) Peatükk C.3 asendatakse järgmisega:

„C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBakterite KASVU PIDURDUMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 201 (2006, lisa parandatud 2011. aastal). On ilmnunud 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 asendusparameetritena 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 (keskmise kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmise 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).

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 oktanool/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. Piiramatu 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) arvatud 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 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 CO₂ 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.
 - Kultiveerimiseseade: soovitatav on kasutada kappi või kambrit, mis võimaldab hoida inkubatsioonitemperatuuri täpsusega ± 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 π) andurit, mis reageerib nii ülalt- kui ka altpoolt mõõdetasapinda mis tahes nurga all saabuvale otsesele ja peegeldunud valgusele, või poolkerakujulist (2 π) andurit, mis reageerib ülaltpoolt mõõdetasapinda 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 teisendada 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 kõik sobib 2. liites loetletud tüvede puhul.
18. Muu liigi organismide kasutamisel tuleb märkida asjaomane tüvi ja/või organismi päritolu. Tuleb tõendada, et valitud katsetetikate 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 puhverduvõime (pH tõusu kompenseerimise võime) on erinevad. Seepärast võivad katsetulemused sõltuda kasutatud söötmest, eriti kui uuritav kemikaal võib moodustada ioone.
20. Teatavatel juhtudel, näiteks kui uuritakse metalle ja kelaativaid 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:

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

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

Navicula pelliculosa: 10^4 rakku/ml;

Anabaena flos-aquae: 10^4 rakku/ml;

Synechococcus leopoliensis: $5 \times 10^4 - 10^5$ 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 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 ümberkülvamine.

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 kultiveerimis-seadmesse. Katse ajal on vaja hoida vetikaid suspensioonis ja soodustada CO₂ 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 soovitatatakse 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 CO₂ massiülekanne ümbritsevast õhust katselahusesse, näiteks loksutamiskiiruse suurendamise teel. Teine võimalus on vähendada CO₂ 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 $60\text{--}120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mõõdetuna sobiva anduri abil fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus $400\text{--}700 \text{ nm}$. 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 $40\text{--}60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (Luksides kalibritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valgustustiheduse vahemikule $60\text{--}120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vahemik $4\,440\text{--}8\,880$ luksi.) Valgustustihedus inkubatsioonipinnal ei tohi hälbida keskmisest valgustustihedusest rohkem kui $\pm 15 \%$.

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 fluorestsentsi 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 püsimist katse vältel.
37. Kui kontsentratsiooni muutus katse vältel on eeldatavalt alla 20 % nominaalväärtusest, võib piisata uuritava kemikaali sisalduse määramisest katse alguses ja lõpus ühel väiksel ja ühel suurel kontsentratsioonil ja eeldatavale EC_{50} -le lähedasel 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 inkubeeritakse vetikatega ja neid inkubeeritakse samades tingimustes. Kui on vaja määrata uuritava lahustunud kemikaali sisaldust, võib olla vaja eraldada söötmetest 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 geometriline keskmine või mõni uuritava kemikaali sisalduse vähenemist kirjeldav mudel (3, 7).
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 katsesöötmes 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 piirkontsentratsioonis. 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 vähemalt kuus. Kontroll- ja katserühmas mõõdetud muutujate analüüsil võib keskväärtsi 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 süstemaatilise veast. Kui on võimalik tuvastada viga katse läbiviimisel või vea esinemist võib pidada väga tõenäoliseks, tähistatakse asjaomane andmepunkt võõrväärtusena ja jäetakse järgnevat statistilisest analüüsist välja. (Näiteks 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 kasvukiirusega 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 erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse määratlus põhineb vetikate üldisel piiramatul eksponentsiaalsel kasvul kultuuris, kusjuures mürgisust hinnatakse kasvukiirusele avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri absoluutsest kasvu erikiirusest, kontsentratsiooni 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:

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

kus

μ_{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 algsaldust võib siiski kasutada juhul, kui biomassi mõõtmise seade (nt läbivoolutsütomeeter) võimaldab määrata inokulumini 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 minimeerida 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 arvatud 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:

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

kus

$\% I_r$ on keskmise kasvu erikiiruse pidurdumise määr protsentides,

μ_c on keskmise kasvu erikiiruse (μ) keskväärtaus kontrollrühmas ja

μ_T 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 uuritavat kemikaali sisaldava iga paralleelkultuuri puhul arvutada järgmiselt:

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

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 võõrväärtustena 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 lähenemisi, 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 eksperdihinnangu 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 analüüsimeetodid on ette nähtud binaarsete tunnuste (nt suremus või elulemus) analüüsimiseks ning neid tuleb kasvu- või biomassiandmete analüüsimiseks kohandada. Konkreetsete meetodid 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 väärtusi. Kui andmete suure hajuvuse tõttu on kõvera mittelineaarne lähendamine raske või võimatu, võib probleemi lahendamiseks kasutada regressioonanalüüsi puhul siiski rühmade keskvaartusi – selle praktilise lähenemisviisiga vähendatakse eeldatavate võõrväärtuste mõju. Sellise võimaluse kasutamise korral tuleks katseprotokollis lisada märkus, et tavapärasest analüüsimeetodist 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 usaldusväarsuse 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 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 (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 sammuviisilise 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 katsesöötmes 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 usaldusväarsuse 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 kirjeldada. Asjaomased juhised on esitatud allikates 2 ja 3.

KATSEPROTOKOLL

61. 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:

- 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 geomeetrilise 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;
- 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 katsemeetodist kõrvalekaldumise mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

- (1) Rahvusvaheline Standardorganisatsioon (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) Rahvusvaheline Standardorganisatsioon (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 Standardorganisatsioon (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) Slovacey, 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.
 - (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.
-

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_x – 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_rC” ja saagise puhul tähist „E_sC”.

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) – väiksem 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.

Kasvu erikiirus – uuritav muutuja, mis on määratletud kui jälgitava parameetri (käesoleva katsemeetodi puhul biomass) väärtuste naturaalogaritmide 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.

—

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

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	Kõverdunud krurvijad 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 ³ /rakk)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Raku kuivmass (mg/rakk)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Kasvukiirus ⁽³⁾ (ööpäevas)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0– 2,4

⁽¹⁾ Määratud elektroonilise osakeste loenduri abil.

⁽²⁾ Arvutatud mõõtmete alusel.

⁽³⁾ Kõige sagedamini täheldatav kasvukiirus OECD söötmes valgustihedusel umbes 70 µE m⁻² s⁻¹ ja temperatuuril 21 °C.

Konkreetsed soovitud 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 rakukogumike 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 rakku). See muudab rakkude kontsentratsiooni mikroskoobiga määramise usaldusväärsemaks.

Pärast hoolika ultrahelitöötuse 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.

Katsenõud tuleks paigutada orbitaal- või võnkloksuti plaadile ja loksutada neid kiirusel umbes 150 pööret minutis. *Anabaena* rakukogumike moodustumist võib takistada ka perioodilise loksutamisega. 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 mõtmist rakkude mikroskoobi abil loendamise teel. Võib kasutada sellist elektroonilist osakeste loendurit, mis võimaldab loendada osakesi, mille väikseim läbimõõt on 1 µm. Võib kasutada ka fluorimeetrilist mõtmist *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 pindkilesse. Sel juhul tuleb biomassi määramiseks vajalike osaproovide võtmisel rakendada erimeetmeid, et tagada proovide representatiivsus. Kultuuri võib olla vaja tugevalt segada, kasutades näiteks keerisregistrit.

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 puhtusastmega 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 ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ · 2H ₂ 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 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ kontsentratsioonini 1,4 mg Si/l.

Söötme nõutav pH saavutatakse, kui söötme karbonaatsüsteem on tasakaalus CO_2 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_3 kontsentratsioonil 15 mg/l on pH_{eq} 7,5 (sööde AAP) ja NaHCO_3 kontsentratsioonil 50 mg/l on pH_{eq} 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_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Põhilahus 2: raud	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
Põhilahus 3: mikrotoitained	
H ₃ BO ₃	185 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mg/l
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7 mg/l
Põhilahus 4: vesinikkarbonaat	
NaHCO ₃	50 g/l
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ 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 milliliitrini.

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 milliliitrile deioniseeritud või destilleeritud veele lisatakse 1 ml iga põhilahust 2.1–2.7 ja saadud lahuse ruumala viiakse 1 liitrini.
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. NaNO₃ 12,750 g.

2.2. MgCl₂ · 6H₂O 6,082 g.

- | | |
|--|--------------|
| 2.3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,205 g. |
| 2.4. Mikrotoitainete põhilahus (vt punkt 3). | |
| 2.5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 7,350 g. |
| 2.6. K_2HPO_4 | 0,522 g. |
| 2.7. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 7,500 g. |
| 2.8. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | vt märkus 1. |

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_3BO_3 | 92,760 mg. |
| 3.2. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 207,690 mg. |
| 3.3. ZnCl_2 | 1,635 mg. |
| 3.4. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 79,880 mg. |
| 3.5. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,714 mg. |
| 3.6. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,006 mg. |
| 3.7. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 3,630 mg. |
| 3.8. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 150,000 mg [dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat]. |
| 3.9. $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 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 $7,5 \pm 0,1$.
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.
-

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. Vähemalt kord kahe kuu jooksul kantakse kultuur üle uuele söötmele.

Tüvikultuuri kasvatatakse sobivat söödet 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 katsenõude 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.

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 – vetikakatse 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.

Regressioonianalüüs*Mudelid*

Regressioonianalüüsi 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 algpunkti 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 katseandmetele mittelineaarse regressiooni teel. Et saada katseandmete alusel võimalikult palju teavet, soovitatakse paralleelkultuuride keskmiste väärtuste asemel kasutada iga üksiku kolvi kohta saadud mõõteväärtusi. Praktilisest 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 mittersümmeetrilise kõvera, mis vastab näiteks Weibulli funktsioonile. Kasvu negatiivne pidurdumine võib näiteks loognormaalse jaotuse funktsiooni korral probleeme tekitada ning ka sel juhul tuleb kasutada mõnda alternatiivset regressioonifunktsiooni. Selliste negatiivsete väärtuste 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.)

$$Y_i = \text{uuritava muutuja suhteline väärtus} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

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 lisaparaameetrina. Tavalise kaheparaameetrilise regressioonivõrrandi puhul nõuab see meetod lähendamist kolme paraameetri 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 $I = f(\alpha, \beta, \text{kontsentratsioon})$; kasutatakse määratlusest tulenevaid seoseid $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ ja $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$, et asendada $f(\alpha, \beta, \text{kontsentratsioon})$ samaväärse funktsiooniga $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{kontsentratsioon})$.)

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 moodustumist 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"

4) Peatükk C.11 asendatakse järgmisega:

„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 ammoniumi 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 sõelkatsena, 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 inokulumi sisaldus on oluliselt väiksem kui käesoleva katsemeetodi puhul. Seega ei tähenda pärssiva mõju puudumine käesoleva meetodi kohases hingamiskatse 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 pärssumise 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_{50} väärtused on eeldatust väiksemad (5). Uuringutest on selgunud, et sellised tulemused saadakse juhul, kui katses kasutatud aktiivmuda olulisel määral nitritifitseerib ja uuritava kemikaali mõju ammooniumi oksüdeerimisele on suurem kui üldisele heterotroofsele oksüdeerimisele. Seepärast võib selliste kahtlaste tulemuste tõlgendamiseks teha lisakatseid, kus kasutatakse spetsiifilist nitritifitseerimise inhibiitorit. Kui mõõta hapniku sidumise kiirust sellise inhibiitori, nt N-allüülitiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel, on võimalik arvutada hapniku sidumise kiirus eraldi üldise hingamise, heterotroofse oksüdeerimise ja nitritifitseerimise puhul (4, 7, 8). Seega saab kindlaks teha uuritava kemikaali pärssiva mõju kahes kõnealusel protsessis ja arvutada tavapärasel viisil EC_{50} väärtused nii orgaanilise süsiniku oksüdeerimise (heterotroofne oksüdeerimine) kui ka ammooniumi oksüdeerimise (nitritifitseerimine) puhul. Tuleks silmas pida, et mõnel üksikul juhul võib N-allüülitiokarbamiidi inhibeeriv toime osaliselt või täielikult kaduda uuritava kemikaaliga või söötmelisandite, nt Cu^{++} -ioonidega kompleksi moodustamise tõttu (6). Cu^{++} -ioonid on *Nitrosomonas*'e puhul vajalikud, kuid on suuremas kontsentratsioonis mürgised.
3. On tekkinud tungiv vajadus kasutada reovee aeroobsel töötlemisel nitritifitseerimist, mis on vajalik etapp reoveest lämmastikuühendite kõrvaldamisel denitritifitseerimise teel gaasiliste lõppsaadustena; see vajadus ilmneb eelkõige Euroopa riikides, kuna EL on praeguseks kehtestanud veekogudesse juhitava puhastatud heitvee lämmastikusalduse väiksemad piirmäärad (¹).
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 nitritifitseerimisele või eraldi nii nitritifitseerimisele kui ka orgaanilise süsiniku oksüdeerimisele.

KATSEMETODI 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 hüdrolüüsi 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-allüülitiokarbamiidi juuresolekul ja selle puudumisel; nimetatud inhibiitor pärsib ammooniumi oksüdeerimist nitritiks esimese etapi nitritifitseerivate bakterite toimet. 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-allüülitiokarbamiidi 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).

(¹) Nõukogu direktiiv 91/271/EMÜ, 21. mai 1991, asulareovee puhastamise kohta (ELT L 135, 30.5.1991, lk 40).

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 kemikaalist (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 analüüsiandmed.

VÕRDLUSKEMIKAALID

10. Võrdluskemikaalidega kontrollimist tuleks teha korrapäraselt, et tagada katsemeetodi 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). Nitritiseerimist pärssiva võrdluskemikaalina võib kasutada N-metüülaniini.

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_{50} jäävat üldise hingamise puhul vahemikku 2–25 mg/l, heterotroofse hingamise puhul vahemikku 5–40 mg/l ja nitritiseerimist põhjustava hingamise puhul vahemikku 0,1–10 mg/l. Kui 3,5-diklorofenooli EC_{50} ei ole asjaomases eeldatavas vahemikus, tuleks katset korrata muust allikast pärit aktiivmudaga. Vask(II)sulfaatpentahüdraadi EC_{50} peaks üldise hingamise puhul jääma vahemikku 53–155 mg/l (9).

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

13. Lisaks tavapärastele laboriseadmetele tuleks kasutada järgmist:
 - a) katsenõud, näiteks keeduklaasid mahuga 1 000 ml, kuhu saab lisada 500 ml reaktsioonisegu (vt joonis 1, nr 5);
 - b) 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;
 - c) magnetsegistid ja inertse materjaliga kaetud segamispulgad mõõtekambris ja/või katsenõudes kasutamiseks;
 - d) aereerimiseseade: 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 või muid aereerimiseseadmeid, 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/s².

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 ₂ · 2H ₂ O)	0,4 g;
— magneesiumsulfaatheptahüdraat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,2 g;
— veevaba dikaaliumvesinikfosfaat (K ₂ HPO ₄)	2,8 g;
— lahuse ruumala viiakse destilleeritud või deioniseeritud veega 1 liitri.	

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 kontsenteeritum 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.

18. Söötme koostisained võib enne säilitamist ka eraldi steriliseerida, samuti võib peptooni ja lihaekstrakti lisada vahetult enne katse algust. Söödet tuleks enne kasutamist korralikult segada ja vajaduse korral tuleks pH reguleerida tasemele 7,5 ± 0,5.

Uuritav kemikaal

19. Veepõhise lahustatava uuritava aine sisaldus põhilahuses ei tohiks ületada aine vees lahustuvuse piirkontsentratsiooni (sademe esinemine ei ole vastuvõetav). Veepõhise lahustatava 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 katsenõusse määratakse analüüsi teel enne aktiivmuda lisamist. Lahustunud uuritava kemikaali sisalduse analüütiline määramine katsenõusse on vajalik ka juhul, kui valmistatakse vesiekstraktid. Tuleks hoiduda orgaaniliste lahustite ja dispergeerivate ainete või emulgaatorite kasutamisest lahustuvuse suurendamiseks. Põhilahuste töötlemine ultraheliga ja suspensioonide eelsegamine näiteks öö 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 põhikatse päeval tuleks pH-d uuesti kontrollida. Vajaduse korral tuleks uuritava kemikaali lahused/suspensioonid enne inokulumit lisamist neutraliseerida. Kuna neutraliseerimine võib aga muuta kemikaali keemilisi omadusi, võib olenevalt uuringu eesmärgist teha lisakatseid, 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 kontrollsegsid 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 lahutamise käigus ei muutu. Lahuse pH-d tuleks kontrollida ja vajaduse korral reguleerida see NaOH või H₂SO₄ 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)sulfaatpentahüdaat on hästi lahustuv. Katse alustamisel lisatakse 16 ml kunstlikku reovett ja 250 ml aktiivmuda.

Nitritseerimist spetsiifiliselt pärssiv aine

24. Tuleks valmistada N-allüülitiokarbamiidi põhilahus kontsentratsiooniga 2,32 g/l. Selle põhilahuse lisamisel koguses 2,5 ml inkubeerimissegusse lõppruumalaga 500 ml saadakse N-allüülitiokarbamiidi 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 peroksüühenditele. 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 kontsentratsioonivahemikku 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 mm²). 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 tseentrifuugida, 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 tseentrifuugimist eemaldada. Vajaduse korral tuleks pesemist ja tseentrifuugimist 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 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 nitrititseeerimist 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 silikooniemulsiooni 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 $50\text{ }\mu\text{l}$ 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 nitrititseeerimisega seotud sidumisele. Tavaliselt piisab üldist hapnikusidumist pärssiva mõju kindlakstegemisest. Orgaanilise süsiniku oksüdeerimisega seotud heterotroofse hapnikusidumise ja ammooniumi 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 $20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

Katsesegud

32. Tuleks valmistada vett, kunstlikku reovett ja uuritavat kemikaali sisaldavad katsesegud (F_1), 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.

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 katseseguga 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 sundaereerimise 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 katseeria nõusse eraldi. Seejärel tuleks alustada üksikult 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 nitritseerimisvõime

38. Et kindlaks teha, kas ja millise kiirusega on muda võimeline nitritseerima, tuleks valmistada kemikaalita kontrollsegud (F_B) ja täiendada kontrollsegud (F_N), mis sisaldavad lisaks N-allüülitiokarbamiidi kontsentratsioonist 11,6 mg/l. Segusid tuleks aereerida ja inkubeerida temperatuuril 20 ± 2 °C kolm tundi. Seejärel tuleks mõõta hapniku sidumise kiirus ja arvutada nitritseerimisest 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 eelkatset 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 ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
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

^(a) Võrdluskemikaali puhul tuleks toimida samamoodi, et valmistada lahused nõudesse F_{R1-3}.

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). Eelistatavalt ei tohiks kemikaal avaldada väikseimal kontsentratsioonil mingit 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 katsenõusse. Sellisel juhul tuleks lisada uuritava aine põhilahuse jaoks jäetud ruumala ulatuses lahjendusvett.

Lõplik katse

Üldise hapnikusidumise pärssumine

41. Katses tuleks kasutada eelkatse põhjal kindlaks määratud kontsentratsioonivahemikku. Et leida nii NOEC kui ka EC_x (nt EC₅₀), on enamikul juhtudel soovitatav kasutada kuut kontrollproovi ning viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrisel 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 katseseeria 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 nitrititseeerimisele avalduva pärssiva mõju eristamine

42. Spetsiifiliselt nitrititseeerimist 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 nitrititseeerimise 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 nitrititseeerimise 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 nitrititseeerimise kiirust. Seejärel arvutatakse pärssumise määrad.

Mõõtmised

43. Pärast kokkupuuteperioodi lõppu tuleks esimesest aereerimisnõust võetud proov viia hapnikuelektroodiga kambrisse (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 kaliibrimiseks, et tagada anduri reageerimine muutuvale hapnikusisaldusele minimaalse viivitusega ja võimaldada teha mõõtenõus korrapäraseid ja reprodutseeritavaid mõõtmisi. Mõnele hapnikuelektroodile lisatud segistisüsteem on 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 pudelisuule koonusülemineku 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, segu tuleks viia tagasi aereerimisnõusse ning aereerimist ja segamist tuleks jätkata, kui on vaja teha veel mõõtmisi pikema kokkupuuteperioodi järel.

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 adsorbeerumisest 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 vältimatu 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 hapnikusisalduse 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 hapnikusisalduse vähenemise graafiku lineaarse osa põhjal vastavalt võrrandile 1:

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

kus

Q_1 on hapnikusisaldus lineaarse faasi valitud lõigu alguspunktis (mg/l),

Q_2 on hapnikusisaldus lineaarse faasi valitud lõigu lõpp-punktis (mg/l) ja

Δ_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*-allüülitiokarbamiidi (F_B) (mg/lh) ja

R_H on mõõdetud hapnikusidumise kiirus kemikaalita kontrollproovis, kuhu on lisatud *N*-allüülitiokarbamiidi (F_N) (mg/lh).

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 nitrifitseerimist ei toimu. Kui katsetega soovitakse hinnata mõju heterotroofsetele ja nitrifitseerivatele 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. Nitrifitseerimisest 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

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 keskvaärtusest x % moodustav väärtus. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste väärtuste (\bar{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 paralleelproovidenä). 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, eeltötlus 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.
 - (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.
-

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on 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.

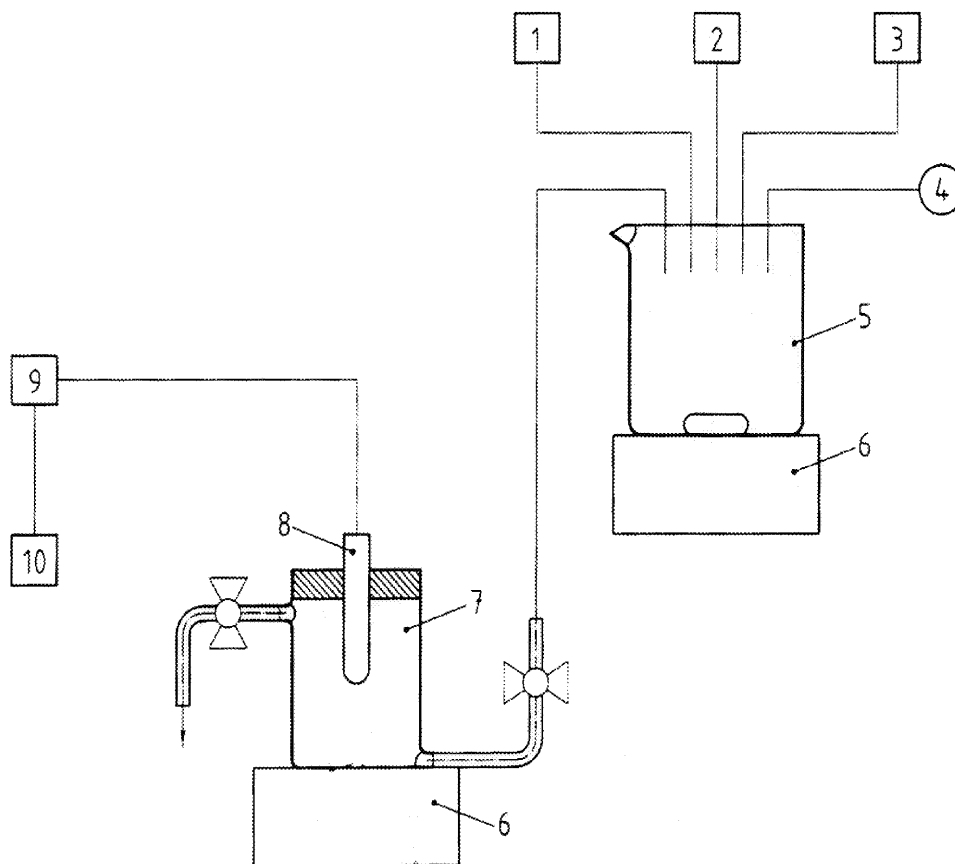
NOEC (tähtsatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

—

2. liide

Joonis 1. Mõõtesüsteemi näide.

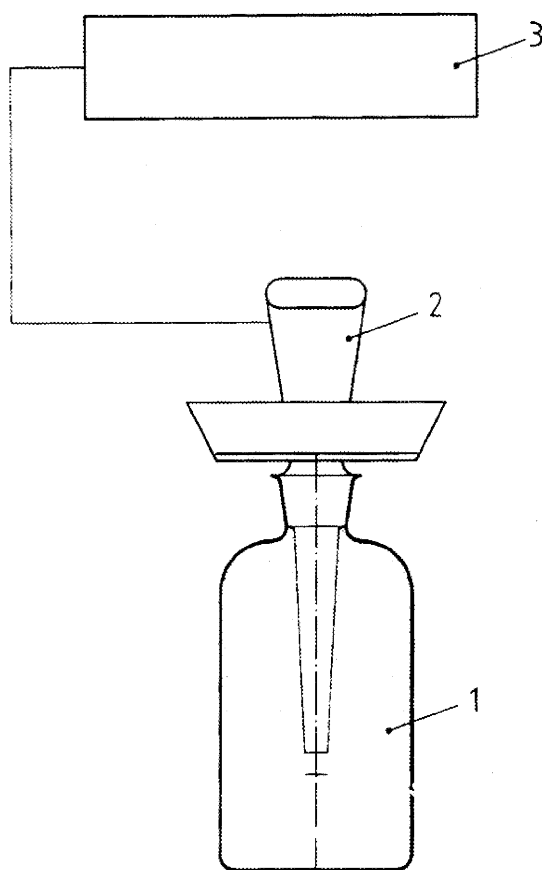


Selgitus:

- | | |
|----------------------|------------------------------------|
| 1 – aktiivmuda | 6 – magnetsegisti |
| 2 – kunstlik sööde | 7 – hapnikusalduse mõõtmise kamber |
| 3 – uuritav kemikaal | 8 – hapnikuelektrood |
| 4 – õhk | 9 – hapnikusalduse mõõtmise seade |
| 5 – segamismõu | 10 – salvestusseade |

3. liide

Joonis 2. BHT pudelil põhineva mõõtesüsteemi näide.

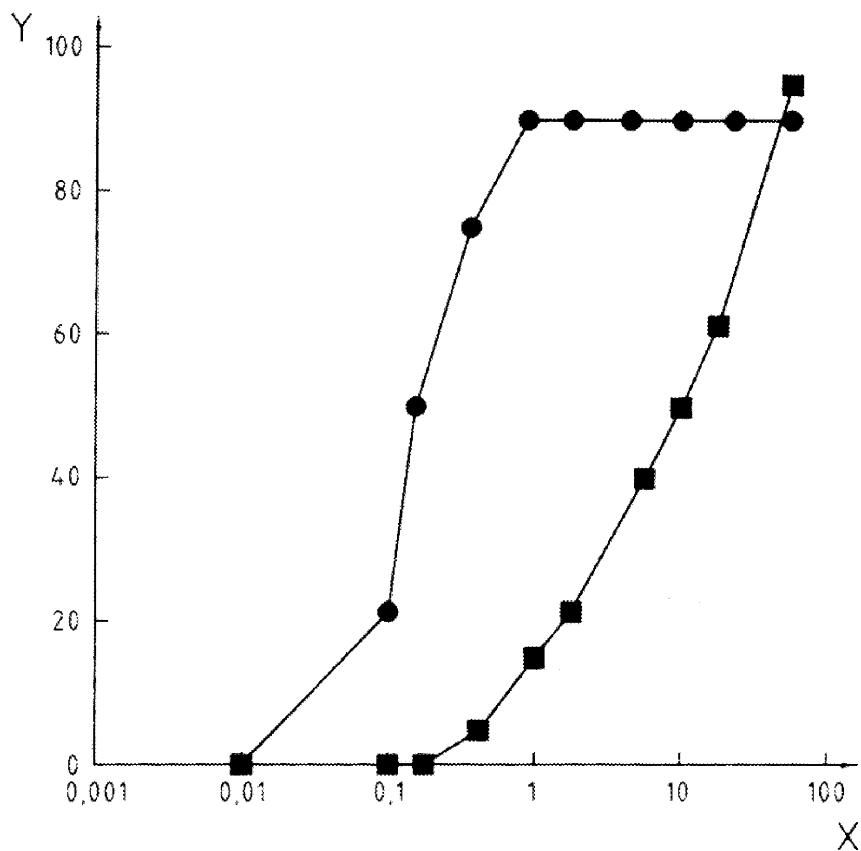


Selgitus:

- 1 – katsenõu
- 2 – hapnikuelektrood
- 3 – hapnikusisalduse mõõtmise seade

4. liide

Joonis 3. Pärssumiskõverate näide.



Selgitus:

X – 3,5-diklorofenooli sisaldus (mg/l)

Y – pärssumine (%)

■ – heterotroofse hingamise pärssumine nitrititseeeriva muda kasutamisel

● – nitrititseeerimise pärssumine nitrititseeeriva muda kasutamisel

5) Peatükk C.26 asendatakse järgmisega:

„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 kloon. 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 tallusjate võsude arv. Kuna mõni kemikaal võib mõjutada muid mõõdetavaid muutujaid palju rohkem kui tallusjate võsude arvu, hinnatakse peale selle veel vähemalt ühte mõõdetavat muutujat (tallusjate 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 $E_r C_x$ (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 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 $E_y C_x$ (nt $E_y C_{50}$).
8. Peale selle võib statistiliselt kindlaks teha vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) ja täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC).

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, soovatakse 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 tallusjate 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 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 nõuetekohaste mõõtmetega 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. Valgustustihedus ja temperatuur peavad olema reguleeritavad ja neid hoitakse konstantsena (vt punktid 35–36).

Katseorganism

16. Käesoleva meetodi kohases katses kasutatakse katseorganismina lemmelt *Lemna gibba* või *Lemna minor*. Mürgisuse hindamise katses kasutatud lemlelikide 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 valgustustiheduse 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-morfoliinpropaansulfoonhape, CASi nr 1132-61-2) ja *L. gibba* puhul NaHCO₃), 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.
22. Liigi *L. minor* taimede kultiveerimiseks ja nendega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Rootsi Standardiinstituudi (SIS) lemlisöödet modifitseeritud kujul. Selle söötme koostis 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. Veest raskesti lahustuva kemikaali puhul võib olla vaja kasutada selle kemikaali kontsentreeritud põhilahuse või dispersiooni valmistamiseks orgaanilist lahustit või disperseerivat ainet, et hõlbustada uuritava kemikaali täpse koguse lisamist katsesöötmesse ja soodustada kemikaali lahustumist või disperseerumist. Tuleks teha kõik selleks, et selliseid aineid ei oleks vaja kasutada. Lisatav lahusti või disperseeriv aine ei tohiks olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatavad lahustid, mis kuni kontsentratsioonini 100 µl/l ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Lahusti või disperseeriva aine kasutamisel peaks selle lõppsisaldus olema võimalikult väike (≤ 100 µl/l) ja tuleks märkida katseprotokolli ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleks kasutada lahusti või disperseeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised disperseeriva 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 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, keskkonnaningimused ja katsemeetodid on samad kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul, kuid mis ei sisalda uuritavat kemikaali. Lahusti või disperseeriva aine kasutamise korral tuleks lisaks valmistada kontrollkultuur, milles lahusti või disperseeriva 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 suurendatakse 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 igaihes 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 eelkatsest nähtub, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni ei ole võimalik katse vältel (7 ööpäeva jooksul) püsivana hoida, st kemikaali mõõdetud sisaldus langeb alla 80 % mõõdetud algsisaldusest, soovivatatakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul tuleks kolooniad katse jooksul vähemalt kahel korral (nt kolmandal ja viiendal katsepäeval) üle viia värskelt 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 päevavalguse spektriga või külmvalget pidevat fluorestsentsvalgust, mille intensiivsus jääb vahemikku $85\text{--}135 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (vastab 6 500–10 000 luksile), mõõdetuna fotosünteesiks sobivas lainepikkuste vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui *Lemma* tallusjad võsud. Valgustustihedus ei tohiks katsepinna üheski punktis erineda valitud väärtusest üle 15 %. Valgustustiheduse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eelkõige anduri tüübist. Ühest suunast saabuvale valgusele reageeriva anduri asemel soovivatatakse 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 ± 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:
- tallasjate võsude üldpindala,
 - kuivmass,
 - 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.
- 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 pindalühikule vastavate paberi kaalude suhte määramine).
 - 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.
 - 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 pöört minutis. Sel viisil kuivatatud kolooniaid sisaldavad katseklaasid kaalutakse uuesti ning märgmassi leidmiseks lahutatakse saadud tulemusest tühja katseklaasi mass.

Mõõtmiste ja analüüsides 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. Söötme temperatuur kasvukambri, inkubaatoris või ruumis samades tingimustes hoitavas jäljendusnõus 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 proovivõtturežiimi 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 lahenduslahuse 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).

Piirsisalduskatse

48. Teatavatel juhtudel, näiteks kui eelkatsest selgub, et uuritav kemikaal ei avalda kontsentratsioonil kuni 100 mg/l või katsesöötmes lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on väiksem) mürgist mõju, võib teha piirsisalduskatse, milles võrreldakse kasvu kontrollrühmas ja ühes katserühmas, kus kemikaal esineb kontsentratsioonis 100 mg/l või lahustuvuse piirkontsentratsioonil. Piirsisalduskatse tegemisel soovitatakse tungivalt määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Piirsisalduskatse 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 keskvärtusi 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 μ on punktides 54–55 kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

Uuritavad muutujad

50. Katse eesmärk on teha kindlaks uuritava kemikaali mõju *Lemna* 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 lähenemisviiside matemaatiline alus on erinev. Seda erinevust ei tohiks tõlgendada kahe kõnealuse uuritava muutuja tundlikkuse erinevusena; 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, kontsentratsiooni 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 valemil abil:

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

kus

— μ_{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 keskvärtus 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:

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

kus

- $\% I_r$: on keskmise kasvu erikiiruse vähenemise määr protsentides,
- μ_C : on μ keskvärtus kontrollrühmas,
- μ_T : on μ 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_x leidmine

59. EC_x (nt EC₅₀) hinnanguliste väärtuste leidmisel tuleks lähtuda nii keskmisest kasvu erikiirusest (E_rC_x) kui ka saagisest (E_yC_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_x väärtust: E_rC_x (tallusjate võsude arv), E_rC_x (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või märgmass), E_yC_x (tallusjate võsude arv) ja E_yC_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, et probit-, logit- või Weibulli teisendusel põhinevad standardsed analüüsimeetodid 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 keskvärtusi, vaid igas üksikus paralleelkultuuris saadud väärtusi.
62. Kui olemasolevad regressioonimudelid ja -meetodid ei ole katseandmete jaoks sobivad, võib EC₅₀ hinnangulise väärtuse ja usalduspiiride leidmiseks kasutada ka lineaarset interpoleerimist koos andmete usaldusväärsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (17).
63. Et teha kindlaks LOEC ja selle alusel ka 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 (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 lemmeldega 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 EC₁₀ kui ka EC₂₀.

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;
- põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, sh lahustite või disperseerivate ainete kasutamise kirjeldus;
- katsetemperatuur;
- valgusallikas, valgustustihedus ja valguse ühtlus;
- katse- ja kontrollsõotmete pH väärtused;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonid ning kasutatud analüüsimeetod ja asjakohased kvaliteedihindamise andmed (valideerimisuringud, analüüsandmete standardhälbed või usalduspiirid);
- tallusjate võsude arvu ja muude mõõdetavate muutujate – kuivmassi, märgmassi või tallusjate võsude pindala – määramise meetodid;
- kõik kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist.

Tulemused:

- töötlemata andmed: tallusjate 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);
- tallusjate võsude arvu kahekordistumise aeg või kasvukiirus kontrollkultuuris;
- uuritavate muutujate arvutatud 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_{50} , EC_{10} , EC_{20} – 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).
- (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 modelling 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.
-

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 – üksiteisega ühendatud tallusjate ema- ja tütarvõsude kogum (tavaliselt 2–4 võsu). Mõnikord nimetatakse kolooniat ka taimeks.

EC_x – katsesöötmes 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 arvutatava EC väärtuse üheselt arusaadavaks tähistamiseks kasutatakse kasvukiiruse puhul tähist „E_rC” ja saagise puhul tähist „E_yC”, mille järel märgitakse kasutatud mõõdetav muutuja, nt E_rC (tallusjate võsude arv).

Läbivoolukatse – katse, mille käigus katselahus pidevalt vahetub.

Tallusjas võsu – lemle lehetaoline 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 avaldub 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.

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.

—

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 parasvöötmele 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, mitesugulisele 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 aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Filosoofialitsensiaadi väitekiri 1996:2. Stockholmi Ülikooli süsteemiökoloogia 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 Czyrska, 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

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.
-

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 taimsest materjalist võetakse proov ja lõigatakse ära taimede juured. Pärast seda lõksutatakse taimset materjali tugevalt puhtas vees ja asetatakse 30 sekundiks kuni 5 minutiks 0,5-mahuprotsendilisse naatriumhüpokloriti 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.

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) lemlisööde

- 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.

Põhila- huse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,3	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puhver)	490	490	—	—

Ühe liitri SISI söötme saamiseks lisatakse 900 ml deioniseeritud veele järgmised komponendid:

- 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 liitrini.

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 liitrini. Seejärel filtritakse sööde läbi umbes 0,2 µm suuruste pooridega membraanfiltrini 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.

Põhila- huse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7

Põhilahuse nr	Aine	Sisaldus põhilahuses (g/l) (*)	Sisaldus valmissöötmes (mg/l) (*)	Valmissööde	
				Element	Sisaldus (mg/l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7, µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,4 µg/l	Cu	0,80 µg/l
C	NaHCO ₃	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 *Lemma* 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 *Lemma minor*'i jaoks (kuna selle standardi puhul on lubatud kasutada ainult *Lemma minor*'it), kuid katsetest ilmneb, et selle söötmega võib saada häid tulemusi ka *Lemma 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 ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Koostisaine		Sööde	
Makrotoitained	Molekulmass	mg/l	mmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	372,24	1 500,00	4,03

Tabel 2.

Põhilahused (makrotoitained).

1. Makrotoitained (50 korda kontsenteeritumad)	g/l
Põhilahus 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Põhilahus 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Põhilahus 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabel 3.

Põhilahused (mikrotoitained).

2. Mikrotoitained (1 000 korda kontsenteeritumad)	mg/l
Põhilahus 4:	
H_3BO_3	120,0
Põhilahus 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Põhilahus 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0

2. Mikrotoitained (1 000 korda kontsentreeritud)	mg/l
Põhilahus 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Põhilahus 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1 500,00

- Põhilahused 2 ja 3 võib omavahel kokku segada, samuti võib omavahel kokku segada põhilahused 4–7 (võttes arvesse vajalikke kontsentratsioone).
- Säilivusaja pikendamiseks autoklaavitakse põhilahused 121 °C juures 20 minuti jooksul või steriliseeritakse filtrimise teel (0,2 µm). Põhilahus 8 soovitatakse 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 milliliitrini.
- 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 milliliitrini.
- 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 $5,5 \pm 0,2$.

6) Lisatakse järgmised peatükid C.31–C.46:

„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 tärgkamisele 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 kemikaalaurudega. 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 taimete 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 taimeliigi 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 analüüsimeetodiga 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 vees, lahustuvus orgaanilistes lahustites, jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktaanol/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 %;
 - keskkonningimused on konkreetse liigi puhul ühesugused ning kasvukeskkond 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 katsesüsteemi 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. Savimuldasi ei tohiks kasutada, kui on teada, et uuritava kemikaali afiinsus savi suhtes on suur. Põllumuld tuleks homogeensuse tagamiseks ja suurte osakeste kõrvaldamiseks selliselt 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 patogeenide 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 muutuvad mõjutavad omakorda mulla niiskumahtuvust, 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 soovitakse 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 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 kontrolltaimedele 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 reaktsioone 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.
15. Vees raskesti lahustuvad 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 vees lahustuva kemikaali lahustada vahetult enne katse algust toitainelahuses. Kui kemikaal on vees lahustumatu, kuid seda on võimalik lahusti abil vees suspendeerida, tuleks see lisada toitainelahusesse koos lahustiga. Vees lahustumatu kemikaal, mille jaoks ei ole mittemürgist vees lahustuvat lahustit, tuleks lahustada sobivas lenduvas lahustis. Lahus segatakse liiva või klaashelmelega, 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 tavapärastel kasutatavasse vahemikku ning asjaomased kogused (vee hulk jne) tuleks märkida katseprotokollis. Tuleks valida sellist tüüpi otsik, mille puhul mullapind saaks ühtlaselt kaetud. Lahusti või kandeaine kasutamise korral tuleks moodustada täiendav rühm kontrolltaimi, mille puhul lisatakse üksnes lahustit/kandeainet. 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 suurusest ja katse kestusest. Taimede arv potis peaks olema selline, et katse vältel oleksid tagatud sobivad kasvutingimused ja taimi ei oleks liiga palju. Maksimaalne tihedus peaks olenevalt seemnete suurusest olema 3–10 seemet 100 cm² kohta. Näiteks on taimede soovitatav tihedus 15-sentimeetrise läbimõõduga potis maisi, sojaõa, 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 insektsiidi või fungitsiidiga kaetud seemnete (st puhitud seemnete) kasutamisest. Mõni reguleeriv asutus lubab siiski kasutada teatud mittesüsteemseid kontaktfungitsiide (nt kaptaan, tiraam) (22). Kui muret teevad seemnetega levivad patogeened, 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). Tähtsaid taimi tuleks kasvatada kontrollitava keskkonnaga kambris, fütotronis või kasvuhuones kooskõlas hea aiandustavaga. Taimikasvatuseks 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. Kasvuhuones tuleks temperatuuri reguleerida ventilatsiooni-, kütte- ja/või jahutussüsteemi abil. Kasvuhuones tehtava katse puhul soovitatakse üldjuhul kasutada järgmisi tingimusi:

— temperatuur: 22 ± 10 °C;

— õhuniiskus: 70 ± 25 %;

— valgustusperiood: vähemalt 16 tundi;

— valgustustihedus: 350 ± 50 μE m⁻² s⁻¹. Kui valgustustihedus lainepikkuste vahemikus 400–700 nm langeb alla 200 μE m⁻² s⁻¹, 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 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 ülalkastmist, et aidata kaasa seemnete idanemisele ja hõlbustada mullapinna töötlemise puhul kemikaali kandumist mulda.

24. Konkreetseid 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-keemilisi omadusi. Taimekaitsevahendite puhul tuleb arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalise-keemilisi 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 fütotoksiline, 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 kontrollile vähemalt viit kontsentratsiooni või koguselise määra geomeetrilises 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 tavapäraselt 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 mitteavaldatavat 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 suremust. Katse lõpus tuleks registreerida tärnanud taimede protsentuaalne osakaal ja ellujäänud taimede biomass, samuti silmaga nähtav kahjulik mõju taime eri osadele. See kahjulik mõju hõlmab tärnanud seemikute ebanormaalsel välimusel, kasvu kängumist, kloroosi, värvusemuutusi, suremist ja mõju taimede arengule. Lõpliku biomassi mõõtmiseks võib kasutada ellujäänud taimede võrse lõplikku 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 mitteavaldav 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 lühikokkuvõtte. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

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 keskkonningimuste 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;
- 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 moondumine, 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.
 - (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”.
-

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_x või ER_x (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_{25}/ER_{25} ja EC_{50}/ER_{50} 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).

Tärkamine – koleoptiili või idulehe ilmumine mullapinnale.

Valmistis – asjaomast toimeainet sisaldav kaubanduslik valmistoode, tuntud ka kui lõppvalmistis⁽¹⁾ 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.

⁽¹⁾ Lõppvalmistis – asjaomast toimeainet sisaldav turustatav valmistoode.

2. liide

Taimekatsetes varem kasutatud liikide loetelu

Sugukond	Liik	Tavanimetus
DICOTYLEDONAE		
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</i> (G. soja)	Sojauba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Munguba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pöösasuba, lattuba, harilik aeduba
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Hernes
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Pöld-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

Sugukond	Liik	Tavanimetus
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<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 tärgamise 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 (1) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood (2)	Külvamissügavus (mm) (3)	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) (4)	Eritöötlus (5)	Mürgisuse hindamise katse (6)	Seemnete tarnijad (7)	Muud allikaviited (8)
APIACEAE <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)	Külm töötlus (7, 14, 18, 19); küpsemine võib olla vajalik (19); pimedus pärsib idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)		
ASTERACEAE <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	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ⁽¹⁾ ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ⁽²⁾	Külvamisülgavus (mm) ⁽³⁾	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ⁽⁴⁾	Eritöötlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika viited ⁽⁸⁾
<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, lagendikud (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 pärssida (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	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetused)	Eluiga ⁽¹⁾ ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ⁽²⁾	Külvamisülgavus (mm) ⁽³⁾	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ⁽⁴⁾	Eritöötlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika viited ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (aas-jürilill)	M; põllud, teeperved, rohu- kamar (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	
CARYOPHYLLACEAE <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	
CHENOPODIACEAE <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); külmtöötlus (18); eritöötluseta (14, 34)	ENNE ja PÄRAST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <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	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (luuderohi-lehtertapp)	Ü; teeperved, lagealad, vil- japõllud (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	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (visa lõikhein)	M; haritavad maad, karja- maad, 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

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 allika-viited ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (harilik nõiahammas)	M; rohualad, teeperved, la- gealad (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 19); kiirgus ei mõjuta idane- mist (18, 19); eritöötlu- seta (23, 25)	PÄRAST (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (tömbilehine 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 idane- mist (1); eritöötluseta (21)	ENNE ja PÄ- RAST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (aasristik)	M; põllud, teeperved, hari- tavad maad (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	Skarifitseerimine (14, 18); küpsemine võib olla va- jalik (19); kiirgus ei mõ- juta idanemist (1, 19); eritöötluseta (5)	PÄRAST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (lääne-südamerohi)	M; lagendikud (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	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ⁽¹⁾ ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ⁽²⁾	Külvamisülgavus (mm) ⁽³⁾	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ⁽⁴⁾	Eritöötlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika viited ⁽⁸⁾
<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	
<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 idanemise 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	
MALVACEAE <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	
PAPAVERACEAE <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	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ⁽¹⁾ ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ⁽²⁾	Külvamisühik (mm) ⁽³⁾	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ⁽⁴⁾	Eritöötlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika viited ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (harilik kastehein)	Muru, karjamaad (16)	0,07 (14)	V > P (10)	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 ₃ lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); stratifitseerimine soojas (1); pimedus pärsib idanemist (1); eritöötluseta (34)	ENNE ja PÄRAST (28, 34)	A	32
<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	

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⁾	Eritootlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika-viited ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (verev paelhirss)	Ü; põllud, rohukamar, la-gealad (16)	0,52–0,6 (14, 30)	V = P (14)	10–20 (21)	7 (75 %), 14 (94 %) (7)	Skarifitseerimine, kül-m-töötus ja küpsemine (1, 7, 14, 32); töötus KNO ₃ lahusega, mille kontsentratsioon on 101 mg/l (14); pimedus pärsib idanemist (1); eri-töötlu-seta (21)	ENNE ja PÄ-RAST (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); eritöotlu-seta (3, 14, 21)	ENNE ja PÄ-RAST (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)	Eritöotlu-seta (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)	Eritöotlu-seta (10, 19)	PÄRAST (10)	A	7
<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 kooslu-sega alad (16, 19)	0,45 (14, 19)	V > P (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10); 8 (50 %) (19)	Pimedus pärsib idane-mist (19); kiirgus ei mõ-juta idanemist (17); eri-töotlu-seta (10, 14, 17, 19)	PÄRAST (10)	A, E	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga ⁽¹⁾ ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood ⁽²⁾	Külvamisülgavus (mm) ⁽³⁾	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) ⁽⁴⁾	Eritöötlus ⁽⁵⁾	Mürgisuse hindamise katse ⁽⁶⁾	Seemnete tarnijad ⁽⁷⁾	Muud allika viited ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <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 PÄ- RAST 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 PÄ- RAST (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, töötus giberelliinhappega (14); külm-töötlus, küpsemine (17–19); pimedus pärsib idanemist (19); eritöötluseta (13)	PÄRAST (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (kärnoblikas)	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

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetus)	Eluiga (1) ja elupaik	Seemne kaal (mg)	Idanemiseks või kasvuks vajalik valgustusperiood (2)	Külvamisülgavus (mm) (3)	Idanemiseks vajalik aeg (päeva) (4)	Eritöötlus (5)	Mürgisuse hindamise katse (6)	Seemnete tarnijad (7)	Muud allika viited (8)
PRIMULACEAE <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, töötus gibberelliinhappega (1, 14, 18, 19, 32); idanemine nõuab valgust (1); eritöötluseta (2, 4)	PÄRAST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE <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
ROSACEAE <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	
RUBIACEAE <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
<i>Galium mollugo</i> (pehme madar)	M; hekvallid, lagendikud (8)	7 (29)	V = P (14)	2 (29)		Eritöötluseta (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PÄRAST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (verev sõrmkübar)	K, M; hekid, lagendikud (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	

SUGUKOND Liigi botaaniline nimetus (eestikeelne tavanimetust)	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 allika-viited ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (pärsia mailane)	Ü; haritavad põllud, lagedikud, 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); külmtootlus (18); eritöötluseta (14)	ENNE ja PÄ- RAST (28)	A	32

⁽¹⁾ Ü = üheaastased taimed; K = kaheaastased taimed; M = mitmeaastased taimed.

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ 0 mm puhul külvatakse seemned mullapinnale või need vajavad idanemiseks valgust.

⁽⁴⁾ Esitatud arv tähistab päevade arvu, mille jooksul idanes viidatud allika kohaselt teatav protsent seemnetest – nt 3 päeva (idanevuse määr 50 %) (allikas 19).

⁽⁵⁾ Küpsemise ja/või stratifitseerimise kestus ei ole alati märgitud. Temperatuuritingimusi ei ole täpsustatud, välja arvatud külmtootluse puhul, sest kasvuhoones tehtavas katses on temperatuuri reguleerimise võimalused piiratud. Kasvuhoones esinevate tavapäraste temperatuurikõikumiste juures idaneb enamik seemneid.

⁽⁶⁾ On märgitud, kas taimeliigiga tehtud fütotoksilisuse katses vaadeldi herbitsiidi mõju ENNE või PÄRAST tärkamist.

⁽⁷⁾ On esitatud näited seemnete kommertstarnijate kohta.

⁽⁸⁾ On esitatud viited kahe muu kasutatud allika kohta.

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.

- (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)
- (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).
- (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.

- (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.
-

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 ± 50 ppm.

Suhteline õhuniiskus: valgel ajal 70 ± 5 % ja pimedal ajal 90 ± 5 %.

Temperatuur: päeval 25 ± 3 °C ja öösel 20 ± 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 ülapiinna 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*).
-

C.32. VALGELIIMUKLASTE SIGIVUSE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 220 (2004). See meetod on ette nähtud selleks, et hinnata kemikaalide mõju hariliku valgeliimuka (*Enchytraeus albidus* Henle, 1873) sigivusele mullas. Meetod põhineb üldjoontes Saksamaa asutuse Umweltbundesamt välja töötatud meetodil (1), mis on võrdlusuuringuga valideeritud (2). Samuti on kaalutud muid meetodeid kemikaalide mürgisuse hindamiseks valgeliimuklastel ja vihmaussidel (3, 4, 5, 6, 7, 8).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Perekonda *Enchytraeus* kuuluvad mullas elavad rõngussid esindavad ökotoksikoloogiliste katsete jaoks sobivaid ökoloogiliselt olulisi liike. Valgeliimuklasi leidub sageli vihmausse sisaldavas mullas, ent samal ajal esineb neid tihti arvukalt ka paljudes muldades, kus vihmaussid puuduvad. Valgeliimuklasi saab kasutada nii laborikatsetes kui ka poolväli- ja välikatsetes. Praktilisest seisukohast on paljud perekonna *Enchytraeus* liigid hõlpsalt kasutatavad ja kasvatatavad ning nende generatsiooniaeg on oluliselt lühem kui vihmaussidel. Valgeliimuklaste puhul on sigivuskatse kestus üksnes 4–6 nädalat, samas kui vihmausside (*Eisenia fetida*) puhul on see 8 nädalat.
3. Põhiteave maismaakeskkonnas elavate valgeliimuklaste ökoloogia ja nendega seotud ökotoksikoloogia kohta on esitatud allikates 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

4. Täiskasvanud valgeliimukad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides segatud kunstliku mullaga. Katse võib jagada kahte etappi: a) kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, mis tehakse juhul, kui kättesaadav teave ei ole piisav, ja milles kahe nädalase kokkupuuteperioodi järel hinnatav peamine lõppnäitaja on suremus, ning b) lõplik sigivuskatse, milles hinnatakse vanema sigitatud noorloomade koguarvu ja vanemate ellujäämise määra. Lõpliku katse kestus on kuus nädalat. Esimese kolme nädala möödudes eemaldatakse täiskasvanud ussid ja registreeritakse neil esinevad morfoloogilised muutused. Järgmise kolme nädala möödudes loendatakse täiskasvanute moodustatud kookonitest koorunud järglased. Uuritava kemikaaliga kokku puutunud loomade sigivust võrreldakse sigivusega kontrollrühma(de)s, et teha kindlaks: i) täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või ii) EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}), kasutades regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul sigivus väheneb x % võrra. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) väärtust, nii et EC_x leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

5. Soovitavalt peaks olema teada uuritava kemikaali lahustuvus vees, $\log K_{ow}$, jaotuskoeffitsient süsteemis muld/vesi (nt käesoleva lisa peatükk C.18 või C.19) ja aururõhk. Samuti on soovitatav lisateabe olemasolu uuritava kemikaali säilivuse kohta mullas, näiteks kemikaali fotolüüsi ja hüdrolüüsi kiirus.
6. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga töötlemise viis on neil kahel juhul siiski erinev. Katsemeetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoeffitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.

KATSE NÕUETEKOHASUS

7. Katse vastab nõuetele, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:
 - täiskasvanud isendite suremus ei tohiks kontsentratsioonivahemiku leidmise katse lõpus ja sigivuskatse esimese kolme nädala möödudes olla suurem kui 20 %;
 - kui katset alustatakse 10 täiskasvanud isendiga nõu kohta, peaks katse lõpuks olema igas nõus sigitatud keskmiselt 25 noorlooma;
 - noorloomade keskmise arvu variatsioonikordaja ei tohiks sigivuskatse lõpus olla suurem kui 50 %.

Kui katse ei vasta eespool nimetatud nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleks see lõpetada, välja arvatud juhul, kui katse jätkamist on võimalik põhjendada. Selline põhjendus tuleks esitada katseprotokollis.

VÕRDLUSKEMIKAAL

8. Võrdluskemikaali abil tuleks korrapäraselt või võimaluse korral igas katses kontrollida, kas katseorganismide reaktsioon on aja jooksul üldjoontes samaks jäänud. Sobiv võrdluskemikaal on karbendasiim, mis teadaolevalt mõjutab valgeliimuklaste ellujäämise määra ja sigivust (13, 14); võib kasutada ka muid kemikaale, mille mürgisuse andmed on hästi dokumenteeritud. Võrdlusuuringus kasutati karbendasiimi valmistoote kujul, mida tarnib kaubanime Derosal™ all ettevõtte AgrEvo Company (Frankfurt, Saksamaa) ja milles toimeaine sisaldus on 360 g/l (32,18 %) (2). Võrdlusuuringus sigivuse kohta määratud EC_{50} jäi vahemikku $1,2 \pm 0,8$ mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta (2). Kui katseeerias kasutatakse positiivse kontrollina mürgist võrdluskemikaali, kasutatakse ühte kontsentratsiooni ning asjaomaste paralleelnõude arv peaks olema sama kui kemikaalita kontrollrühmas. Karbendasiimi puhul soovitatakse teha katse kontsentratsioonil 1,2 mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta (kui kasutatakse vedelat valmistoodet).

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

9. Katsenõud peaksid olema klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Selleks sobivad klaaspurgid (nt mahuga 0,20–0,25 liitrit ja diameetriga umbes 6 cm). Nõudel peaks olema läbipaistev (nt klaasist või polüetüleenist) kaas, mis vähendab vee aurumist ja võimaldab samal ajal gaasivahetust mulla ja atmosfääri vahel. Kaane läbipaistvus on vajalik valguse läbilaskmiseks.
10. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:
 - kuivatuskapp;
 - stereomikroskoop;
 - pH-meeter ja fotomeeter;
 - sobiv täpne kaal;
 - sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;
 - sobivad niiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);
 - inkubaator või väike kliimaseadmega ruum;
 - pintsetid, konksud või aasad;
 - ilmutusvann.

Kunstliku mulla valmistamine

11. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda (5, 7), mille koostis on järgmine (kuivmassi põhjal pärast kuumutamist 105 °C juures, kuni mass enam ei muutu):
 - 10 % turbasamblaturvast, mis on õhu käes kuivatatud ja peeneks jahvatatud (osakeste suurus võib olla 2 ± 1 mm); enne katse tegemist soovitatakse kontrollida, kas värskest turbapartiist valmistatud pinnas sobib valgeliimuka kasvatamiseks;
 - 20 % kaoliinsavi (soovitav kaoliniidisisaldus üle 30 %);

- umbes 0,3–1,0 % kaltsiumkarbonaati (CaCO_3 , pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH väärtus $6,0 \pm 0,5$; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda eelkõige turba kvaliteedist ja omadustest;
- umbes 70 % kvartsiiva (sõltuvalt vajalikust CaCO_3 kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit.

Enne kunstliku mulla kasutamist lõplikus katses on soovitatav veenduda selle sobivuses valgeliimuka kasvatamiseks ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide saavutamiseks. Sellist kontrollimist soovitatakse eelkõige selleks, et oleks võimalik veenduda, et katsetulemused ei halvene, kui orgaanilise süsiniku sisaldus kunstlikus mullas on väiksem, näiteks kui turbasisaldust vähendatakse 4–5 protsendini ja liivasisaldust vastavalt suurendatakse. Orgaanilise süsiniku sisalduse sellise vähendamise tulemusena võib väheneda mulla (orgaanilise süsiniku) võime uuritavat kemikaali adsorbeerida ning kemikaali saadavus ussidele võib suurened. On tõendatud, et *Enchytraeus albidus*'e puhul on sigivust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, kui katse tehakse põllumullas, milles orgaanilise süsiniku sisaldus on väiksem (näiteks 2,7 %) (15), ning seniste piiratud kogemuste põhjal on võimalik seda saavutada ka kunstlikus mullas, mille turbasisaldus on 5 %.

Märkus: kui tehakse lisakatseid (nt kõrgema tasandi katseid) loodusliku mullaga, tuleks tõendada ka sellise mulla sobivust ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täidetavust.

12. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis). Seda tuleks teha vähemalt üks nädal enne katse alustamist. Segatud muld tuleks kaheks päevaks seisma jätta, et happesus stabiliseeruks. Mulla pH mõõtmiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahuse segu suhtega 1:5 (vt allikas 16 ja 3. liide). Kui mulla happesus on suurem kui nõutavasse vahemikku jäävad väärtused (vt punkt 11), võib selle reguleerimiseks lisada sobiva koguse CaCO_3 . Kui muld on liiga leeliseline, võib happesuse suurendamiseks lisada punktis 11 osutatud segu, millest on välja jäetud CaCO_3 .
13. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites kirjeldatud meetodile. Üks kuni kaks päeva enne katse alustamist eelneisutatakse kuiva kunstlikku mulda piisava koguse deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Katse alguses jagatakse eelneisutatud muld nii mitmeks osaks, kui palju on kasutatavatele uuritava kemikaali kontsentratsioonidele vastavaid (ja vajaduse korral võrdluskemikaaliga) katserühmi ja kontrollrühmi. Niiskusesisaldus viiakse 40–60 protsendini maksimaalsest veemahutavusest, lisades uuritava kemikaali lahust ja/või destilleeritud või deioniseeritud vett (vt punktid 19–21). Niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus (kuivatades mulda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu) ning see peaks jääma usside ellujäämiseks optimaalsesse vahemikku. Mulla niiskusesisalduse ligikaudseks kontrollimiseks võib mulda õrnalt peos pigistada: sobiva niiskusesisalduse korral peaksid sõrmede vahele ilmuma väikesed veetilgad.

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

14. Soovitatav katseliik on sugukonda *Enchytraeidae* (alamklass *Oligochaeta*, hõimkond *Annelida*) kuuluv harilik valgeliimukas (*Enchytraeus albidus* Henle, 1837). *E. albidus* on üks suuremaid valgeliimuklaste liike ning selle liigi isendite pikkuseks on mõõdetud kuni 35 mm (17, 18). *E. albidus* on ülemaailmse levikuga liik, keda leidub nii meres, mageveekogudes kui ka maismaa elupaikades, peamiselt lagunevas orgaanilises aines (merevetikad, kompost) ja harva ka niitudel (9). Selle liigi taluvus eri ökoloogiliste tingimuste suhtes ja teatav morfoloogiline varieeruvus võivad osutada eri liigisestest rühmade olemasolule.
15. *E. albidus* on turul kättesaadav kalasöödana. Tuleks kontrollida, kas kultuur on saastunud muude, tavaliselt väiksemate liikidega (1, 19). Saastumise korral tuleks kõiki usse Petri tassis veega pesta. Seejärel tuleks uue kultuuri loomiseks valida stereomikroskoobi abil välja *E. albidus*'e suured täiskasvanud isendid ja kõik muud ussid kõrvaldada. *E. albidus*'t saab hõlpsalt kasvatada paljudes eri orgaanilistes materjalides (vt 4. liide). *E. albidus*'e elutsüklil on lühike, kuna suguküpsuse saavutamiseks kulub 33 päeva (18 °C juures) kuni 74 päeva (12 °C juures) (1). Katses kasutatakse üksnes kultuure, mida on kasvatatud laboris probleemideta vähemalt 5 nädalat (ühe põlvkonna vältel).

16. Sobivad ka muud perekonna *Enchytraeus* liigid, näiteks *E. buchholzi* (Vejdovský, 1879) või *E. crypticus* (Westheide & Graefe, 1992) (vt 5. liide). Muude perekonna *Enchytraeus* liikide kasutamise korral tuleb selgelt märkida asjaomane liik ja esitada selle valimise põhjendus.
17. Katses kasutatakse täiskasvanud usse. Neil peaksid olema vöö piirkonnas näha munad (valged laigud) ja nad peaksid olema umbes ühesuurused (ligikaudu 1 cm pikkused). Kasvatatava kultuuri sünkroonimine ei ole vajalik.
18. Kui valgeliimuklasi ei kasvatata sama tüüpi mullas ja samades tingimustes (sh söötmingimused), mida kasutatakse lõplikus katses, tuleb neil lasta kohaneda vähemalt 24 tundi ja kuni kolm päeva. Algselt tuleks lasta kohaneda suuremal arvil täiskasvanud isenditel, kui on vaja katse tegemiseks, et luua varu vigastatud või muul põhjusel sobimatute isendite kõrvaldamiseks. Kohanemisperioodi lõpus valitakse katse jaoks välja üksnes munadega ussid, kelle käitumises ei täheldata kõrvalekaldeid (nt püüdu mullast lahkuda). Ussid eemaldatakse ettevaatlikult juveliiripintsettide, konksu või aasa abil ja viiakse Petri tassi, mis sisaldab väikeses koguses magedat vett. Soovitatakse kasutada käesoleva lisa peatükis C.20 („Hiidkiivriku (*Daphnia magna*) sigivuse katse”) osutatud taastatud magedat vett, kuna deioniseeritud, demineraliseeritud või kraanivesi võib olla ussidele kahjulik. Usse kontrollitakse stereomikroskoobi all ja kõik munadeta ussid kõrvaldatakse. Jälgitakse hoolikalt, et kõik kultuuri nakatada võivad lestad ja hooghännalised saaksid eemaldatud ja kõrvaldatud. Terved ussid, keda katses ei kasutata, viiakse tagasi tüvikultuuri.

Katsekonsentratsiooniga segude valmistamine

Vees lahustuv uuritav kemikaal

19. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse deioniseeritud vee sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekonsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Soovitatakse kasutada sobivas koguses vett, et saavutada nõutav niiskusesisaldus, st 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest (vt punkt 13). Enne katsenõusse viimist segatakse uuritava kemikaali iga lahus põhjalikult ühe partii eelneisutatud mullaga.

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

20. Vees lahustumatu, kuid orgaanilises lahustis lahustuva kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas kandeaines (nt atsetoonis). Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kandeaine pihustatakse väikesele kogusele, näiteks 2,5 grammile peenele kvartslüivale või segatakse sellega. Kandeaine kõrvaldatakse vähemalt üks tund kestva tõmbekapis aurustamise teel. Kvartslüiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelneisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu viiakse katsenõudesse.
21. Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuva kemikaali puhul segatakse soovitava katsekonsentratsiooni saavutamiseks vajalik kogus uuritavat kemikaali sellise koguse peeneks jahvatatud kvartslüivaga, mis vastab 2,5 grammile katsenõu kohta. Kõnealune kvartslüiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelneisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Kirjeldatud toiminguid korratakse iga katsekonsentratsiooni puhul ning valmistatakse ka sobiv kontrollsegu.
22. Kemikaale ei tohiks üldjuhul testida suuremal kontsentratsioonil kui 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Mõne konkreetse katse eesmärkide saavutamiseks võib suurema kontsentratsiooni kasutamine siiski vajalik olla.

KATSE KÄIK

Katse- ja kontrollrühmad

23. Iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul viiakse katsenõusse 20 grammile kuivmassile vastav kogus katsemuld (vt punktid 19–21). Valmistatakse ka uuritava kemikaalita kontrollsegud. Igasse nõusse lisatakse sööt punktis 29 kirjeldatud viisil. Igasse katsenõusse viiakse juhuvaliku alusel 10 ussi. Ussid pannakse näiteks

juveliiripintsette, konksu või aasa kasutades ettevaatlikult igasse katsenõusse mullapinnale. Paralleelnõude arv iga katses kasutatava kontsentratsiooni puhul ja kontrollrühmades sõltub kasutatavast katseplaanist (vt punkt 34). Katsenõud paigutatakse inkubaatorisse juhuslikult ja nende paigutust muudetakse juhuslikkuse alusel igal nädalal.

24. Kui uuritava kemikaaliga töötlemiseks kasutatakse kandeainet, tuleks moodustada lisaks katserühmadele üks kontrollrühm, kus kasutatakse kvartsliaa, millega on segatud või millele on pihustatud lahustit. Asjaomase lahusti või dispergeeriva aine kontsentratsioon peaks olema sama kui uuritavat kemikaali sisaldavates katsenõudes. Kemikaalide puhul, millega töötlemisel on vaja järgida punktis 21 kirjeldatud korda, tuleks moodustada kontrollrühm, kus kasutatakse täiendavalt kvartsliaa (2,5 g nõu kohta).

Katsetingimused

25. Katsetemperatuur on 20 ± 2 °C. Et hoida ära usside põgenemist mullast, kasutatakse katses kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude inkubeerimisalal valgustustihedus 400–800 luksit.
26. Mulla niiskusesisalduse kontrollimiseks kaalutakse katsenõusid katse alguses ja seejärel kord nädalas. Kaalu vähenemist kompenseeritakse sobiva koguse deioniseeritud vee lisamisega. Tuleks tähele panna, et weekadu on võimalik vähendada, hoides inkubaatoris kõrget õhuniiskuse taset (> 80 %).
27. Niiskusesisaldust ja pH-d tuleks mõõta nii kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kui ka lõpliku katse alguses ja lõpus. Mõõtmiste tegemiseks tuleks kasutada kemikaaliga igal kontsentratsioonil töödeldud mullaproove ja kontrollproove, mis on valmistatud ja mida inkubeeritakse samal viisil kui katsekultuure, kuid mis ei sisalda usse. Nendesse mullaproovidesse tuleks sööta lisada üksnes katse alguses, et soodustada mikroobide elutegevust. Lisatava sööda kogus peaks olema sama kui katsekultuuridesse lisatav kogus. Nendesse nõudesse ei ole vaja katse vältel enam sööta juurde lisada.

Söötmine

28. Võib kasutada sööta, mille puhul on tagatud valgeliimuklaste populatsiooni säilimine. On kindlaks tehtud, et söödamaterjalina on sobiv kasutada valtsitud kaera, mis on soovitatav mikroobidega saastumise ärahoidmiseks enne kasutamist autoklaavida (sobib ka kuumutamine).
29. Sööda esmakordseks lisamiseks segatakse 50 mg jahvatatud valtsitud kaera igas nõus mullaga enne usside lisamist. Seejärel lisatakse sööta igal nädalal kuni 21. katsepäevani. Sööta ei lisata 28. katsepäeval, kuna selleks ajaks on täiskasvanud ussid juba eemaldatud ja noored ussid vajavad pärast seda suhteliselt vähe lisatoitu. Katse ajal lisatakse söödana 25 mg jahvatatud valtsitud kaera nõu kohta, pannes need ettevaatlikult mullapinnale, et usse mitte vigastada. Seente kasvu pärssimiseks tuleks kaerahelbed mulla sisse viia, kattes need väikese koguse mullaga. Kui sööt jäetakse söömata, tuleks söödakogust vähendada.

Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse plaan

30. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, milles kasutatakse näiteks viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni: 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Iga katserühma ja kontrollrühma puhul piisab ühest nõust.
31. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on kaks nädalat. Katse lõpus hinnatakse usside suremust. Uss loetakse surnuks, kui ta ei reageeri esiotsa mehaanilisele ärritamisele. Lõplikus katses kasutamiseks sobiva kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramiseks võib olla kasu ka muust teabest peale suremuse. Seepärast tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Viimaste kindlakstegemiseks võib kasutada 6. liites kirjeldatud värvimismeetodit.

32. LC_{50} ligikaudseks määramiseks võib arvutada suremuse määra geomeetrilise keskvaartuse. Lõplikus katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel eeldatakse, et mõju sigivusele avaldub kuni 10 korda väiksemal kontsentratsioonil kui LC_{50} . See suhe on siiski katseliselt leitud ja võib igal konkreetsel juhul olla erinev. Lõplikus katses kasutatavat uuritava kemikaali kontsentratsioonide vahemikku võivad aidata kindlaks määrata ka muud kontsentratsioonivahemiku leidmise katses tehtud tähelepanekud, näiteks noorloomade esinemine.
33. LC_{50} täpseks määramiseks soovitatakse kasutada katses vähemalt nelja paralleelnõu uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni kohta ja piisavat arvu eri kontsentratsioone, et saada vähemalt neli statistiliselt oluliselt erinevat vastuse keskvaartust. Vajaduse korral kasutatakse kontrollrühmade puhul sarnast arvu kontsentratsioone ja paralleelnõusid.

Lõpliku sigivuskatse plaan

34. Võrdlusuuringu (2) alusel välja töötatud soovitustest lähtuvalt pakutakse välja kolm katseplaani.
- Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.
 - EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) määramiseks tuleks katses kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x väärtust, et võimaldada määrata EC_x interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel. Soovitatakse kasutada vähemalt nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja nelja paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.
 - Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni kui ka EC_x . Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.
35. Tuleks kasutada 10 täiskasvanud ussi katsenõu kohta (vt punkt 23). Sööta lisatakse katsenõudesse katse alguses ja seejärel kord nädalas (vt punkt 29) kuni 21. katsepäeva lõpuni. Kahekümne esimesel katsepäeval vaadatakse mullaproovid käsitsi hoolikalt läbi ning elusad täiskasvanud ussid loendatakse, neid vaadeldakse ja registreeritakse muutused nende käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine). Seejärel eemaldatakse kõik täiskasvanud ussid katsenõudest ja katsemullast. Katsemulda koos kõikide selles sisalduvate moodustatud kookonitega inkubeeritakse veel kolm nädalat samades katsetingimustes; ainsa erinevusena lisatakse sööta (st 25 mg jahvatatud valtsitud kaera nõu kohta) üksnes 35. katsepäeval.
36. Kuue nädala möödudes loendatakse katse vältel koorunud ussid. Soovitatakse kasutada bengali punasega värvimisel põhinevat meetodit (vt 6. liide), kuid sobivaks on osutunud ka muud vedelikuga (kuid mitte kuumusega) ekstraheerimise ja vedelikupinnale toomise meetodid (vt 6. liide) (4, 10, 11, 20). Bengali punasega värvimist soovitatakse kasutada seepärast, et mullasubstraadist vedelikuga ekstraheerimise puhul võib segavaks teguriks olla suspendeeritud saviosakeste põhjustatud hägusus.

Piirsalduskatse

37. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheldata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg/kg) mingit mõju, võib sigivuskatse teha piirsalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg/kg, et tõendada, et täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon on sigivuse puhul sellest väärtusest suurem.

Katse lühikirjeldus ja ajakava

38. Katse etapid võib kokku võtta järgmiselt.

Aeg	Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse	Lõplik katse
7 päeva enne katset või varem	— Valmistatakse kunstlik muld (segatakse kokku kuivad koostisosad)	— Valmistatakse kunstlik muld (segatakse kokku kuivad koostisosad)
5 päeva enne katset	— Kontrollitakse kunstliku mulla pH-d — Mõõdetakse mulla maksimaalne vee-mahutavus	— Kontrollitakse kunstliku mulla pH-d — Mõõdetakse mulla maksimaalne vee-mahutavus
5 kuni 3 päeva enne katset	— Valitakse välja ussid katsetingimustega kohandamiseks	— Valitakse välja ussid katsetingimustega kohandamiseks
3 kuni 0 päeva enne katset	— Ussidel lastakse vähemalt 24 tundi kohaneda	— Ussidel lastakse vähemalt 24 tundi kohaneda
1 päev enne katset	— Kunstlik muld eelniisutatakse ja jagatakse partiideks	— Kunstlik muld eelniisutatakse ja jagatakse partiideks
Katse alustamise päev (0-päev)	— Valmistatakse põhilahused — Töödeldakse uuritava kemikaaliga — Kaalutud kogus katsesubstraati viiakse katsenõudesse — Lisatakse sööt — Lisatakse ussid — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus	— Valmistatakse põhilahused — Töödeldakse uuritava kemikaaliga — Kaalutud kogus katsesubstraati viiakse katsenõudesse — Lisatakse sööt — Lisatakse ussid — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus
7. päev	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
14. päev	— Määratakse täiskasvanud usside suremus — Määratakse noorloomade hinnanguline arv — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus	— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
21. päev		— Jälgitakse täiskasvanud usside käitumist — Eemaldatakse täiskasvanud ussid — Määratakse täiskasvanud usside suremus — Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
28. päev		— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Sööta ei lisata

Aeg	Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse	Lõplik katse
35. päev		— Kontrollitakse mulla niiskusesisaldust — Lisatakse sööta
42. päev		— Loendatakse noorloomad — Mõõdetakse mulla pH ja niiskusesisaldus

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

39. Käesolevas katsemeetodis ei anta lõplikke juhiseid katsetulemuste statistilise analüüsi kohta; 7. liites on siiski esitatud asjakohane ülevaade.
40. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katses on peamine lõppnäitaja suremus. Siiski tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Üldjuhul tuleks kasutada LC_{50} leidmiseks probitanalüüsi (21) või logistilist regressiooni. Selle analüüsimeetodi sobimatuse korral (nt kui andmed hõlmavad vähem kui kolme kontsentratsiooni, mille puhul täheldatakse osalist suremust) võib kasutada mõnda alternatiivset meetodit. Kõnealuse meetodina võib muu hulgas kasutada libiseva keskmise meetodit (22), kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (23) või lihtsat interpoleerimist (nt LC_0 ja LC_{100} geomeetrilist keskmist, mis on saadud LC_0 ja LC_{100} korrutisest ruutjuure võtmise teel).
41. Lõplikus katses on lõppnäitaja sigivus (st sigitunud noorloomade arv). Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokollis siiski märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud. Statistilise analüüsi käigus on vaja arvutada sigivuse aritmeetiline keskmine ja standardhälve igas katse- ja kontrollrühmas.
42. Dispersioonanalüüsi tegemise korral võib standardhälbe s ja selle vabadusastmete arvu df asendada vastavalt dispersioonanalüüsi (ANOVA) tulemusena leitud hajuvuse hinnangulise koondmäära ja selle vabadusastmete arvuga, eeldusel, et hajuvus ei sõltu kontsentratsioonist. Sellisel juhul kasutatakse kontroll- ja katserühmade puhul ühte hajuvuse väärtust. Kõnealused väärtused arvutatakse tavaliselt müügiloleva statistilise analüüsi programmi abil, kasutades paralleelidena igas eraldi nõus saadud tulemusi. Kui ilmneb, et negatiivse kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete koondamine on mõistlikum kui võrdlemine ühe nimetatud kontrolliga, tuleks veenduda, et asjaomased andmed ei ole oluliselt erinevad (selleks sobivatele meetoditele osutatakse punktis 45 ja 7. liites).
43. Edasine statistiline analüüs ja järeldused sõltuvad sellest, kas paralleelnõudes saadud väärtused on normaaljaotusega ja kas nende hajuvus on homogeenne.

Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamine

44. Soovitavalt tuleks kasutada suure võimsusega meetodit. Et hinnata andmete jaotuse ligikaudset vastavust normaaljaotusele, tuleks kasutada varasemal kogemusel, näiteks võrdlusuuringu andmetel või muudel varasematel andmetel põhinevat teavet. Hajuvuse homogeenus (homoskedastiivsus) on suurema tähtsusega. Kogemusest nähtub, et hajuvus suureneb sageli keskvärtuse suurenedes. Sellisel juhul võib homoskedastiivsus saavutamiseks olla kasu andmete teisendamise. Kõnealuse teisendamise puhul tuleks siiski lähtuda varasematel andmetel põhinevast kogemusest, mitte analüüsitavatest andmetest. Homogeensete andmete puhul tuleks kasutada mitmest t-testi, näiteks Williamsi testi ($\alpha = 0,05$; ühepoolne) (24, 25) või teatavatel juhtudel Dunnetti testi (26, 27). Tuleks tähele panna, et paralleelnõude andmete ebavõrdse hajuvuse korral tuleb tabelis esitatud t-väärtusi Dunnetti ja Williamsi kirjeldatud viisil korrigeerida. Mõnikord ei suurene/vähene saadud väärtused suurest varieeruvusest tingituna korrapäraselt. Sellise suure monotoonsusest kõrvalekaldumise puhul on asjakohasem kasutada Dunnetti testi. Homoskedastiivsusest kõrvalekaldumise puhul võib olla mõistlik hinnata võimalikku mõju hajuvusele lähemalt, et oleks võimalik otsustada, kas asjaomaseid t-teste saab kasutada

võimsust oluliselt kaotamata (28). Teise võimalusena võib kasutada mitmest U-testi, näiteks Bonferroni U-testi vastavalt Holmile (29), või heteroskedastiivsete andmete puhul, mis muidu vastavad üldisele monotoonsele kontsentratsioonist sõltuvusele, mõnda muud mitteparameetrilist (nt Jonckheere'i-Terpstra (30, 31) või Shirley (32, 33)) testi; sellist testi tuleks üldjuhul eelistada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testile (vt ka skeem, 7. liide).

45. Kui on tehtud piirsalduskatse ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeenus) on täidetud, võib kasutada paariviisilist Studenti t-testi või ka Manni-Whitney U-testi (29).

EC_x leidmine

46. Mis tahes EC_x väärtuse arvutamiseks regressioonanalüüsi (lineaarse või mittelineaarse regressiooni) teel kasutatakse katserühmade andmete keskväärtusi, mille alusel leitakse kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust kirjeldav sobiv funktsioon. Pideva tunnusega vaadeldava kasvuhulga puhul võib EC_x väärtuste leidmiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (35). Binaarsete andmete (suremus/elulemus) ja sigitatud järglaste arvu puhul sobivad funktsioonid on muu hulgas normaaljaotuse sigmoidfunktsioon, logistiline funktsioon ja Weibulli funktsioon, mis hõlmavad kahte kuni nelja parameetrit ja millest mõni sobib ka hormeetilise mõju modelleerimiseks. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava funktsiooni leidmiseks kasutatakse lineaarset regressiooni, tuleks enne EC_x määramist veenduda regressioonanalüüsi teel r² (määratusekordaja) ja/või tõusu väärtuse olulisuses; EC_x arvutamiseks sisestatakse regressioonanalüüsi tulemusena saadud võrrandisse väärtus, mis vastab x protsendile kontrollrühma keskväärtusest. Usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse vastavalt Fiellerile (viidanud Finney (21)) või mõne muu sobiva kaasaegse meetodi abil.
47. Teise võimalusena väljendatakse mõju protsentuaalse või lihtosakaaluna mudeli parameetrimisega käsitatavast kontrollrühma näitaja keskväärtusest. Sellisel juhul on normaaljaotusele vastava (logistilise, Weibulli) sigmoidse kõvera lähendamiseks andmetele sageli võimalik hõlpsalt kasutada probitanalüüsil põhinevat regressiooni-meetodit (21). Kõnealusel juhul tuleb kaalufunktsiooni kohandada arvulise tunnuse analüüsimiseks, nagu on kirjeldanud Christensen (36). Hormeesi ilmnemisel tuleks probitanalüüsi asemel siiski rakendada neljaparameetrilist logistilist või Weibulli funktsiooni, kasutades lähendamiseks mittelineaarset regressiooni (36). Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava sobiva funktsiooni lähendamine andmetele ei ole võimalik, võib EC_x hinnangulise väärtuse ja asjaomaste usalduspiiride määramiseks kasutada muud meetodit, näiteks libseva keskmise meetodit vastavalt Thompsonile (22) või kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (23).

KATSEPROTOKOLL

48. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline iseloomustus ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (nt lahustuvus vees, aururõhk);
- uuritava kemikaali identifitseerimisandmed vastavalt IUPACi nomenklatuurile, kemikaali CASi number, partii, struktuurivalem ja puhtus;
- proovi kõlblikkusaja lõppkuupäev.

Katseliik:

- kasutatud katseloomad: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused.

Katsetingimused:

- kunstliku mulla koostisosad ja valmistamine;
- uuritava kemikaaliga töötlemise meetod;
- katsetingimuste kirjeldus, sealhulgas temperatuur, niiskusesisaldus, pH jne;
- katseplaani ja katse läbiviimise täielik kirjeldus.

Katsetulemused:

- täiskasvanud usside suremus kaks nädalat pärast kontsentratsioonivahemiku leidmise katse alustamist ja noorloomade arv katse lõpus;
- täiskasvanud usside suremus kolm nädalat pärast lõpliku katse alustamist ja täielikud andmed noorloomade kohta katse lõpus;
- katseorganismidel täheldatavad mis tahes füüsilised või patoloogilised sümptomid ja käitumuslikud muutused;
- vastavalt vajadusele LC_{50} , sigivuse puhul määratud täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või EC_x (nt EC_{50} , EC_{10}) koos usaldusvahemikuga ning graafik asjaomase näitaja arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, samuti kõik tulemuste tõlgendamist hõlbustavad andmed ja tähelepanekud.

Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatavad ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

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

- (17) Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, lk 1–13.
 - (18) Nielsen, C. O., ja Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8–9, lk 1–160.
 - (19) Bouguenec, V., ja Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. *Ann. Limnol.* 23: 9–22.
 - (20) Korinkova, J., ja Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting. *Vestník Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, lk 300–305.
 - (21) Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis* (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.
 - (22) Finney, D. J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
 - (23) 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.
 - (24) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.
 - (25) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.
 - (26) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.
 - (27) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
 - (28) van der Hoeven, N. (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355–361.
 - (29) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6: 65–70.
 - (30) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41: 133–145.
 - (31) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking. *Indagat. Math.* 14: 327–333.
 - (32) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies. *Appl. Stat.* 28: 144–151.
 - (33) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control. *Biometrics* 42: 183–186.
 - (34) Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.
 - (35) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res.* 18: 213–221.
 - (36) Van Ewijk, P. H., ja Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Safe.* 25: 25–32.
-

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on x % kontrollrühma asjaomase näitaja väärtusest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC₀ (kontsentratsioon, mille puhul surmav mõju puudub) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal ei surma teatava aja jooksul ühtki kemikaaliga kokku puutunud katseorganismi. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC₅₀ (kontsentratsioon, mille puhul sureb pool katseorganismidest) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 50 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC₅₀ uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC₁₀₀ (kontsentratsioon, mille puhul surevad kõik katseorganismid) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 100 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC₁₀₀ uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väikseim kontsentratsioon, mille juures täheldatakse statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta. Kõikidel sellisest kontsentratsioonist suurematel katsekontsentratsioonidel peaks üldjuhul täheldatama kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju. Kõnealuse kontsentratsiooni määramisega seotud mis tahes kõrvalekaldeid eespool esitatud määratlusest tuleb katseprotokollis põhjendada.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Sigivuse määr – katseperioodi jooksul sigitatud noorloomade keskmine arv teatava arvu täiskasvanud usside kohta.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

Maksimaalse veemahutavuse määramine**Kunstliku mulla veemahutavuse määramine**

On leitud, et veemahutavuse määramiseks sobib järgmine meetod. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 C lisas.

Sobiva seadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga ja pärast veega täitmist pannakse toru resti peale veevanni. Toru tuleks vette lasta vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartslüüva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{Veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühi mass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

VIIIDE

Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

—

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mullaproovi pH määramiseks põhineb standardis ISO 10390 („Soil Quality – Determination of pH”) esitatud kirjeldusel.

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit. Pärast loksutamist lastakse suspensioonil settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kalibreeritakse enne iga mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

VIIDE

Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

4. liide

Perekonna *Enchytraeus* liikide kultiveerimistingimused

Liigi *Enchytraeus albidus* (ja muude perekonna *Enchytraeus* liikide) valgeliimukaid võib kasvatada suurtes plastkarpides (nt mõõtmetega 30 × 60 × 10 cm), mis on täidetud mullaseguga, milles kunstliku mulla ja loodusliku saastumata aiamalla vahekord on 1:1. Tuleks hoiduda komposti kasutamisest, kuna see võib sisaldada mürgiseid kemikaale, näiteks raskmetalle. Enne mulla kasutamist tuleks sellest eemaldada fauna (nt sügavkülmutamise teel). Võib kasutada ka üksnes kunstlikust mullast koosnevat substraati, kuid sel juhul võib sigivuse määr olla väiksem kui segatud mullasubstraadi puhul. Kultiveerimiseks kasutatava substraadi pH peaks olema $6,0 \pm 0,5$.

Kultuuri hoitakse pimedas temperatuuril 15 kuni 20 °C ± 2 °C. Tuleks hoiduda kasutamast kõrgemat temperatuuri kui 23 °C. Mulda tuleks hoida niiskena, kuid see ei tohiks olla märg. Muld on sobiva niiskusesisaldusega, kui mulda õrnalt peos pigistades ilmuvad sõrmede vahele väikesed veetilgad. Hapnikuvaeguse ärahoidmiseks tuleb tagada, et kultiveerimisnõu kaas võimaldaks piisavat gaasivahetust atmosfääriga. Mulda tuleks aereerituse tagamiseks igal nädalal hoolikalt kobestada.

Usse võib sööta valtsitud kaeraga. Kaera tuleks hoida suletud nõudes ning enne kasutamist tuleks seda autoklaavida või kuumutada, et takistada saastumist aidalestadega (näiteks *Glyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) või röövlestadega (näiteks *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Pärast kuumtötlust tuleks sööt jahvatada, et seda oleks lihtne mullapinnale puistata. Aeg-ajalt võib peale valtsitud kaera lisada ka vitamiine, piima ja tursamaksaõli. Muu sobiv sööt on pagaripärm ja kalasööt TetraMin.

Usse söödetakse umbes kaks korda nädalas. Sobiv kogus valtsitud kaera puistatakse mullapinnale või segatakse ettevaatlikult substraadiga mulla aereerituse tagamiseks tehtava kobestamise käigus. Lisatava sööda absoluutkogus sõltub substraadis olevate usside arvust. Üldiselt tuleks söödakogust suurendada, kui kogu lisatav sööt tarbitakse ära ühe ööpäeva jooksul. Kui aga järgmise söötamise ajal (üks nädal hiljem) on mullapinnal veel sööta alles, tuleks söödakogust vähendada. Seentega saastunud sööt tuleks kõrvaldada ja uuega asendada. Kolme kuu möödudes tuleks ussid viia üle värskest valmistatud substraati.

Kultiveerimistingimused loetakse rahuldavaks, kui: a) ussid ei püüa mullasubstraadist lahkuda, b) nad liiguvad mullas kiiresti, c) nende nahapind on läikiv ja sellele ei kleepu mullaosakesed, d) nad on enam-vähem valkja värvusega, e) neid leidub kultuurides mitmes eri vanuserühmas ning f) nad sigivad pidevalt.

5. liide

Katse käik muude perekonna *Enchytraeus* liikide puhul**Liigi valimine**

E. albidus'e asemel võib kasutada mõnda muud liiki, kuid sel juhul tuleks katse käiku ja nõuetekohasuse kriteeriume vastavalt kohandada. Kuna paljud perekonna *Enchytraeus* liigid on hõlpsalt kättesaadavad ja neid on võimalik laboris rahuldavalt kasvatada, siis on *E. albidus*'e asemel mõne muu liigi valimisel kõige olulisem kriteerium ökoloogiline olulisus ja lisaks sellele ka võrreldav tundlikkus. Katses kasutatava liigi muutmisel võivad olla ka ametlikud põhjused. Näiteks on riikides, kus *E. albidus*'t ei esine ja kuhu seda ei saa importida (nt karantiiniga seotud piirangute tõttu), vaja kasutada mõnda muud perekonna *Enchytraeus* liiki.

Sobivate alternatiivsete liikide näited

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992): seda liiki on viimastel aastatel ökotoksikoloogilistes uuringutes sageli kasutatud, kuna selle esindajaid on lihtne kasvatada ja katsetes kasutada. Selle liigi ussid on siiski väikesed ja seepärast on nende käitlemine *E. albidus*'ega võrreldes keerukam (eriti värvimismeetodi kasutamisele eelnevates etappides). *E. crypticus*'e leidumist looduses ei ole veel kindlalt tuvastatud, seda on kirjeldatud üksnes vihmausside kultuurides. Seega ei ole liigi ökoloogilised vajadused teada.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovský, 1879): selle nimetusega tähistatakse tõenäoliselt rühma lähedasi liike, kelle morfoloogiline eristamine on raske. Selle rühma esindajaid ei soovitata katsetes kasutada enne, kui kasutatavaid isendeid on võimalik määrata liigi tasandil. *E. buchholzi*'t esineb tavaliselt niitudel ja häiritud kooslusega aladel, näiteks teepervedel.
- *Enchytraeus luxuriosus*: see liik oli algselt tuntud kui *E. minutus*, kuid seda on kirjeldatud alles hiljuti (1). Esmakordselt leidis selle liigi esindajaid U. Graefe (Hamburg) ühelt St. Peter-Ordingi (Schleswig-Holstein, Saksamaa) lähedal asuvalt niidult. *E. luxuriosus* on umbes poole väiksem kui *E. albidus*, kuid suurem kui muud siin kirjeldatud liigid; sel põhjusel võib sellest kujuneda hea alternatiiv *E. albidus*'ele.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen, 1963): siiani on teatatud selle liigi esinemisest Saksamaa ja Hispaania mineraalmuldades, kus see on levinud, kuid tavaliselt mitte väga arvukas. Selle perekonna teiste väikeste liikidega võrreldes on *E. bulbosus* suhteliselt hõlpsalt määratav. Selle liigi käitumise kohta laborikatsetes ja tundlikkuse kohta kemikaalide suhtes andmed puuduvad. On siiski leitud, et seda liiki on kerge kultiveerida (*E. Belotti*, isiklik suhtlus).

Kasvatustingimused

Perekonna *Enchytraeus* kõiki eespool nimetatud liike saab kultiveerida samades substraatides, mida kasutatakse *E. albidus*'e puhul. Kuna kõnealused liigid on väiksemad, võib kasutada väiksemaid kultiveerimisnõusid, ning ehkki kasutatav sööt võib olla sama, tuleb sööda kogust kohandada. Nende liikide elutsüklil on lühem kui *E. albidus*'el ja sööta tuleks lisada sagedamini.

Katsetingimused

Katsetingimused on üldiselt samad kui *E. albidus*'e puhul, välja arvatud järgmised aspektid:

- katsenõud võivad (kuid ei pruugi) olla väiksemad;
- sigivuskatse kestus võib (kuid ei pruugi) olla lühem, st kuue nädala asemel neli nädalat; kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestust ei tohiks aga muuta;
- noorloomade väiksusest tulenevalt soovitatakse tungivalt kasutada loendamiseks värvimismeetodit;
- katse nõuetekohasuse kriteeriumi, milles käsitletakse kontrollrühmas täheldatavat noorloomade arvu katsenõu kohta, tuleks muuta nii, et kõnealune nõutav arv oleks 50.

VIIDE

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

6. liide

Ekstraheerimismeetodite üksikasjalik kirjeldus**Bengali punasega värvimine**

See meetod töötati algselt välja limnoloogias (1) ja ettepaneku selle kasutuselevõtuks valgeliimuka noorloomade loendamiseks valgeliimuklaste sigivuse katses tegi esmakordselt W. de Coen (Ghenti Ülikool, Belgia). Sellest sõltumatult töötati Bilthovenis asuvas Hollandi Riiklikus Rahvatervise ja Keskkonnainstituudis (RIVM) välja meetodi modifikatsioon (bengali punase segamine formaldehüüdiga etanooli asemel) (2, 3).

Lõpliku katse lõpus (st kuue nädala möödudes) viiakse katsenõus olev muld madalasse nõusse. Selleks sobib Bellaplasti nõu või ribilise põhjaga ilmutusvann – viimane seepärast, et ribad piiravad usside liikumist vaateväljas. Noorloomad fikseeritakse etanooliga (umbes 5 ml paralleelnõu kohta). Seejärel lisatakse nõudesse vett, et tekiks 1–2 cm sügavune veekiht. Lisatakse paar tilka (200–300 µl) bengali punast (1 % lahus etanoolis) (võib kasutada ka 0,5 % eosiini) ja segatakse hoolikalt. 12 tunni pärast peaksid ussid olema värvunud punakaks ja neid peaks saama hõlpsalt loendada, kuna nad lebavad substraadi pinnal. Teise võimalusena võib substraadi ja alkoholi segu enne usside loendamist läbi sõela lasta (sõela ava läbimõõt 0,250 mm). Selle tulemusena uhitakse kaoliniit, turvas ja osa liiva välja ning punakaks värvunud usse on lihtsam näha ja loendada. Loendamist hõlbustab ka valgustusega suurendusklaasi kasutamine (klaasi mõõtmed vähemalt 100 × 75 mm ja suurendusvõime 2–3 korda).

Kõnealuse värvimismeetodiga väheneb loendamisaeg mõnele minutile nõu kohta ning ühel inimesel peaks olema võimalik lõpetada kõikide ühest katsesest pärit nõude analüüs maksimaalselt kahe päeva jooksul.

Vedelikuga ekstraheerimine

Vedelikuga ekstraheerimist tuleks alustada kohe pärast katse lõppemist. Igast katsenõust pärit muld tõstetakse plastsõelale, mille ava läbimõõt on umbes 1 mm. Sõelad pannakse plastkaussidesse rippuma nii, et sõel ei puuduta kausi põhja. Kausid täidetakse ettevaatlikult veega, kuni sõelatel olevad proovid jäävad täielikult vee alla. Et saada kätte üle 90 % mullas olevatest ussidest, tuleks neid ekstraheerida 3 päeva temperatuuril 20 ± 2 °C. Ekstraheerimisperioodi lõpus sõelad eemaldatakse ja vesi kallatakse aeglaselt ära, jättes alles vaid väikese koguse vett ning jälgides hoolikalt, et kausside põhjas olev sete jääks paigale. Seejärel loksutatakse plastkausse ettevaatlikult, et sete vees suspendeerida. Vesi viiakse Petri tassi ning pärast mullaosakeste settimist saab valgeliimukad tuvastada, pehmete teraspintsettidega eemaldada ja stereomikroskoobi abil loendada.

Vedelikupinnale toomine

Vedelikupinnale toomisel põhinevat meetodit on kirjeldanud oma märkuses R. Kuperman (4). Pärast katsenõu sisu fikseerimist etanooliga ujutatakse muld üle Ludoxiga (AM-30, kolloidse ränidioksiidi 30 massiprotsendiline suspensioon vees), nii et vedeliku tase jääb mullapinnast 10–15 mm kõrgemale. Pärast mulla põhjalikku segamist vedelikuga 2–3 minuti vältel saab pinnale kerkinud noored ussid hõlpsalt ära loendada.

VIITED

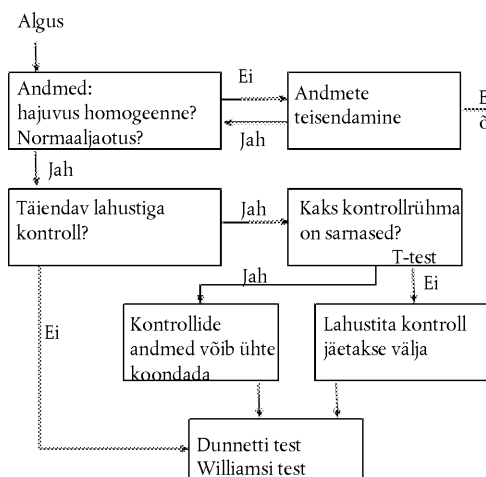
- (1) Korinkova, J., ja Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting. Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, lk 300–305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., ja Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus*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

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

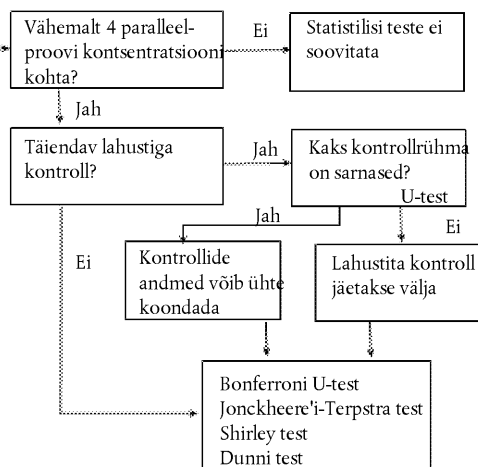
7. liide

Andmete statistilise analüüsi ülevaade (tähtsamat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramine)

Parameetriselised testid



Mitteparameetriselised testid



C.33. VIHMAUSSIDE (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*) SIGIVUSE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 222 (2004). Meetod on ette nähtud selleks, et hinnata pinnases esinevate kemikaalide mõju liikidesse *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) ja *Eisenia andrei* (Andre, 1963) kuuluvate vihmausside järglaste arvule (ja muudele uuritavatele subletaalsetele näitajatele) (1, 2). See katsemeetod on võrdlusuuringuga valideeritud (3). On olemas katsemeetod vihmaussidele avalduva ägeda mürgisuse hindamiseks (4). Samuti on avaldatud mitmed rahvusvahelised ja siseriiklikud suunised vihmaussidele avalduva ägeda ja kroonilise mürgisuse katsete kohta (5, 6, 7, 8).
2. Liike *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* käsitatakse mullafauna ja eelkõige vihmausside esindajatena. Taustteave vihmausside ökoloogia kohta ja nende kasutamise kohta ökotoksikoloogilistes katsetes on kättesaadav allikates 7, 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Täiskasvanud ussid viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides kas mullaga segatud või pestitsiidide puhul mulda viidud või mullapinnale kantud meetodil, mis on kooskõlas asjaomase kemikaali kasutusviisiga. Kemikaaliga töötlemise meetod sõltub katse eesmärgist. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik valitakse nii, et see hõlmaks kontsentratsioone, mille puhul kemikaal avaldab kaheksa nädala vältel nii subletaalset kui ka surmavat mõju. Täiskasvanud usside suremust ja mõju nende kasvule hinnatakse pärast 4 nädala pikkust kokkupuuteperioodi. Seejärel eemaldatakse täiskasvanud isendid mullast ja pärast veel 4 nädala möödumist tehakse kindlaks mõju sigivusele, loendades mullas leiduvad järglased. Uuritava kemikaaliga kokku puutunud usside sigivust võrreldakse sigivusega kontrollrühma(de)s, et teha kindlaks: i) täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon ja/või ii) EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}), kasutades regressioonimudelit sellise hinnangulise kontsentratsiooni leidmiseks, mille puhul sigivus väheneb x % võrra. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) väärtust, nii et EC_x leitakse interpoleerimise, mitte ekstrapoleerimise teel (mõisted on määratletud 1. liites).

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

4. Uuritava kemikaali kohta peaks sobivate katsetingimuste väljatöötamise hõlbustamiseks olema teada järgmised andmed:
 - lahustuvus vees;
 - $\log K_{ow}$;
 - aururõhk;
 - võimaluse korral teave kemikaali säilivuse ja omaduste kohta keskkonnas (nt fotolüüsi ja hüdrolüüsi kiirus, kui see on asjaomase töötlemisviisi puhul asjakohane).
5. Käesolevat katsemeetodit kasutatakse kõikide kemikaalide puhul, olenemata nende lahustuvusest vees. Meetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoefitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.
6. Käesolevas katsemeetodis ei võeta arvesse uuritava kemikaali võimalikku lagunemist katse kestel. Sellest tulenevalt ei saa eeldada, et kokkupuutekontsentratsioon jääb kogu katse vältel algele tasemele. Sellisel juhul on soovitatav teha uuritava kemikaali keemiline analüüs katse alguses ja lõpus.

VÕRDLUSKEMIKAAL

7. Tuleb määrata võrdluskemikaali EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, et tagada laboris kasutatavate katsetingimuste sobivus ja veenduda, et katseorganismide reaktsioon ei muutu aja jooksul statistiliselt olulisel määral. Võrdluskemikaaliga kontrollimist soovitatakse teha vähemalt kord aastas või kui katseid tehakse harvem, siis uuritava kemikaali mürgisuse määramisega samaaegselt. Sobivad võrdluskemikaalid, mille mõju sigivusele on tõendatud, on karbendasiim ja benomüül (3). Oluline mõju peaks olema täheldatav vahemikus a) 1–5 mg toimeainet kuivmassi kilogrammi kohta või b) 250–500 g/ha ehk 25–50 mg/m². Kui katseerias kasutatakse positiivse kontrollina mürgist võrdluskemikaali, kasutatakse ühte kontsentratsiooni ning asjaomaste paralleelnõude arv peaks olema sama kui kemikaalita kontrollrühmas.

KATSE NÕUETEKOHASUS

8. Katsetulemus loetakse nõuetekohaseks, kui kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:
- sigitatud noorloomade arv igas paralleelnõus, mis sisaldab 10 täiskasvanud isendit, on katse lõpuks ≥ 30 ;
 - sigivuse variatsioonikordaja on ≤ 30 %;
 - täiskasvanud usside suremus esimese 4 katsenädala jooksul on ≤ 10 %.

Kui katse ei vasta eespool nimetatud nõuetekohasuse kriteeriumidele, tuleks see lõpetada, välja arvatud juhul, kui katse jätkamist on võimalik põhjendada. Selline põhjendus tuleks esitada katseprotokollis.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Seadmed

9. Tuleks kasutada klaasist või muust keemiliselt inertest materjalist katsenõusid mahuga umbes 1–2 liitrit. Nõude põhjapindala peaks olema umbes 200 cm², nii et 500–600 grammise kuivmassiga substraadi lisamisel saavutatav niiske substraadi sügavus on umbes 5–6 cm. Nõu kaas peaks olema sellise ehitusega, mis võimaldab gaasivahetust substraadi ja atmosfääri vahel ning valguse juurdepääsu (nt läbipaistev augustatud kaas), kuid takistab samal ajal usside põgenemist. Kui katsesubstraadi kogus on oluliselt suurem kui 500–600 g katsenõu kohta, tuleks usside arvu samavõrra suurendada.
10. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:
- kuivatuskapp;
 - stereomikroskoop;
 - pH-meeter ja fotomeeter;
 - sobiv täpne kaal;
 - sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;
 - sobivad niiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);
 - inkubaator või väike kliimaseadmega ruum;
 - pintsetid, konksud või aasad;
 - veevann.

Kunstliku mulla valmistamine

11. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda (5, 7), mille koostis on järgmine (kuivmassi põhjal pärast kuumutamist 105 °C juures, kuni mass enam ei muutu):
- 10 % turbasamblaturvast (pH võimalikult lähedal väärtusele 5,5–6,0, nähtavate taimejäänusteta, peeneks jahvatatud, teadaoleva niiskusesisalduseni kuivatatud);
 - 20 % kaoliinsavi (soovitav kaoliinisisaldus üle 30 %);

- 0,3–1,0 % kaltsiumkarbonaati (CaCO_3 , pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH algväärtus $6,0 \pm 0,5$;
- 70 % kvartsiiva (sõltuvalt vajalikust CaCO_3 kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit.

Märkus 1: vajalik CaCO_3 kogus sõltub mullasubstraadi koostisosadest, sealhulgas söödast, ja tuleks mulla osaproovide mõõtmise teel kindlaks teha vahetult enne katset. pH-d kokkusegatud proovis mõõdetakse 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahuses (13).

Märkus 2: kunstliku mulla orgaanilise süsiniku sisaldust võib vähendada, vähendades näiteks turbasisaldust 4–5 protsendini ja suurendades vastavalt liivasisaldust. Orgaanilise süsiniku sisalduse sellise vähendamise tulemusena võib väheneda mulla (orgaanilise süsiniku) võime uuritavat kemikaali adsorbeerida ning kemikaali saadavus ussidele võib suureneada. On tõendatud, et *Eisenia fetida* puhul on sigivust käsitlevad nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, kui katse tehakse põllumullas, milles orgaanilise süsiniku sisaldus on väiksem (näiteks 2,7 %) (14), ning seniste kogemuste põhjal on võimalik seda saavutada ka kunstlikus mullas, mille turbasisaldus on 5 %. Seepärast ei ole enne sellise mulla kasutamist lõplikus katses vaja tõendada, et kõnealuse kunstliku mulla puhul on katse nõuetekohasuse kriteeriumid täidetavad, välja arvatud juhul, kui turbasisaldust vähendatakse eespool osutatust rohkem.

Märkus 3: kui tehakse lisakatseid (nt kõrgema tasandi katseid) loodusliku mullaga, tuleks tõendada ka sellise mulla sobivust ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täidetavust.

12. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis) hästi ventileeritavas kohas. Enne katse alustamist niisutatakse kuiva kunstlikku mulda piisava koguse deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % (50 ± 10 %) maksimaalsest veemahutavusest (vee suurim võimalik sisaldus osakaaluna kuivmassist). Nii saadakse substraat, milles ei täheldata vaba sidumata vett, kui seda peos pigistada. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites, standardis ISO 11274 (15) või sellega samaväärses ELI standardis kirjeldatud meetodile.
13. Kui uuritav kemikaal kantakse mullapinnale või segatakse mullaga ilma veeta, võib lisada kunstlikule mullale ülejäänud koguse vett mulla valmistamise ajal. Kui uuritava kemikaali segamisel mullaga kasutatakse teatud koguses vett, võib ülejäänud vee lisada koos uuritava kemikaaliga (vt punkt 19).
14. Mulla niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus vastavalt standardile ISO 11465 (16) või sellega samaväärsele ELI standardile ning mulla pH vastavalt 3. liitele, standardile ISO 10390 (13) või sellega samaväärsele ELI standardile. Kõnealuseks määramiseks tuleks kasutada kontrollmulla proovi ja igale katsekontsentratsioonile vastavat mullaproovi. Kui katses kasutatakse happelist või aluselist kemikaali, ei tohiks mulla pH-d muuta. Niiskusesisaldust tuleks jälgida kogu katse vältel, kaaludes nõusid korrapäraselt (vt punktid 26 ja 30).

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

15. Katses kasutatav liik on *Eisenia fetida* või *Eisenia andrei* (1, 2). Katse alustamiseks on vaja võõga täiskasvanud usse vanuses kaks kuud kuni üks aasta. Ussid tuleks valida sünkroonitud kultuurist, kus vanuseline struktuur on suhteliselt homogeenne (4. liide). Ühe katserühma isendite vanusevahe ei tohiks olla suurem kui 4 nädalat.
16. Valitud ussidel tuleks lasta vähemalt üks ööpäev kohaneda katses kasutatavaga sama tüüpi kunstlikus mullasubstraadis. Selle aja vältel tuleks ussidele anda sama sööta, mida kasutatakse katses (vt punktid 31–33).
17. Katse alguses tuleks kümnest ussist koosnevad rühmad ükshaaval ära kaaluda ja juhuslikkuse alusel katsenõudesse jaotada. Enne kaalumist pestakse usse deioniseeritud veega ja liigse vee eemaldamiseks asetatakse ussid lühikeseks ajaks filterpaberile. Iga ussi elusmass peaks jääma vahemikku 250–600 mg.

Katsekontsentratsiooniga segude valmistamine

18. Uuritava kemikaaliga töötlemiseks võib kasutada kahte meetodit: uuritava kemikaali segamine mullaga (vt punktid 19–21) või kemikaali kandmine mullapinnale (vt punktid 22–24). Sobiva meetodi valimisel lähtutakse katse eesmärgist. Üldjuhul soovitatakse uuritava kemikaali segamist mullaga. Siiski võib olla vaja kasutada töötlemismeetodit, mis on kooskõlas põllumajandustavaga (nt vedelal kujul pihustamine või pestitsiidi erivormide, näiteks graanulite või seemnepuhtimisvahendite kasutamine). Lahustid, mis hõlbustavad mulla töötlemist uuritava kemikaaliga, tuleks valida lähtuvalt nende vähesest mürgisusest vihmaussidele ning katseplaani tuleb lisada asjakohane lahustiga kontroll (vt punkt 27).

Uuritava kemikaali segamine mullaga*Vees lahustuv uuritav kemikaal*

19. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse vahetult enne katse algust deioniseeritud vees sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekontsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Katselahuse valmistamise hõlbustamiseks võib olla vaja kaaslahustit. On otstarbekas valmistada selline kogus lahust, mis on vajalik lõpliku niiskusesisalduse (40–60 % maksimaalsest veemahutavusest) saavutamiseks. Lahus segatakse põhjalikult mullasubstraadiga enne mulla viimist katsenõusse.

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

20. Uuritav kemikaal lahustatakse väikeses koguses sobivas orgaanilises lahustis (nt atsetoon) ning pihustatakse seejärel väikesele kogusele peenele kvartsiivale või segatakse sellega. Lahusti kõrvaldatakse vähemalt mõni minut kestva tõmbekapis aurustamise teel. Seejärel segatakse töödeldud liiv eelniisutatud kunstliku mullaga põhjalikult. Lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saavutada lõplik niiskusesisaldus 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest, ja segatakse see mullaga. Seejärel on muld katsenõudesse viimiseks valmis. Tuleks arvestada, et mõni lahusti võib olla vihmaussidele mürgine.

Vees ja orgaanilistes lahustites lahustumatu uuritav kemikaal

21. Valmistatakse segu, mis sisaldab 10 g peeneks jahvatatud tööstuslikku kvartsiiva ja sellises koguses uuritavat kemikaali, mis on vajalik katsekontsentratsiooni saavutamiseks mullas. Seejärel segatakse kõnealune segu eelniisutatud kunstliku mullaga põhjalikult. Lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saavutada lõplik niiskusesisaldus 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest, ja segatakse see mullaga. Seejärel on muld katsenõudesse viimiseks valmis.

Kemikaali kandmine mullapinnale

22. Mulda töödeldakse pärast usside lisamist. Esmalt täidetakse katsenõud niisutatud mullasubstraadiga ja eelnevalt kaalutud ussid asetatakse mullapinnale. Terved ussid kaevuvad tavaliselt kohe substraati ning seepärast loetakse kõik ussid, kes on 15 minuti pärast veel mullapinnal, kahjustatuks ja need tuleb asendada. Usside väljavahetamisel tuleks asendatavad ja uued ussid kaaluda, et kemikaaliga kokku puutuvate usside rühma summaarne eluskaal ja usse sisaldava nõu üldkaal katse alguses oleks teada.
23. Lisatakse uuritav kemikaal. Kemikaali ei tohiks lisada mullale usside lisamisele järgneva poole tunni jooksul (või kui usse leidub mullapinnal), et ei toimuks otsest nahakaudset kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kui uuritav kemikaal on pestitsiid, võib olla asjakohane kanda see mullapinnale pihustamise teel. Uuritav kemikaal tuleks mullapinnale kanda võimalikult ühtlaselt, kasutades sobivat laboratoorset pihustusseadet, et jälgendada kemikaali pihustamist välitingimustes. Enne kemikaaliga töötlemist tuleks katsenõu kaas eemaldada ja asendada vooderdisega, mis kaitseb nõu seinu pritsmete eest. Sellise vooderdise võib teha katsenõust, mille põhi on eemaldatud. Kemikaaliga töötlemine peaks toimuma temperatuuril 20 ± 2 °C ning vesilahuste, -emulsioonide ja -dispersioonide puhul peaks töötlemisel kasutatava vee kogus olema 600–800 µl/m². Õige koguse tagamiseks tuleks kasutada sobivat kaliibrimismeetodit. Erivormid, näiteks graanulid või seemnepuhtimisvahendid tuleks mullapinnale kanda viisil, mis on kooskõlas nende põllumajandusliku kasutusviisiga.

24. Katsenõud tuleks jätta üheks tunniks kaaneta, et lasta uuritava kemikaaliga töötlemisel kasutatavatel lenduvatel lahustitel aurustuda. Tuleks jälgida, et selle aja jooksul ei lahkuks ükski uss katsenõust.

KATSE KÄIK

Katse- ja kontrollrühmad

25. Soovitavalt lisatakse 500–600 grammise kuivmassiga kunstlikku mulda 10 vihmaussi (st 50–60 g mulda ussi kohta). Kui kasutatakse suuremat mullakogust, näiteks töötlemisel sellise pestitsiidi erivormiga nagu seemnepuh-timisvahend, tuleks selleks, et säilitada vahekorda 50–60 g mulda ussi kohta, usside arvu suurendada. Iga kontroll- ja katsenõu kohta valmistatakse ette 10 ussi. Ussid pestakse veega puhtaks, pühitakse kuivaks ja asetatakse lühikeseks ajaks kuivatuspaberile, et liigne vesi saaks ära nõrguda.
26. Süstemaatiliste vigade ärahoidmiseks usside jaotamisel katsenõudesse tuleks katsepopulatsiooni homogeensuses veendumiseks kaaluda ühekaupa ära 20 ussi, kes valitakse juhuvaliku alusel populatsioonist, millest võetakse katses kasutatavad ussid. Pärast homogeensuses veendumist valitakse välja usside rühmad, kaalutakse need ja viiakse juhuslikkuse alusel katsenõudesse. Usside lisamise järel tuleks määrata iga katsenõu algkaal, et selle põhjal oleks võimalik jälgida mulla niiskusesisaldust katse vältel, nagu on kirjeldatud punktis 30. Seejärel kaetakse katsenõud punktis 9 kirjeldatud viisil ja paigutatakse katsekambrisse.
27. Iga punktides 18–24 kirjeldatud meetodi puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks, valmistatakse ka asjakohased kontrollkultuurid. Selleks järgitakse asjaomast kirjeldatud meetodit, ent ainsa erinevusena jäetakse uuritav kemikaal lisamata. Seega töödeldakse kontrollkultuure vajaduse korral orgaanilise lahusti, kvartsi või muu kandeainega, kasutades sama kontsentratsiooni või koguselist määra kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul. Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustit või muud kandeainet, tuleks katses kasutada veel ühte kandeainet ja uuritava kemikaalita kontrolli, et veenduda, et kandeaine ei mõjuta katsetulemusi.

Katsetingimused

28. Katsetemperatuur on 20 ± 2 °C. Katses kasutatakse kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude inkubeerimisalal valgustustihedust 400–800 luksit.
29. Katsenõusid ei aereerita katse vältel, kuid katsenõu kaane ehitus peaks võimaldama gaasivahetust ja samal ajal piirama vee aurustumist (vt punkt 9).
30. Mullasubstraadi veesisaldust katsenõudes hoitakse katse vältel konstantsena, kaaludes katsenõusid (ilma kaaneta) korrapäraselt. Vajaduse korral lisatakse veekao korrvamiseks deioniseeritud vett. Veesisaldus ei tohiks katse alguses täheldatud väärtusega võrreldes kõikuda rohkem kui 10 %.

Söötmine

31. Vastuvõetavaks loetakse sellise kvaliteediga sööt, mille puhul on tõendatud, et see sobib vähemalt usside kehakaalu säilitamiseks katse vältel. Kogemusest nähtub, et sobiv sööt on kaerajahu, lehmäsõnnik või hobusesõnnik. Tuleks kontrollida, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele katse ajal kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid, nematotsiide või sarnaseid veterinaarravimeid. Soovitatakse kasutada oma kogutud lehmäsõnnikut, kuna kogemusest nähtub, et müügilolev aiaväetisena kasutatav lehmäsõnnik võib mõjuda ussidele kahjulikult. Sõnnik tuleks enne kasutamist õhu käes kuivatada, peeneks jahvatada ja pastöriseerida.
32. Iga uue söödapartii sobivas kvaliteedis veendumiseks tuleks enne selle katses kasutamist sööta sellega usside kultuuri, millega katset ei tehta. Kõnealuste usside kasv ja kookonite moodustumine ei tohiks olla pärsitud nende ussidega võrreldes, keda kasvatatakse substraadis, mis ei sisalda uuest partiiist pärit sööta (tingimuste kirjeldus on esitatud katsemeetodis C.8 (4)).

33. Sööta lisatakse esmakordselt üks ööpäev pärast usside lisamist ja mulla töötlemist uuritava kemikaaliga. Igasse nõusse puistatakse mullapinnale umbes 5 g sööta ja see niisutatakse deioniseeritud veega (umbes 5–6 ml nõu kohta). Edaspidi lisatakse sööta 4 nädala pikkuse katseperioodi vältel kord nädalas. Kui sööt jäetakse söömata, tuleks söödakogust seente kasvu ja hallituse ärahoidmiseks vähendada. Täiskasvanud isendid eemaldatakse mullast 28. katsepäeval. Seejärel lisatakse igasse nõusse veel 5 g sööta. Katse lõpuni jäänud 4 nädala jooksul söötmist enam ei toimu.

Katsekontsentratsioonide valimine

34. Sobivate katsekonsentratsioonide valimisel on kasu varasemast teabest uuritava kemikaali mürgisuse kohta, näiteks ägeda mürgisuse hindamise katse (4) ja/või kontsentratsioonivahemiku leidmise katse tulemustest. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, milles kasutatakse näiteks viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni: 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Iga katserühma ja kontrollrühma puhul piisab ühest nõust. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on kaks nädalat ja suremust hinnatakse katse lõpus.

Katseplaan

35. Kuna käesoleva katsemeetodi puhul ei saa sätestada ühte kokkuvõtlikku näitajat, nähakse ette, et määratakse nii täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon kui ka EC_x . Lähitulevikus nõuavad reguleerivad asutused tõenäoliselt, et määratakse täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon. EC_x võidakse lähemal ajal statistilistel ja ökoloogilistel kaalutlustel laiemalt kasutusele võtta. Seepärast pakutakse välja kolm katseplaani, mis tuginevad valgeliimuklaste sigivuse hindamise meetodit käsitleva võrdlusuuringu põhjal esitatud soovitudele.
36. Kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel tuleks meeles pidada järgmist.
- Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit/kahteteist kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 2,0.
 - EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) määramiseks soovitatakse kasutada piisavat arvu eri kontsentratsioone, et saada selles kontsentratsioonivahemikus vähemalt neli statistiliselt oluliselt erinevat vastuse keskväertust. Soovitatakse kasutada vähemalt kahte paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja kuut paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.
 - Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) kui ka EC_x . Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

Katse kestus ja mõõtmised

37. Elus täiskasvanud usse jälgitakse ja need loendatakse 28. katsepäeval. Registreeritakse ebaharilik käitumine (nt võimetus mulda kaevuda või liikumatult lamamine) ja muutused morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine). Seejärel eemaldatakse kõik täiskasvanud ussid katsenõudest ning loendatakse ja kaalutakse. Täiskasvanud isendite leidmist võib hõlbustada usse sisaldava mulla tõstmine puhtale kandikule hindamise eel. Mullast eemaldatud usse tuleks enne kaalumist pesta deioniseeritud veega ja asetada need liigse vee eemaldamiseks lühikeseks ajaks filterpaberile. Eemaldamise käigus leidmata jäänud ussid registreeritakse surnud ussidena, kuna tuleb eeldada, et nad surid ja lagundati enne hindamist.
38. Kui muld on eelnevalt nõust välja tõstetud, viiakse see nõusse tagasi (ilma täiskasvanud ussideta, kuid koos kõikide moodustatud kookonitega). Seejärel inkubeeritakse mulda veel neli nädalat samades katsetingimustes, selle erandiga, et sööta lisatakse vaid ühe korra kõnealuse katsetapi alguses (vt punkt 33).

39. Teise neljanädalase perioodi lõpus määratakse katsemullas olevate kookonite arv ja neist koorunud noorloomade arv, kasutades 5. liites kirjeldatud meetodit. Katse kestel tuleks registreerida ka kõik ussidel täheldatavad kahjustused ja kahjuliku mõju ilmingud.

Piirsalduskatse

40. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheldata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg/kg) mingit mõju, tehakse sigivuskatse piirsalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg/kg. Piirsalduskatse võimaldab tõendada, et täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon on sigivuse puhul suurem kui kõnealune piirkontsentratsioon, ning samal ajal minimeerida katse kasutatavate usside arvu. Nii uuritava kemikaaliga mulla kui ka kontrollmulla puhul tuleks kasutada kaheksat paralleelnõu.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

41. Käesolevas katsemeetodis ei anta lõplikke juhiseid katsetulemuste statistilise analüüsi kohta, kuid asjakohane ülevaade on esitatud 6. liites.
42. Üks lõppnäitaja on suremus. Siiski tuleks registreerida ka muutused täiskasvanud isendite käitumises (nt võimetus mulda kaevuda või katsenõu klaasseina vastas liikumatult lamamine) ja morfoloogias (nt lahtiste haavade esinemine), samuti noorloomade esinemine. Üldjuhul tuleks kasutada LC_{50} leidmiseks probitanalüüsi (18) või logistilist regressiooni. Selle analüüsimeetodi sobimatuse korral (nt kui andmed hõlmavad vähem kui kolme kontsentratsiooni, mille puhul täheldatakse osalist suremust) võib kasutada mõnda alternatiivset meetodit. Kõnealuse meetodina võib muu hulgas kasutada libiseva keskmise meetodit (19), kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (20) või lihtsat interpoleerimist (nt LC_0 ja LC_{100} geomeetrilist keskmist, mis on saadud LC_0 ja LC_{100} korrutisest ruutjuure võtmise teel).
43. Teine lõppnäitaja on sigivus (nt sigitatud noorloomade arv). Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokolli siiski märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud. Statistilise analüüsi käigus on vaja arvutada sigivuse aritmeetiline keskmine \bar{x} ja standardhälve igas katse- ja kontrollrühmas.
44. Dispersioonanalüüsi tegemise korral võib standardhälbe s ja selle vabadusastmete arvu df asendada vastavalt dispersioonanalüüsi (ANOVA) tulemusena leitud hajuvuse hinnangulise koondmäära ja selle vabadusastmete arvuga, eeldusel, et hajuvus ei sõltu kontsentratsioonist. Sellisel juhul kasutatakse kontroll- ja katserühmade puhul ühte hajuvuse väärtust. Kõnealused väärtused arvutatakse tavaliselt müügiloleva statistilise analüüsi programmi abil, kasutades paralleelidena igas eraldi nõus saadud tulemusi. Kui ilmneb, et negatiivse kontrolli ja lahustiga kontrolli andmete koondamine on mõistlikum kui võrdlemine ühe nimetatud kontrolliga, tuleks veenduda, et asjaomased andmed ei ole oluliselt erinevad (selleks sobivatele meetoditele osutatakse punktis 47 ja 6. liites).
45. Edasine statistiline analüüs ja järeldused sõltuvad sellest, kas paralleelnõudes saadud väärtused on normaaljaotusega ja kas nende hajuvus on homogeenne.

Täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) hindamine

46. Soovitavalt tuleks kasutada suure võimsusega meetodit. Et hinnata andmete jaotuse ligikaudset vastavust normaaljaotusele, tuleks kasutada varasemal kogemusel, näiteks võrdlusuuringu andmetel või muudel varasematel andmetel põhinevat teavet. Hajuvuse homogeenus (homoskedastiivsus) on suurema tähtsusega. Kogemusest nähtub, et hajuvus suureneb sageli keskvaartuse suurenedes. Sellisel juhul võib homoskedastiivsuse saavutamiseks olla kasu andmete teisendamisest. Kõnealuse teisendamise puhul tuleks siiski lähtuda varasematel andmetel põhinevast kogemusest, mitte analüüsitavatest andmetest. Homogeensete andmete puhul tuleks kasutada mitmest t-testi, näiteks Williamsi testi ($\alpha = 0,05$; ühepoolne) (21, 22) või teatavatel juhtudel Dunnetti testi (23, 24). Tuleks tähele panna, et paralleelnõude andmete ebavõrdse hajuvuse korral tuleb tabelis esitatud t-väärtusi Dunnetti ja Williamsi kirjeldatud viisil korrigeerida. Mõnikord ei suurene/vähene saadud väärtused suurest varieeruvusest tingituna korrapäraselt. Sellise suure monotoonsusest kõrvalekaldumise puhul on asjakohasem kasutada Dunnetti testi. Homoskedastiivsusest kõrvalekaldumise puhul võib olla mõistlik hinnata võimalikku mõju hajuvusele lähemalt, et oleks võimalik otsustada, kas asjaomaseid t-teste saab kasutada

võimsust oluliselt kaotamata (25). Teise võimalusena võib kasutada mitmest U-testi, näiteks Bonferroni U-testi vastavalt Holmle (26), või heteroskedastiivsete andmete puhul, mis muidu vastavad üldisele monotoonsele kontsentratsioonist sõltuvusele, mõnda muud mitteparameetrilist (nt Jonckheere'i-Terpstra (27, 28) või Shirley (29, 30)) testi; sellist testi tuleks üldjuhul eelistada ebavõrdse hajuvuse suhtes kohandatud t-testile (vt ka skeem, 6. liide).

47. Kui on tehtud piirsalduskatse ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib kasutada paariviisilist Studenti t-testi või ka Manni-Whitney U-testi (31).

EC_x leidmine

48. Mis tahes EC_x väärtuse arvutamiseks regressioonanalüüsi (lineaarse või mittelineaarse regressiooni) teel kasutatakse katserühmade andmete keskvaartusi, mille alusel leitakse kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust kirjeldav sobiv funktsioon. Pideva tunnusega vaadeldava usside kasvu puhul võib EC_x väärtuste leidmiseks kasutada sobivat regressioonanalüüsi (32). Binaarsete andmete (suremus/elulemus) ja sigitatud järglaste arvu puhul sobivad funktsioonid on muu hulgas normaaljaotuse sigmoidfunktsioon, logistiline funktsioon ja Weibulli funktsioon, mis hõlmavad kahte kuni nelja parameetrit ja millest mõni sobib ka hormeetilise mõju modelleerimiseks. Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava funktsiooni leidmiseks kasutatakse lineaarset regressiooni, tuleks enne EC_x määramist veenduda regressioonanalüüsi teel r² (määratusekordaja) ja/või tõusu väärtuse olulisuses; EC_x arvutamiseks sisestatakse regressioonanalüüsi tulemusena saadud võrrandisse väärtus, mis vastab x protsendile kontrollrühma keskvaartusest. Usalduspiirid usaldusnivool 95 % arvutatakse vastavalt Fiellerile (viidanud Finney (18)) või mõne muu sobiva kaasaegse meetodi abil.
49. Teise võimalusena väljendatakse mõju protsentuaalse või lihtosakaaluna kontrollrühma näitaja keskvaartusest, mida käsitatakse mudeli parameetrina. Sellisel juhul on normaaljaotusele vastava (logistilise, Weibulli) sigmoidse kõvera lähendamiseks andmetele sageli võimalik hõlpsalt kasutada probitanalüüsil põhinevat regressiooni-meetodit (18). Kõnealusel juhul tuleb kaalufunktsiooni kohandada arvulise tunnuse analüüsimiseks, nagu on kirjeldanud Christensen (33). Hormeesi ilmnemisel tuleks probitanalüüsi asemel siiski rakendada neljaparametrilist logistilist või Weibulli funktsiooni, kasutades lähendamiseks mittelineaarset regressiooni (34). Kui kontsentratsiooni ja mõju vahelist sõltuvust väljendava sobiva funktsiooni lähendamine andmetele ei ole võimalik, võib EC_x hinnangulise väärtuse ja asjaomaste usalduspiiride määramiseks kasutada muud meetodit, näiteks libiseva keskmise meetodit vastavalt Thompsonile (19) või kohandatud Spearmani-Kärberi meetodit (20).

KATSEPROTOKOLL

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- uuritava kemikaali täielik kirjeldus, partii, CASi number, puhtus;
- uuritava kemikaali omadused (nt log K_{ow}, lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H) ning teave kemikaali säilivuse ja omaduste kohta keskkonnas).

Katseorganismid:

- kasutatud katseloomad: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- katseorganismide vanus ja suurusevahemik (massivahemik).

Katsetingimused:

- katsemulla valmistamise üksikasjad;
- mulla maksimaalne veemahutavus;
- selle meetodi kirjeldus, mida kasutati mulla töötlemiseks uuritava kemikaaliga;
- üksikasjad abikemikaalide kohta, mida kasutati uuritava kemikaaliga töötlemiseks;
- vajaduse korral pihustusseadmete kalibrimise üksikasjad;
- katseplaani ja katse läbiviimise kirjeldus;
- katsenõude suurus ja katsemulla kogus;
- katsetingimused: valgustustihedus, valgus- ja pimedusperioodi kestus, temperatuur;

- söötmissrežiimi kirjeldus, katses kasutatud sööda liik ja kogus, söötmisskuupäevad;
- mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja lõpus.

Katsetulemused:

- täiskasvanud usside suremus (%) igas katsenõus katse esimese 4 nädala möödudes;
- täiskasvanud usside summaarne mass igas katsenõus katse alguses;
- elus täiskasvanud usside kehamassi muutus (% algsest kehamassist) igas katsenõus katse esimese 4 nädala möödudes;
- sigitatud noorloomade arv igas katsenõus katse lõpus;
- ilmsete ja patoloogiliste sümptomite ning selgete käitumuslike muutuste kirjeldus;
- võrdluskemikaaliga saadud tulemused;
- vastavalt vajadusele LC₅₀, sigivuse puhul määratud täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) ja/või EC_x (nt EC₅₀, EC₁₀) koos usaldusvahemikuga ning graafik asjaomase näitaja arvutamiseks kasutatud lähendatud kõveraga, samuti kõik tulemuste tõlgendamist hõlbustavad andmed ja tähelepanekud;
- kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;
- tulemused iga katsenõu kohta.

Kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatud ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

- (1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*” is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6–8.
- (2) Øien, N., ja Stenerson, J. (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Phys. C* 78: 277–282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. Väljaandes: Riepert, F., Kula, C. (1996), Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamt Land-Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, 320, lk 50–82.
- (4) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- (5) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (6) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No. 11268-1. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S. C., Bembridge, J. D., Holmstrup, M., ja Posthuma, L. (toim.). SETAC Press, 456 lk.
- (8) USA Keskkonnakaitseamet (1996). Ecological Effects Test Guidelines: Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). USA Keskkonnakaitseamet, ennetamise, pestitsiidide ja mürgiste ainete büroo. EPA 712-C-96-167, aprill 1996.
- (9) Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C. A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Aruanne EUR 8714 EN, Euroopa Ühenduste Komisjon.
- (11) Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards, P. J., ja Heimbach, F. (toim.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

- (12) Edwards, C. A., ja Bohlen, J. P. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*, 3. väljaanne. Chapman & Hall, London.
- (13) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). *Soil Quality – Determination of pH*, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (14) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F., ja Achazi, R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Väljaandes: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W., ja Eisentraeger, A. (toim.). Spektrum Verl., Heidelberg. Lk 59–81.
- (15) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1992). *Soil Quality – Determination of water retention characteristics – Laboratory methods*, No. 11274. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (16) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). *Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method*, No. 11465. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (17) Römbke, J., ja Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 lk.
- (18) Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis* (3. väljaanne), lk 19–76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D. J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) 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.
- (21) Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.
- (22) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519–531.
- (23) Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50: 1096–1121.
- (24) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
- (25) van der Hoeven, N. (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355–361.
- (26) Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6: 65–70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41: 133–145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking. *Indagat. Math.* 14: 327–333.
- (29) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies. *Appl. Stat.* 28: 144–151.
- (30) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control. *Biometrics* 42: 183–186.
- (31) Sokal, R. R., ja Rohlf, F. J. (1981). *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2. väljaanne. W. H. Freeman and Company, New York.
- (32) Bruce, R. D., ja Versteeg, D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485–1494.
- (33) Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res.* 18: 213–221.
- (34) Van Ewijk, P. H., ja Hoekstra, J. A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Safe.* 25: 25–32.

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul mõju ulatus on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on 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. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta.

LC₀ (kontsentratsioon, mille puhul surmav mõju puudub) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal ei surma teatava aja jooksul ühtki kemikaaliga kokku puutunud katseorganismi. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC₀ uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

LC₅₀ (kontsentratsioon, mille puhul sureb pool katseorganismidest) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 50 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC₅₀ uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta.

LC₁₀₀ (kontsentratsioon, mille puhul surevad kõik katseorganismid) – kontsentratsioon, mille juures uuritav kemikaal surmab teatava aja jooksul 100 % kemikaaliga kokku puutunud katseorganismidest. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse LC₁₀₀ uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali väiksem kontsentratsioon, mille juures täheldatakse statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul väljendatakse sellist kontsentratsiooni uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku või mulla pindala ühiku kohta. Kõikidel sellisest kontsentratsioonist suurematel katsekontsentratsioonidel peaks üldjuhul täheldatama kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist mõju. Mis tahes kõrvalekaldeid eespool esitatud määratlusest tuleb katseprotokollis põhjendada.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mille juures ei täheldata mingit mõju ja mis on kasutatud kontsentratsioonide jadas vahetult allpool vähimat täheldatavat toimet avaldavat kontsentratsiooni. Käesoleva katsemeetodi puhul ei täheldata sellisel kontsentratsioonil teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

Sigivuse määr – katseperioodi jooksul sigitatud noorloomade keskmine arv teatava arvu täiskasvanud usside kohta.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

—

2. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

On leitud, et mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks sobib järgmine meetod. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 (1) C lisas.

Sobiva proovivõtuseadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga, toru täidetakse veega ja pannakse resti peale veevanni. Toru tuleks lasta vette vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartslüüva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühi mass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

VIIDE

- (1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mulla pH määramiseks põhineb kirjeldusel, mis on esitatud standardis ISO/DIS 10390 „Soil Quality – Determination of pH” (1).

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit ja seejärel lastakse sellel settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kaliibritakse enne iga mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

VIIDE

- (1) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.

4. liide

***Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* kasvatamine**

Usse tuleks soovitatavalt kasvatada kliimakambris temperatuuril 20 ± 2 °C. Sellel temperatuuril ja piisava sööda olemasolul saavutavad ussid suguküpsuse umbes 2–3 kuu pärast.

Kumbagi liiki võib kasvatada paljudes eri loomsetes jäätmetes. Soovitatav kasvukeskkond on hobuse- või veisesõnniku ja turba segu vahekorras 50:50. Tuleks kontrollida, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele katse ajal kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid, nematotsiide või sarnaseid veterinaarravimeid. Soovitatakse kasutada oma kogutud mahesõnnikut, kuna kogemusest nähtub, et müügilolev aiaväetisena kasutatav sõnnik võib mõjuda ussidele kahjulikult. Kasvukeskkonna pH peaks olema umbes 6–7 (reguleeritakse kaltsiumkarbonaadiga), selle ioonjuhtivus peaks olema väike (väiksem kui 6 mS/cm või soolasisaldus väiksem kui 0,5 %) ja see ei tohiks olla ammoniaagi või loomade uriiniga liigselt saastunud. Substraat peaks olema niiske, kuid mitte liiga märg. Kasvatamiseks sobivad kastid mahuga 10–50 liitrit.

Standardse vanuse ja suurusega (kehamassiga) usside saamiseks on parim alustada kasvatamist kookonist. Kasvama pandud kultuuri säilitamiseks viiakse täiskasvanud ussid 14–28 päevaks värsket substraati sisaldavasse kasvatuskasti, et saada kookoneid juurde. Seejärel täiskasvanud ussid eemaldatakse ja kookonist kooruvaid noorloomi kasutatakse järgmise kultuuri saamiseks. Usse söödetakse pidevalt loomsete jäätmetega ja nad viiakse aeg-ajalt üle värskesse substraati. Kogemusest nähtub, et sobiv sööt on õhu käes kuivatatud peeneks jahvatatud lehma- või hobusesõnnik või kaerajahu. Tuleks veenduda, et lehmadele või hobustele, kellelt sõnnik pärineb, ei manustata ussidele pikaajalise kasvatamise käigus kahjulikku mõju avaldada võivaid ravimeid ega kemikaale, näiteks kasvu soodustavaid aineid. Kookonist koorunud usse kasutatakse katses 2–12 kuu vanusena, mil nad loetakse täiskasvanuks.

Usse võib pidada terveks, kui nad liiguvad läbi substraadi, ei püüa substraadist lahkuda ja paljunevad pidevalt. Substraadi ammendumisest annab märku usside väga aeglane liikumine ja nende tagaotsa muutumine kollaseks. Sellisel juhul soovitatatakse kasutada värsket substraati ja/või vähendada asustustihedust.

5. liide

Kookonist koorunud noorte usside loendamise meetodid

Usside käsitsi eemaldamine mullasubstraadist on väga aeganõudev. Seepärast soovitatakse kasutada ühte kahest järgmisest alternatiivsest meetodist.

- a) Katsenõud asetatakse veevanni, mille temperatuur on algselt 40 °C, kuid tõuseb seejärel 60 °C-ni. Umbes 20 minuti pärast peaks noored ussid ilmuma mullapinnale, kust neid saab loendamiseks hõlpsalt eemaldada.
- b) Katsemulla võib uhtuda läbi sõela meetodil, mille töötasid välja van Gestel *et al.* (1), kui mullale lisatud turvas ja sõnnik või kaerajahu on eelnevalt peeneks pulbriks jahvatatud. Kaks sõela läbimõõduga 30 cm ja ava suurusega 0,5 mm asetatakse teineteise peale. Katsenõu sisu uhutakse tugeva kraaniveejoaga läbi sõelte, nii et noored ussid ja kookonid jäävad enamjaolt ülemisele sõelale. On oluline tähele panna, et selle toiminguga vältel tuleks kogu ülemise sõela pinda märjana hoida, et noored ussid jääksid veekihi pinnale ujuma ega saaks läbi sõelaavade ronida. Parimad tulemused saavutatakse dušitsiku kasutamisel.

Kui kogu mullasubstraat on läbi sõela uhutud, saab noorloomad ja kookonid ülemiselt sõelalt kaussi uhtuda. Kausi sisu jäetakse seisma, et tühjad kookonid saaksid veepinnale tõusta ning täis kookonid ja noored ussid põhja vajuda. Seejärel saab seisva vee ära kallata ning tõsta noored ussid ja kookonid veidi vett sisaldavasse Petri tassi. Ussid võib loendamiseks eemaldada nõela või pintsettide abil.

Kogemusest nähtub, et meetod a sobib paremini selliste noorte usside ekstraheerimiseks, kes võidakse uhtuda isegi läbi 0,5 mm suuruste sõelaavade.

Mullasubstraadist usside (ja vajaduse korral kookonite) eemaldamiseks kasutatava meetodi tõhusus tuleks alati eelnevalt kindlaks teha. Kui noorloomad eemaldatakse käsitsi, on soovitatav teha seda toimingut igas kultuuris kaks korda.

VIIDE

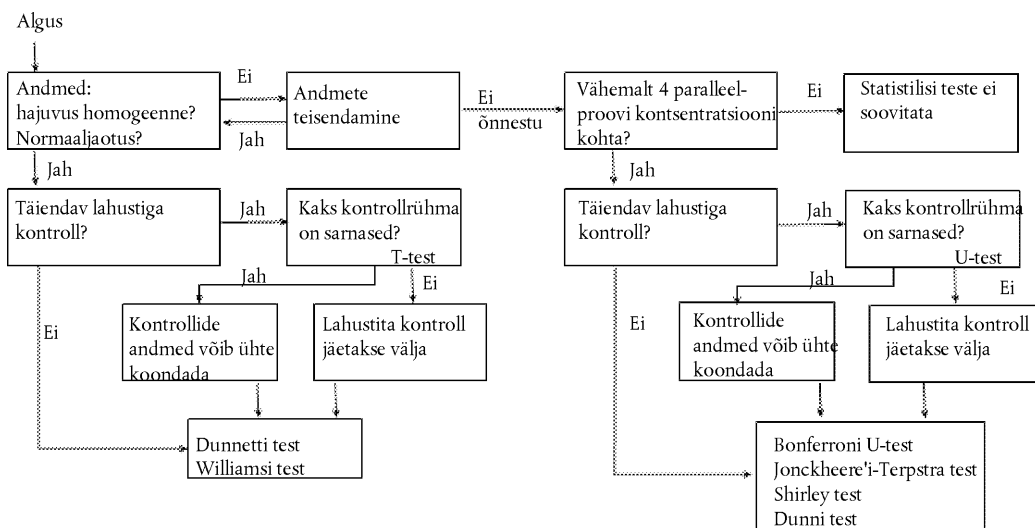
- (1) Van Gestel, C. A. M., van Dis, W. A., van Breemen, E. M., ja Sparenburg, P. M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32: 367–371.

6. liide

Andmete statistilise analüüsi ülevaade (tähtsamat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramine)

Parameetrilised testid

Mitteparameetrilised testid



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 puutumatu 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 määrast – või asjaolust, et kemikaal ei ole aeroobselt biolagundatav.
2. Keskkonda sattuv kemikaal peaks soovitavalt 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 kontsentratsioonis 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 töörihm 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 lahkarvamused. Ühendkuningriik leidis, et kuna märkimisväärse osa uuringus osalejate andmeil toodeti gaasi väga vähe või üldse mitte – osaliselt seepärast, et vabaruumi protsentuaalne maht oli optimaalse tundlikkuse 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 käärivat 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) kompaktsamad ja mugavamad seadmed, mida kasutasid Battersby ja Wilsoni (9) välja töötatud 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.
5. 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 jälgendatakse kääritusmahutite tööd täpsemalt.

KATSE PÕHIMÕTE

6. 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_{50} 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

7. 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 katstes sellisel kujul, nagu seda toodetakse/müüakse. Valmistoodete kasutamist üldjuhul ei soovitata, kuid raskesti lahustuva uuritava kemikaali puhul võib valmistootete 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

8. 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 anaeroobsest allikast, näiteks mudast, küllastunud mullast või settest 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

9. 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(tiotüüüanaat) 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.

TULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

10. Rahvusvahelises võrdlusuuringus (5) täheldati, et 3,5-diklorofenooli ja 2-bromoetaansulfoonhappe puhul ei ole EC_{50} 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	Variatsiooni-kordaja (%)	Keskmine	Standardhälve	Variatsiooni-kordaja (%)
	3,5-diklorofenool					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetaansulfoonhape					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC₅₀ 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 EC₅₀ väärtuse määramise täpsus ei olnud oluliselt suurem kui ruumalal põhineva väärtuse (mg/l) määramise täpsus. Kolmes laboris, kus esitati andmed 3,5-diklorofenooli EC₅₀ 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 tavaparastele laboriseadmetele on vaja järgmist:
- inkubaator – sädemekindel ja väärtusele 35 ± 2 °C reguleeritava temperatuuriga;
 - sobiva nimimahuga ⁽¹⁾ survekindlad klaasist katsenõud, millel on gaasikindel pinnakattega tihendkork ja mis kannatavad rõhku umbes 2 baari ehk 2×10^5 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 ⁽²⁾ ja alumiiniumist pressrõngas, kuid hästi sobivad ka muud pudelid üldmahuga 0,1–1 liitrit;
 - täppisrõhumõõtur ⁽³⁾ 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;
 - soojusisolatsiooniga konteinerid kääriava muda transportimiseks;
 - kolmesuunalised rõhuventiilid;
 - sõel ava suurusega 1 mm²;
 - 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;
 - membraanfiltrid (0,2 µm) substraadi steriliseerimiseks;

⁽¹⁾ Soovitav maht on 0,1–1 liitrit.

⁽²⁾ Soovitatakse kasutada gaasikindlat silikoonkorki. Peale selle on soovitatav kontrollida korgi, eriti butüülkummist korgi 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 tähelepanelikult uurida, et veenduda, et see jääb pärast nõela läbitorkamist gaasikindlaks.

⁽³⁾ Mõõturit tuleks kasutada ja korrapäraselt kalibreerida vastavalt tootja juhiste. 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 1×10^5 Pa, võrreldes saadud tulemust mehaanilise näidikuga rõhumõõтури näiduga. Kui kõnealune mõõtmine tehakse õigesti, ei muutu ka mõõtetulemuste lineaarsus. Kui kasutatakse muud mõõteseadet, millel puudub tootja kalibreerimissertifikaat, soovitatakse koostada korrapäraselt kogu mõõtepiirkonda hõlmav teisendusgraafik (2. liide).

- 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 deioniseerimiseadet 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 kavatakse kasutada kohandatud inokulumi, võib kaaluda tööstuslikust reoveepuhastist pärit kääriva muda kasutamist. Muda kogumiseks kasutatakse kõrgtihedast polüetüleenist või sarnasest materjalist laia kaelaga pudeleid, mis on võimelised paisuma. Proovivõtupudelid täidetakse mudaga nii, 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 ± 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 ± 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 mm² suuruste avadega sõela (punkti 12 alapunkt f) sobivasse pudelisse (punkti 12 alapunkt g), mille vabaruumist juhitakse 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 µm 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 kemikaalisaldus hapnikuvabas lahjendusvees (punkt 14) on näiteks 10 g/l. Eri kontsentratsiooniga reaktsiooniseaduste valmistamiseks kasutatakse sobivas koguses sellist põhilahust. Teise võimalusena valmistatakse igast põhilahusest lahjenduste seeria, nii et katsepudelisse 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 samaväärselt ELi standardist. Kui on vaja kasutada orgaanilist lahustit, hoidutakse kasutamast näiteks kloroformi ja süsiniktetrakloriidi, mis teadaolevalt pärssivad tugevalt metaanitootmist. Valmistatakse vees lahustumatu kemikaali vajaliku kontsentratsiooniga lahus sobivas lenduvas lahustis, näiteks atsetoonis või dietüüleetris. Nõutav kogus lahustipõhist lahust lisatakse tühja katsepudelisse (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 katsekesse. Lenduvad kemikaalid ja vees lahustumatud vedelad uuritavad kemikaalid võib süstida inokulumi sisaldavasse seerumipudelisse mikrosüstla abil (punkti 12 alapunkt i).
20. Uuritav kemikaal lisatakse pudelitesse nii, et moodustuks kontsentratsioonide geomeetriline 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 kontsentratsiooni vahemiku 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 lahendusvett (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 EC₅₀ väärtuste keskmine vahemik.

SEGAVAD 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 pudeleid 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 käsitemise ja sulgemise ajal vahemikku 35 ± 2 °C.

Eelkatse

25. Kui muda aktiivsus ei ole teada, soovitatakse teha eelkatse. Selleks kasutatakse kontrollsegusid, 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 märkimisväärses koguses gaasi ja teha kaks mõõtmist päevas optimaalse tundlikkusega ⁽¹⁾ ning alandada igapäevaselt rõhku plahvatusohtu tekitamata.

⁽¹⁾ See kehtib katseüsteemis ja katsetingimustes, mille puhul gaasikoguseid, mida toodetakse kemikaalita kontrollnõudes ja nõudes, kus pärssumise määr on 70–80 %, on võimalik hinnata vastuvõetava veamääraga.

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 partiid. Lahustumatu või raskesti lahustuva kemikaali puhul süstitakse see mikrosüstlaga orgaanilises lahustis lahustatud kujul tühjadesse pudelitesse, et saada uuritava kemikaali kõigil viiel kontsentratsioonil partii paralleelpudeleid. Lahusti aurustatakse, juhtides gaasilise lämmastiku joa üle katsepudelis 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 katsesubstraadi 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 alikvoort, nt 100 ml, viiakse laiaotsalise pipeti või mõõtesilindri abil katsepudelisse. On oluline täita pipett ühekorruga 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 toitepuljongi, 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 katseseгу koostise kohta.

Uuritava kemikaali lõplik massi-kontsentratsioon katsepudelis (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)	Lahjendusvesi (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.

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 ± 2 °C. Pudeleid inkubeeritakse pimedas. Umbes 1 tunni pärast võrdsustatakse rõhk pudelites atmosfäärirõhuga, torgates rõhumõõturiga (punkti 12 alapunkt c) ühendatud süstlanõela üksikhaaval 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 ± 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 üksikhaaval 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.

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 rõhumõõtuuri kaliibrimiskõvera 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 keskvaartusega 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;
- uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

Katsetingimused:

- katsenõudes oleva vedeliku ja vabaruumi maht;
- katsenõude ja gaasimõõteseadme kirjeldus (nt rõhumõõtuuri 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 EC₅₀ 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.

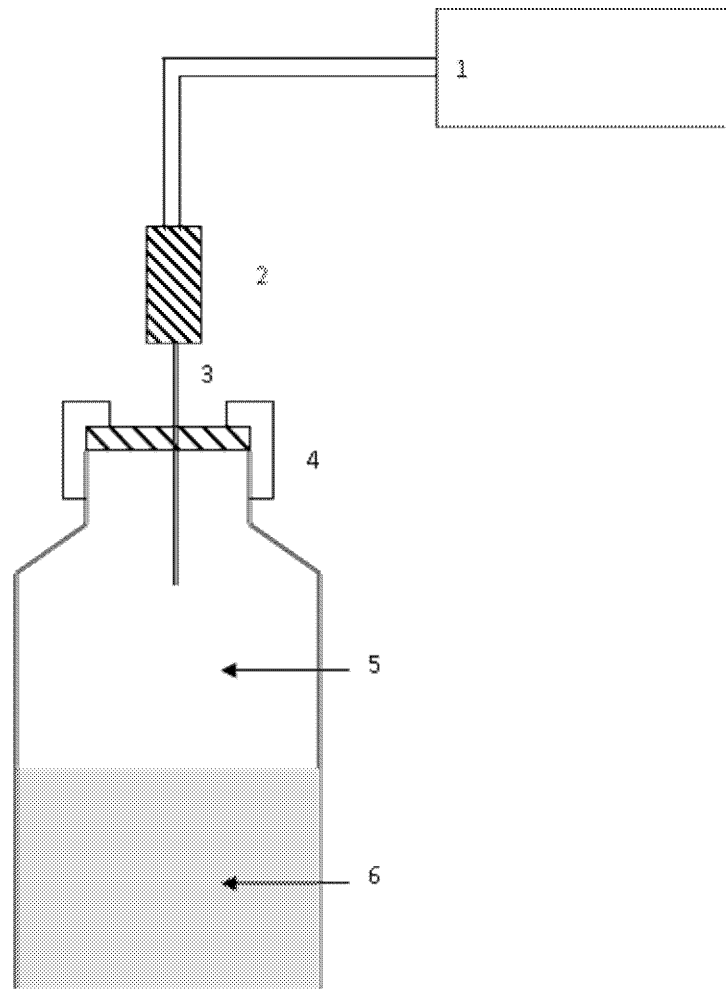
KIRJANDUS

- (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: mõõtmine 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.
- (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.
-

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 ± 2 °C.

2. liide

Rõhumõõduri näidu teisendamine

Rõhumõõduri 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. Kalibriimiskõvera koostamiseks süstitakse teadaolev kogus gaasi temperatuuril 35 ± 2 °C seerumipudelisse, mis sisaldab reaktsioonisegu ruumalale (V_R) vastavas koguses vett.

- Viide seerumipudelisse viiakse temperatuuril 35 ± 2 °C hoitava vee alikvoot ruumalaga V_R (ml). Pudelid suletakse ja paigutatakse tasakaalustamiseks 1 tunniks veevanni, mille temperatuur on 35 ± 2 °C.
- Rõhumõõtur pannakse tööle, näidul lastakse stabiliseeruda ja see reguleeritakse nulli.
- Süstlanõel torgatakse läbi ühe pudeli korgi, avatakse ventiil ja suletakse see pärast rõhumõõduri näidu langemist nulli.
- Seda toimingut korratakse ülejäänud pudelitega.
- Igasse pudelisse süstitakse 1 ml õhku temperatuuriga 35 ± 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.

3. liide

Valesid tulemusi põhjustada võivad teadaolevad tegurida) *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 pehmemaberiga 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 meetodikat, sealhulgas kindakambrit.

d) *Mudas sisalduvad suuremõõtmelised substraadid*

Anaeroobset gaasitootmist ja muda tundlikkust mõjutavad koos inokulumiga katsepudelis viidavad substraadid. Olmereovee 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 EC₅₀ 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 kääriva muda kasutamisest ja/või toitepuljongit, pärmiekstrakti ja glükoosi sisaldava katsesubstraadi (punkt 29) sisalduse suurendamisest.

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:
- teha muudetud kujul eelkatse (punkt 25) lahjendamata mudaproovi, mullaproovi vmt-ga temperatuuril $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ või keskkonnatingimuste täpsemaks jälgendamiseks proovi kogumiskohas valitseval temperatuuril (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13641 1. osas);
 - teha katse kääritusmahutist pärit sajakordselt lahjendatud reoveemudaga, et jälgendada keskkonnaproovi eeldatavalt väikest aktiivsust, ent hoida temperatuuri väärtusel $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (nagu on kirjeldatud standardi ISO 13 641 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 jälgendatakse 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 jälgendamise huvides tuleks katse teha proovivõtukohta temperatuuril, kuna on teada, et eri rühmadesse kuuluvad metaani tootvad bakterid eelistavad eri temperatuurirahemikke – termofiilid temperatuuri umbes $30\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$, mesofiilid temperatuuri $20\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$ ja psührofiilid temperatuuri alla $20 \text{ }^\circ\text{C}$ – 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)

Põhitekstis tuleks teha järgmised muudatused ja parandused, millega täiendatakse mõnda olemasolevat punkti või alapunkti või asendatakse need.

- A.6. Punkti 6 „Katse põhimõte” täiendatakse järgmiselt:

„Seda meetodit võib kasutada sajakordselt lahjendatud anaeroobse reoveemuda puhul, millega osaliselt jälgendatakse loodusliku muda ja sette väikest aktiivsust. Inkubeerimistemperatuur võib olla kas $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 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, $15 \text{ }^\circ\text{C}$ -ni ulatuvat temperatuuri;”

A.8. Punkti 13 lõppu lisatakse järgmine reaktiiv:

„Fosforhape (H_3PO_4) – 85 massiprotsendiline vesilahus.”

A.9. Punkti 16 lõppu lisatakse järgmine lause:

„Katses kasutava tahke kuivaine lõplik üldsisaldus on $0,20 \pm 0,05$ 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 kontsentreeritumast 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 $7 \pm 0,5$ ühikut ja see viiakse gaasilise lämmastiku joa all sobivasse seerumipudelis. 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 kontsentreeritum toitelahus – valmistatakse järgmistest koostisainetest:

veevaba kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4)	2,7 g;
dinaatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(või 11,2 g dodekahüdraati);	5,3 g;
ammooniumkloriid (NH_4Cl)	
kaltsiumkloriidihüdraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g;
magneesiumkloriidheksahüdraat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g;
raud(II)kloriidtetrahüdraat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g;
resauriin (redoksindikaator)	0,01 g;
naatriumsulfiidnonahüdraat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	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 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g;
ortoboorhape (H_3BO_3)	0,05 g;

tsinkkloriid ($ZnCl_2$)	0,05 g;
vask(II)kloriid ($CuCl_2$)	0,03 g;
naatriummolübdiaatdihüdraat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g;
koobalt(II)kloriidheksahüdraat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g;
nikkel(II)kloriidheksahüdraat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g;
dinaatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g.
Ained lahustatakse lahendusvees (punkt 14) ja lahuse ruumala viiakse	1 000 milliliitriini.”

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.

A.17. Punkt 34: rõhu mõõtmine.

Kui on vaja registreerida gaasikogus gaasifaasis, kasutatakse pudelite vabaruumis rõhu mõõtmiseks punktis 34 kirjeldatud meetodit. Kui soovitakse mõõta CO_2 ja CH_4 summaarset üldkogust, vähendatakse vedela faasi pH väärtust tasemeni 2 ühikut, süstides igasse asjaomasesse pudelisse H_3PO_4 , 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_2 tootmise kiirus on metaanitootmise kiirusest palju suurem, võib käärivatate bakterite tundlikkus muutuda ja/või uuritava kemikaali mõju metaani tootvatele bakteritele on suurem.

A.18. Punkt 36: pH mõõtmine.

H_3PO_4 kasutamise korral tuleb kasutada eelkõige pH mõõtmiseks täiendavalt paari lisapudelit, kuhu ei lisata H_3PO_4 .

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	—

*5. liide***Mõisted**

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

C.35. LUMBRICULUS'ELE AVALDUVA MÜRGISUSE HINDAMISE KATSE RIKASTATUD SETTEGA SÜSTEEMIS SETE/VEESI

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 nahakausel 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 mürgisusse mõjususe panuse andmiseks kuluv aeg sõltub asjaomase kemikaali füüsikaliskemilistest 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 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 füüsikaliskemilised 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 oktaanol/vesi (K_{ow});
 - jaotuskoefitsient süsteemis orgaaniline süsinik/vesi (K_{oc});
 - hüdrolüüsi 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 settefaasi 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 tasakaalu-kontsentratsiooni (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 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 juhus, kui katseplaani ja andmed seda võimaldavad, nii sigivuse kui ka biomassi puhul arvutada täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (vt punktid 34–38). Katseplaani koostamisel lähtutakse katse eesmärgist: kas soovitakse määrata EC_x või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon.

VÕRDLUSKATSEID

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 mürgisest 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 võrdluske-mikaalina kasutatakse pentaklorofenooli. *L. variegatus*'e puhul on soovitatud kasutada mürgise võrdluske-mikaalina 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 väljaheidete 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 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 polütetrafluorotüleeni, 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_3 sisaldusena milligrammides liitri kohta). Kasulikku teavet võib anda ka vee kasutuseelne analüüsimine mikrosaasteainete 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_3 liitri kohta. OECD juhendi nr 210 (38) kohased lahjendusvee vastuvõetavuse lisakriteeriumid on kokkuvõtlikult esitatud 3. liites.

Sete

22. Kuna ühest konkreetsest allikast pärit saastumata looduslik sete ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ning selles looduslikult esinevad organismid ja võimalikud mikrosaasteained 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 ± 1 % (kuivmass) kaoliinsavi (soovitatav kaoliiniidisisaldus üle 30 %).
 - c) 75–76 % (kuivmass) kvartsi liiva (peen liiv tera suurusega ≤ 2 mm, kusjuures > 50 % osakestest peaks olema vahemikus 50–200 μm).
 - d) Sette kuivadele koostisosadele lisatav deioniseeritud vesi, 30–50 % sette kuivmassist.
 - e) Lõpliku settesegu pH reguleerimiseks lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (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 α -tselluloosi segu (vahekorras 1:1), 0,4–0,5 % sette kuivmassist; üksikasjalik teave on esitatud 4. liites.
23. Turba, kaoliinsavi, söödamerjal 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 mikrosaasteainete 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 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 kvartsliaivaga, nagu on kirjeldatud punktis 22 (nt 10 g kvartsliaiva katenõu kohta). On leitud, et kvartsliaiva täielikuks küllastamiseks piisab 0,20–0,25 ml lahusest grammi liiva kohta. Seejärel tuleb lahustil lasta aurustuda, kuni liiv on kuiv. Uuritava kemikaali samaaegsest 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 kvartsliaiva 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 kvartsliaiva 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 kohendada 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 uuritava kemikaalil jaotuda settefaasi ja veefaasi vahel (nt allikad 3, 7, 9). Seda tuleks soovitatavalt teha katsetemperatuuril ja katses kasutatavates aereerimistingimustes. Vajalik tasakaalustamisajaks sõltub settest ja kemikaalidest 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 massibilansi ja väljendada tulemusi lähtuvalt mõõdetud algkontsentratsioonist. Üldjuhul häirib proovivõtmine 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 lisanõud, 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 analüüsimise meetodi puhul vajaliku koguse proovi. Proovivõtmist kirjeldatakse üksikasjalikult punktis 53.

KATSE KÄIK

Eelkatse

31. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta *Lumbriculus variegatus*-le 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.
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. Katseplaanis EC_x 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_x (nt EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) 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_x hinnanguline väärtus, tuleks katses kasutada vähemalt viit kontsentratsioonile ja iga kontsentratsioonile 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 kontsentratsioonile 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 mitteavaldav kontsentratsioon, tuleks kasutada vähemalt viit katsekontsentratsioonile ja iga kontsentratsioonile 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 kontsentratsioonile määramiseks, võib teha piirsalduskatse, mis hõlmab ühte katsekontsentratsioonile ja kontrollproove. Sellisel juhul tuleks katseprotokollis esitada piirkontsentratsioonile 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 kontsentratsioonile 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 Keskkonnakaitseamet 2000. aasta dokumendis (7) soovitatakse kasutada usside kogust, mille puhul kuiva biomassi ja orgaanilise süsiniku üldsisalduse vahetegur 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 sünkroonitakse, nagu on kirjeldatud 5. liites. Pärast 10–14 ööpäeva kestvat regenereerumist 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 valgustustihedust (nt 100–500 luksit), et jäljendada settepinna iseloomulikke looduslikke tingimusi, ning selle väärtust tuleks kokkupuuteperioodi vältel mõõta vähemalt ühel korral. Temperatuur peaks olema kogu katse vältel 20 ± 2 °C. Samal temperatuuri mõõtmise päeval ei tohiks katsenõude vaheline temperatuurierinevus olla suurem kui ± 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 settepinna 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.
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 ₃ 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 ₄ ⁺ või NH ₃ sisaldusena või ammoniaaklammastiku üldsisaldusena milligrammides liitri kohta.

Kui veekvaliteedi näitajate mõõtmiseks on vaja nõudest eemaldada märkimisväärset kogust 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 settepinna). 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 setteosakekestest 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. 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:
- ussid, kes ei reageeri nõrgale mehaanilisele ärritajale;
 - ussid, kellel täheldatakse lagunemise tundemärke (koos alapunktis a kirjeldatuga);
 - puuduvad ussid.
- Elus ussid võib jagada järgmisse kolme rühma:
- suured (täiskasvanud) terviklikud ussid, kellel puuduvad regenereerunud kehapiirkonnad;
 - terviklikud ussid, kellel esineb heledamaid regenereerunud kehapiirkondi (st ussid, kellel on uus eesosa, uus tagaosaga või nii üks kui ka teine);
 - 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 tulemuste 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. Kaalukaunid pannakse kuivatuskappi temperatuurile 100 ± 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 seedekulglas olevast allaneelatud 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 tasakaalustusetapi 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 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 arvil 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 märke sette kaal.
56. Kui on vaja analüüsida uuritava kemikaali sisaldust ka poorides olevas vees, tuleks homogeniseeritud ja kaalutud setteproovi poorivee eraldamiseks tsentrifuugida. Näiteks võib 250-milliliitri mahuga tsentrifuugitopsid täita umbes 200 ml märke settega. Seejärel tuleks proove poorivee eraldamiseks ilma filtrimata tsentrifuugida näiteks 30–60 minutit kiirendusel $10\,000 \pm 600$ g temperatuuril, mis ei ületa katses kasutatavat temperatuuri. Pärast tsentrifuugimist 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, ekstraerimismeetodite 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 väiksemal 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 proovivõtu-seadmele 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 partiiist võetud representatiivse osaproovi kuivmass.

61. Ehkki suremust ei kasutata käesoleva katsemeetodi 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 massibilanssi katsesüsteemis (vt punkt 30). Sellisel juhul saab lisateabe 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 keskvaärtusest $x\%$ 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 (väiksemamahulist) kontrollimist p väärtusel $\leq 0,05$. Sellekohased näited on esitatud järgmistes 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 Holmle 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 tildarv ja usside kuivmassina väljendatav biomass) 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. Teave käesolevat katsemeetodit käsitlevas võrdlusuuringus hüpoteesi kontrollimise käigus arvatud statistilise võimsuse kohta on esitatud 6. liites.
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, jaotuskoeffitsient 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);
- katseplaan (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, proovivõtusagedus);
- 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;
- 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_x, NOEC ja/või LOEC) hinnanguline väärtus ja selle leidmiseks kasutatud statistilised meetodid;
- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõikide selliste analüüside 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.
- (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. Streløke, 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.
- (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 ¹⁴C-17 α -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., Ludwighowski, 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.
- (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 Fournier, 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.
- (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, Pariis, 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.

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_x – 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 oktanool/vesi (K_{ow} ; mõnikord kasutatakse ka tähist P_{ow}) – *n*-oktanoolis 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 veorganismides 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.

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 NaHCO_3 lahustatakse deioniseeritud vees ja lahuse ruumala viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini.d) *Kaaliumkloriidi lahus*0,23 g 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 $K_{\text{S4,3}}$ 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”.

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.

4. liide

Soovitav 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 ≤ 2 mm, kusjuures > 50 % osakestest peaks olema vahemikus 50–200 μm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	20 ± 1
Sööt	Nt pulbristatud nõgeselehed (<i>folia urticae</i>), kõrvenõgese (<i>Urtica dioica</i>) peeneks jahvatatud lehed (osakeste suurus $\leq 0,5$ mm), farmaatsiastandarditele vastavad, inimtarbimiseks ette nähtud; lisatakse kuivale settele	0,4–0,5
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	$2 \pm 0,5$
Kaltsiumkarbonaat	CaCO_3 , pulbristatud, keemiliselt puhas; lisatakse kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Elektrijuhtivus ≤ 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 nitrititseeimist –, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikkast nõgeselehtede pulbrist tselluloosiga (nt keemiliselt puhta pulbrilise α -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 CaCO_3 abil väärtusele $5,5 \pm 0,5$. Suspensiooni hoitakse ettevaatlikult segades vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril 20 ± 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 (lüiv 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 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 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 kvartslüüv, sete jaotatakse katses kasutatavatesse paralleelnõudesse 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 turbaspensiooniga (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.

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 tükid. 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 settepinnast 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 settepinnal cm² kohta), millele 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 värske 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 toitunud, kuni pea- või sabaosa on regenereerinud (nt allikad 7, 8). See tähendab, et *L. variegatus*'e puhul ei ole kokkupuude saastunud sette allaneelamise kaudu pidev.

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 toitunud, 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, kellele soovitatavalt ei esine hiljutise morfallaksise tunnuseid. Valitud ussid võib asetada alusklaasile tilka kultiveerimisvettesse ja need keha keskosast skalpelliga pooleks lõigata. Tuleks jälgida, et tagaosade suurus oleks sarnane. Seejärel tuleks tagaosadel lasta regenereerida uus peaosas kultiveerimisnõudes, 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 tavapärase kultuuris, kuid sünkroonitud usside söötmiseks võib olla soovitatav kasutada sama sööta kui katses. Usse tuleks hoida katses kasutataval temperatuuril 20 ± 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
Vesistöksikologian laboratorio
Biologian laitos
Yliopistokatu 7, PL 111
FIN-80101 Joensuu
Soome

Technische Universität Dresden
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommstr. 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

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., Ludwighowski, 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.

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
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Laboritevaheline keskmine	29,59		20,10		30,61		13,26	
SH	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
Minimaalne	16,3				15,0			
Maksimaalne	42,0				43,7			
V (%)	28,1				24,7			

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
Laboritevaheline keskmine	25,15		20,36		27,68		17,53	
SH	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
Minimaalne	12,9				10,5			
Maksimaalne	41,3				41,4			
V (%)	31,3				26,8			

Tabel 3.

Pentaklorofenooli mürgisus: kokkuvõtlikud andmed võrdlusuuringus kasutatud lõppnäitajate kohta – EC₅₀, NOEC ja LOEC laboritevaheline keskvärtus; 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)
Usside üldarv	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	VTE (%)	22,5	7,1	39,1				
Usside summaarne kuivmass	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	VTE (%)	24,8	10,9	44,7				
Suremus/elulemus	LC ₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Sigivus (usside arvu suurene mine paralleelproovi kohta)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	VTE (%)	29,7	13,9	47,9				
Kasv (biomassi suurenemine paralleelproovi kohta)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	VTE (%)	32,2	13,6	65,2				

VTE – väikseim tuvastatav erinevus kontrollväärtusest hüpoteesi kontrollimise ajal; kasutatakse statistilise võimsuse 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.

C.36. RÖÖVLESTA (*HYPOASPIS (GEOLAE LAPS) ACULEIFER*) SIGIVUSE KATSE MULLAS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 226 (2008). Katsemeetod on ette nähtud selleks, et hinnata mullas esinevate kemikaalide mõju mullas elavale lestaliigile *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (sugukond *Laelapidae*, alamklass *Acarì*) ning teha seeläbi kindlaks populatsiooni kasvu erikiiruse vähenemise hinnanguline määr (1, 2). Sigivuse määra all mõeldakse siin noorloomade arvu katseperioodi lõpus. *H. aculeifer* esindab täiendavat troofilist taset nende liikide kõrval, kelle jaoks katsemeetodid on juba olemas. Leitakse, et käesolev katsemeetod on sigivuskatse jaoks piisav ning paljunemistsükli eri etappide eristamine ja eraldi hindamine ei ole vajalik. Keemiliste ainete puhul, millega kokkupuude toimub muul viisil kui mulla kaudu, võib sobida mõni muu lähenemisviis (3).
2. Lesta *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* peetakse sobivaks mullafauna ja eelkõige röövlestade esindajaks. See liik on ülemaailmse levikuga (5) ning neid lesti saab hõlpsalt koguda ja laboris kasvatada. Ülevaade *H. aculeifer*'i bioloogia kohta on esitatud 7. liites. Taustteave kõnealuse liigi lestade ökoloogia kohta ja nende kasutamise kohta ökotoksikoloogilistes katsetes on kättesaadav allikates 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ja 12.

KATSE PÕHIMÕTE

3. Täiskasvanud emasloomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on eri kontsentratsioonides segatud mullaga. Katset alustatakse 10 täiskasvanud emasloomaga paralleelnõu kohta. Isasloomi katsesse ei kaasata, kuna kogemusest nähtub, et isaste juuresolekul pairituvad emased kohe või veidi aega pärast deutoniimi staadiumile järgnevat koorumist. Peale selle muudaks isaste lisamine katse nii palju pikemaks, et tekiks vajadus keerulise vanuserühmade eristamise järele. Seepärast ei hõlma katse paaritumist. Emasloomadega alustatakse katset 28–35 päeva pärast sünkroonimiseks vajaliku munemisperioodi algust (vt 4. liide), sest siis võib emasloomad lugeda juba paaritunuks ja munemiseelse etapi läbinuks. Kui katse tehakse temperatuuril 20 °C, lõpeb see 14. päeval pärast emasloomade viimist katsenõusse (katse alustamise päev); selle aja jooksul jõuavad esimesed järglased kontrollrühmas deutoniimi staadiumisse (vt 4. liide). Peamise mõõdetava muutujana määratakse noorloomade arv katsenõu kohta ja lisaks määratakse ellujäänud emasloomade arv. Uuritava kemikaaliga kokku puutuvate lestade sigivuse määra võrreldakse vastava näitajaga kontrollrühmas ning olenevalt katseplaanist (vt punkt 29) tehakse kindlaks kas EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (mõisted on määratletud 1. liites). Katse ülevaatlik ajakava on esitatud 8. liites.

TEAVE UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

4. Soovitatavalt peaks olema teada uuritava kemikaali lahustuvus vees, $\log K_{ow}$, jaotuskoefitsient süsteemis muld/vesi ja aururõhk. Samuti on soovitatav lisateabe olemasolu uuritava kemikaali säilivuse kohta mullas, näiteks kemikaali biootilise ja abiootilise lagunemise kiirus.
5. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka vees lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga töötlemise viis on neil kahel juhul siiski erinev. Katsemeetodit ei saa kasutada lenduvate kemikaalide puhul, mille Henry konstant või jaotuskoefitsient süsteemis õhk/vesi on suurem kui üks, ega kemikaalide puhul, mille aururõhk 25 °C juures on suurem kui 0,0133 Pa.

KATSE NÕUETEKOHASUS

6. Katsetulemus loetakse nõuetekohaseks, kui kemikaaliga mitte kokku puutuvast kontrollrühmas on täidetud järgmised kriteeriumid:
 - emasloomade keskmine suremus ei tohiks katse lõpus olla suurem kui 20 %;
 - noorloomade keskmine arv paralleelproovi kohta peaks katse lõpuks olema vähemalt 50 (kui katset alustatakse 10 täiskasvanud emasloomaga);
 - paralleelnõu kohta saadud noorte lestade keskmise arvu variatsioonikordaja ei tohiks lõpliku katse lõpus olla suurem kui 30 %.

VÕRDLUSKEMIKAAL

7. Tuleb määrata võrdluskemikaali EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon, et tagada laboris kasutatavate katsetingimuste sobivus ja veenduda, et katseorganismide reaktsioon ei ole aja jooksul muutunud. Sobiv võrdluskemikaal on dimetooat (CASi nr 60-51-5), mille mõju populatsiooni arvukusele on tõendatud (4). Teise võimaliku võrdluskemikaalina võib kasutada boorhapet (CASi nr 10043-35-3). Viimati nimetatud kemikaaliga on vähem kogemusi. On võimalik kasutada kahte lähenemisviisi.
 - Võrdluskemikaali võib hinnata samaaegselt iga uuritava kemikaali mürgisuse määramisega, kasutades ühte kontsentratsiooni, mille puhul on kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse uuringuga eelnevalt tõendatud, et järglaste arv väheneb > 50 % võrra. Sellisel juhul peaks paralleelproovide arv olema sama kui kontrollrühmas (vt punkt 29).
 - Teise võimalusena tehakse katse võrdluskemikaaliga 1–2 korda aastas kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse katsena. Olenevalt valitud lähenemisviisist on kontsentratsioonide ja paralleelproovide arv ning kontsentratsioonide jada tegur erinevad (vt punkt 29), ent saavutatava mõju määra peaks jääma vahemikku 10–90 % (jada tegur 1,8). Noorloomade arvu põhjal leitav EC₅₀ peaks dimetooadi puhul jääma vahemikku 3,0–7,0 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Boorhappe puhul peaks noorloomade arvu põhjal leitav EC₅₀ jääma praeguseks saadud andmete kohaselt vahemikku 100–500 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta.

KATSEMEETODI KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

8. Tuleks kasutada klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist ja tihedalt sulguva kaanega katsenõusid läbimõõduga 3–5 cm (mullakihi paksus $\geq 1,5$ cm). Eelistatakse keeratava kaanega nõusid ning sel juhul tuleks neid aereerida kaks korda nädalas. Teise võimalusena võib kasutada katet, mis võimaldab otsest gaasivahetust substraadi ja atmosfääri vahel (nt marli). Kuna niiskusesisaldus peab katse vältel olema piisavalt suur, on väga oluline kontrollida katse kestel iga katsenõu kaalu ja vajaduse korral vett juurde lisada. See võib olla eriti oluline juhul, kui ei kasutata keeratavaid kaasi. Läbipaistmatu katsenõu kasutamise korral peaks kaas olema valguse juurdepääsu võimaldavast materjalist (nt läbipaistev augustatud kaas), kuid samal ajal takistama lestade põgenemist. Katsenõu suurus ja tüüp sõltuvad ekstraheerimismeetodist (üksikasjalik kirjeldus on esitatud 5. liites). Kui kuumusega ekstraheerimine viiakse läbi otse katsenõus, võib lisada sobiva suurusega avadega põhjavõrgu (kuni ekstraheerimiseni kinni kaetud) ning mulla sügavus peaks olema temperatuuri ja niiskuse gradiendi tekkimiseks piisav.
9. On vaja tavapäraseid laboriseadmeid, täpsemalt järgmist:
 - soovitatavalt klaasnõud keeratava kaanega;
 - kuivatuskapp;
 - stereomikroskoop;
 - harjad lestade teisaldamiseks;
 - pH-meeter ja fotomeeter;
 - sobiv täpne kaal;
 - sobivad temperatuuri reguleerimise seadmed;
 - sobivad õhuniiskuse reguleerimise seadmed (ei ole hädavajalikud, kui kokkupuutenõu on kaanega);
 - reguleeritava temperatuuriga inkubaator või väike ruum;
 - ekstraheerimisseadmed (vt 5. liide) (13);
 - reguleeritava ülaltvalgustusega valguspaneel;
 - purgid ekstraheeritud lestade kogumiseks.

Kunstliku mulla valmistamine

10. Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse kunstlikku mulda. See koosneb järgmistest koostisosadest (kõik väärtused põhinevad kuivmassil):
- 5 % turbasamblaturvast, mis on õhu käes kuivatatud ja peeneks jahvatatud (lubatav osakeste suurus on 2 ± 1 mm);
 - 20 % kaoliinsavi (soovitav kaoliiniisisaldus üle 30 %);
 - umbes 74 % tööstuslikku liiva (sõltuvalt vajalikust CaCO_3 kogusest), mis on õhu käes kuivatatud ja koosneb peamiselt peenest liivast, millest üle 50 % moodustavad osakesed suurusega 50–200 mikromeetrit. Liiva täpne kogus sõltub CaCO_3 kogusest (vt allpool): nende koostisosade summaarne osakaal peaks olema 75 %;
 - < 1,0 % kaltsiumkarbonaati (CaCO_3 , pulbristatud, analüütilise puhtusastmega), et saavutada pH väärtus $6,0 \pm 0,5$; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda eelkõige turba kvaliteedist ja omadustest (vt märkus 1).

Märkus 1: vajalik CaCO_3 kogus sõltub mullasubstraadi koostisosadest ja tuleks mulla osaproovide pH mõõtmise teel kindlaks teha vahetult enne katset (14).

Märkus 2: kunstliku mulla turbasisaldus erineb mullaorganismide puhul kasutatavate muude katsemeetoditega ette nähtud turbasisaldusest, mis on enamikul juhtudel 10 % (nt allikas 15). Euroopa Taimekaitseorganisatsiooni (EPPO) andmetel (16) ei sisalda tüüpiline põllumajanduslik muld siiski üle 5 % orgaanilist ainet ning seega peegeldab väiksem turbasisaldus loodusliku mulla väiksemat võimet tagada uuritava kemikaali sorbeerumine orgaanilisele süsinikule.

Märkus 3: vajaduse korral, näiteks katse konkreetsete eesmärkide saavutamiseks võib katse- ja/või kultiveerimis-substraadina kasutada ka saastevabast allikast pärit looduslikku mulda. Loodusliku mulla kasutamisel tuleks esitada vähemalt selle päritolu (kogumiskoht), pH, lõimis (osakeste suurusjaotus) ja orgaanilise aine sisaldus. Võimaluse korral tuleks lisada ka mulla tüüp ja nimetus vastavalt mulla klassifitseerimissüsteemile ning selline muld peaks olema saastevaba. Kui uuritav kemikaal on metall või metallorgaaniline ühend, tuleks määrata ka loodusliku mulla kationivahetusmahtuvus. Nõuetekohasuse kriteeriumide täitmisele tuleks pöörata erilist tähelepanu, kuna üldjuhul on taustteave loodusliku mulla kohta harva kättesaadav.

11. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (nt suure mahutavusega laborisegistis). Mulla pH mõõtmiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahuse segu suhtega 1:5 (vt allikas 14 ja 3. liide). Kui mulla happesus on suurem kui nõutavasse vahemikku jäävad väärtused (vt punkt 10), võib selle reguleerimiseks lisada sobiva koguse CaCO_3 . Kui muld on liiga leeliseline, võib happesuse suurendamiseks lisada punktis 10 kirjeldatud esimesest kolmest koostisosast koosnevat segu, millest on välja jäetud CaCO_3 .
12. Kunstliku mulla maksimaalne veemahutavus määratakse vastavalt 2. liites kirjeldatud meetodile. Kaks kuni seitse päeva enne katse alustamist eelnevalt kuiva kunstlikku mulda piisava koguse destilleeritud või deioniseeritud vee lisamise teel, et saavutada veesisaldus, mis on umbes poole väiksem kui lõplik veesisaldus, mis jääb vahemikku 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Niiskusesisaldus viiakse 40–60 protsendini maksimaalsest veemahutavusest, lisades uuritava kemikaali lahust ja/või destilleeritud või deioniseeritud vett (vt punktid 16–18). Mulla niiskusesisalduse täiendavaks ligikaudseks kontrollimiseks tuleks mulda õrnalt peos pigistada: sobiva niiskusesisalduse korral peaksid sõrmede vahele ilmuma väikesed veetilgad.
13. Mulla niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus vastavalt standardile ISO 11465 (17), kuivatades mulda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu, ning mulla pH määratakse vastavalt 3. liitele või standardile ISO 10390 (14). Nende mõõtmiste tegemiseks tuleks kasutada lestadeta lisaproove nii kontrollmullast kui ka igale katsekontsentratsioonile vastavast mullast. Kui katses kasutatakse happelist või aluselist kemikaali, ei tohiks mulla pH-d muuta. Niiskusesisaldust tuleks jälgida kogu katse vältel, kaaludes nõusid korrapäraselt (vt punktid 20 ja 24).

Katseloomade valimine ja ettevalmistamine

14. Katses kasutatav liik on *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Katse alustamiseks on vaja sünkroonitud kultuurist pärit täiskasvanud emaseid lesti. Lestadega alustatakse katset umbes 7–14 päeva pärast nende täiskasvanuks saamist ehk 28–35 päeva pärast sünkroonimiseks vajaliku munemisperioodi algust (vt punkt 3 ja 4. liide). Tuleks registreerida lestade päritolu või tarnija ja laborikultuuri säilitamise andmed. Laborikultuuri säilitamise korral soovitatakse viia liigi kinnitav määramine läbi vähemalt kord aastas. Määramiseks kasutatav vorm on esitatud 6. liites.

Katsekontsentratsiooniga segude valmistamine

15. Uuritav kemikaal segatakse mulla sisse. Orgaanilised lahustid, mis hõlbustavad mulla töötlemist uuritava kemikaaliga, tuleks valida lähtuvalt nende vähesest mürgisusest lestadele ning katseplaani tuleb lisada asjakohane lahustiga kontroll (vt punkt 29).

Vees lahustuv uuritav kemikaal

16. Uuritava kemikaali lahus valmistatakse deioniseeritud vees sellises koguses, millest piisab kõikidele ühe katsekontsentratsiooni puhul kasutatavatele paralleelkultuuridele. Soovitatakse kasutada sobivas koguses vett, et saavutada nõutav niiskusesisaldus, st 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest (vt punkt 12). Enne katsenõusse viimist segatakse uuritava kemikaali iga lahus põhjalikult ühe partii eelniisutatud mullaga.

Vees lahustumatu uuritav kemikaal

17. Vees lahustumatu, kuid orgaanilises lahustis lahustuva kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses koguses sobivas kandeaines (nt atsetoonis). Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kandeaine kasutamisel tuleks kõikide katsekontsentratsioonide ja kontrollrühma puhul kasutada kandeaine sama miinimumkogust. Kandeaine pihustatakse väikesele kogusele, näiteks 10 grammile peenele kvartslüivale või segatakse sellega. Substraadi liivasisaldust tuleks selle koguse võrra muuta. Kandeaine kõrvaldatakse vähemalt üks tund kestva tõmbekapis aurustamise teel. Kvartslüiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu viiakse katsenõudesse. Tuleb arvestada, et mõni lahusti võib olla lestadele mürgine. Seepärast on juhul, kui lahusti mürgisus lestadele ei ole teada, soovitatakse kasutada täiendavat veega kontrolli, mis ei sisalda lahustit. Kui on veenvalt tõendatud, et lahusti ei avalda (kasutatavatel kontsentratsioonidel) mingit mõju, võib veega kontrolli ära jätta.

Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuva uuritav kemikaal

18. Vees ja orgaanilistes lahustites raskesti lahustuva kemikaali puhul segatakse soovitava katsekontsentratsiooni saavutamiseks vajalik kogus uuritavat kemikaali sellise koguse peeneks jahvatatud kvartslüivaga, mis vastab 2,5 grammile katsenõu kohta (nt 10 g peent kvartslüiva nelja paralleelnõu kohta). Substraadi liivasisaldust tuleks selle koguse võrra muuta. Kõnealune kvartslüiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelniisutatud mullale ja pärast nõutava niiskusesisalduse saavutamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist segatakse saadav segu põhjalikult läbi. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Kirjeldatud toiminguid korratakse iga katsekontsentratsiooni puhul ning valmistatakse ka sobiv kontrollsegu.

KATSE KÄIK**Katse- ja kontrollrühmad**

19. Iga kontroll- ja katsenõu puhul soovitatakse lisada 10 täiskasvanud emaslooma kunstlikusse mulda kuivmassiga 20 g. Katseorganismid tuleks lisada kahe tunni jooksul pärast lõpliku katsesubstraadi valmistamist (st pärast uuritava kemikaali lisamist). Erijuhul (nt kui vanandamist peetakse määravaks teguriks) võib lõpliku katsesubstraadi valmistamisest lestade lisamiseni jäävat ajavahemikku pikendada (sellist vanandamist käsitletakse üksikasjalikult allikas 18). Sellisel juhul tuleb aga esitada asjakohane teaduslik põhjendus.

20. Pärast lestade lisamist mullale lisatakse lestade sööt ja seejärel tuleks määrata iga katsenõu algsaal, et kasutada seda võrdlusalusena mulla niiskusesisalduse jälgimiseks katse vältel vastavalt punktis 24 kirjeldatule. Seejärel kaetakse katsenõud punktis 8 kirjeldatud viisil ja paigutatakse katsekambrisse.
21. Iga punktides 15–18 kirjeldatud meetodi puhul, mida kasutatakse uuritava kemikaaliga töötlemiseks, valmistatakse ka asjakohased kontrollkultuurid. Selleks järgitakse asjaomast kirjeldatud meetodit, ent ainsa erinevusena jäetakse uuritav kemikaal lisamata. Seega töödeldakse kontrollkultuure vajaduse korral orgaanilise lahusti, kvartslüüva või muu kandeainega, kasutades sama kontsentratsiooni või koguselist määra kui uuritava kemikaaliga kultuuride puhul. Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustit või muud kandeainet ja selle mürgisus ei ole teada, tuleks katses kasutada veel ühte kandeainet ja uuritava kemikaalita kontrolli (vt punkt 17).

Katsetingimused

22. Katsetemperatuur peaks olema 20 ± 2 °C. Temperatuur tuleks registreerida vähemalt kord päevas ja vajaduse korral tuleks seda reguleerida. Katses kasutatakse kontrollitavat valgustusrežiimi (soovitavalt 16 tundi valgust ja 8 tundi pimedust) ja katsenõude läheduses valgustustihedust 400–800 luksit. Võrdlemise võimaldamiseks on need tingimused samad kui muude ökotoksikoloogiliste mullakatsete puhul (nt allikas 15).
23. Kui kasutatakse keeratavaid kaasi, tuleks gaasivahetuse tagamiseks aereerida katsenõusid vähemalt kaks korda nädalas. Kui kasutatakse marlikatet, tuleks pöörata erilist tähelepanu mulla niiskusesisalduse säilitamisele (vt punktid 8 ja 24).
24. Katsenõus oleva mullasubstraadi veesisaldus hoitakse kogu katse vältel konstantsena; selleks kaalutakse nõusid korrapäraselt (nt kord nädalas) ja lisatakse vajaduse korral vett juurde. Võimaliku veekao korvamiseks lisatakse deioniseeritud vett. Niiskusesisaldus ei tohiks katse kestel erineda algväärtusest rohkem kui 10 %.

Söötmine

25. On leitud, et söödaks sobib juustulest (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)). Samuti võivad söödaks sobida väikesed hooghännalised (nt noorloomad liigist *Folsomia candida* Willem, 1902 või *Onychiurus fimatus*) (19, 20), valgeliimuklased (nt *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992)) ja ümarussid (nt *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). Sööta soovitatakse enne katses kasutamist kontrollida. Sööda liik ja kogus peaksid olema sellised, millega saadakse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmiseks piisav arv noorloomi (punkt 6). Saakloomade valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali toimemehhanismi (nt akaritsiidid võivad olla mürgine ka söödaks kasutatavatele lestadele; vt punkt 26).
26. Sööt peaks olema kättesaadav *ad libitum* (st iga kord lisatakse väike kogus (spaatliotsatäis)). Selleks otstarbeks võib kasutada ka hooghännalisi käsitlevas katsemeetodis kirjeldatud väikese võimsusega imurit või väikest värvipintsli. Tavaliselt piisab, kui lisada sööta katse alguses ja seejärel kaks kuni kolm korda nädalas. Kui ilmneb, et uuritav kemikaal on saakloomadele mürgine, tuleks kaaluda söötmissageduse suurendamist ja/või muu sööda kasutamist.

Katsekonsentratsioonide valimine

27. Sobivate katsekonsentratsioonide valimisel on kasu varasemast teabest uuritava kemikaali mürgisuse kohta, näiteks kontsentratsioonivahemiku leidmise katse tulemustest. Vajaduse korral tehakse kontsentratsioonivahemiku leidmise katse, kasutades viit uuritava kemikaali kontsentratsiooni vahemikus 0,1–1 000 mg kuiva mulla kilogrammi kohta ning iga kontsentratsiooni ja kontrolli puhul vähemalt ühte paralleelproovi. Kontsentratsioonivahemiku leidmise katse kestus on 14 päeva; seejärel määratakse täiskasvanud lestade suremus ja noorloomade arv. Lõplikus katses tuleks kontsentratsioonivahemik soovitavalt valida nii, et see hõlmaks kontsentratsioone, mille juures täheldatakse mõju noorloomade arvule, kuid mitte täiskasvanud emasloomade elulemusele. Kemikaalide puhul, mis avaldavad surmavat ja subletaalset mõju peaaegu samal kontsentratsioonil, ei pruugi see siiski võimalik olla. Katses kasutatav kontsentratsioonivahemik peaks hõlmama EC_x (nt EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) väärtust ja kontsentratsioonivahemikku, mille puhul uuritav kemikaal avaldab huvipakkuvat mõju. Ekstrapoleerimist väärtuseni, mis on oluliselt väiksem kui väikseim kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse mõju katseorganismidele, või suurem kui suurim katses kasutatav kontsentratsioon, tuleks kasutada üksnes erandjuhul ja selle kohta tuleks katseprotokollis esitada ammendav selgitus.

Katseplaan

Kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse katse

28. Ühe muu võrdlusuuringu (valgeliimuklaste sigivuse katse (22)) alusel välja töötatud soovitudest lähtuvalt pakutakse välja kolm katseplaani. *H. aculeifer*iga tehtud valideerimise tulemused kinnitavad kõikide kõnealuste katseplaanide üldist sobivust.
29. Kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramisel tuleks meeles pidada järgmist.
 - EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) määramiseks tuleks katses kasutada kahteist kontsentratsiooni. Soovitatakse kasutada vähemalt kahte paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja kuut paralleelnõu kontrollrühmas. Kontsentratsioonide jada tegur võib varieeruda, st olla eeldatavas mõju avaldumise vahemikus 1,8 või väiksem ning sellest vahemikust väljaspool olevate suuremate ja väiksemate kontsentratsioonide puhul üle 1,8.
 - Täheledatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni määramiseks tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 2,0.
 - Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii täheledatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni kui ka EC_x . Tuleks kasutada kaheksat uuritava kemikaali kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitatakse kasutada nelja paralleelnõu kontsentratsiooni kohta ja lisaks kaheksat kontrollnõu. Kontsentratsioonide jada tegur ei tohiks olla suurem kui 1,8.

Piirsalduskatse

30. Kui kontsentratsioonivahemiku leidmise katses ei täheledata suurimal kasutatud kontsentratsioonil (nt kontsentratsioonil 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta) mingit mõju, võib lõpliku sigivuskatse teha piirsalduskatsena, kasutades kontsentratsiooni 1 000 mg mulla kuivmassi kilogrammi kohta. Piirsalduskatse võimaldab tõendada, et täheledatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon või EC_{10} on sigivuse puhul suurem kui kõnealune piirkontsentratsioon, ning samal ajal minimeerida katses kasutatavate lestade arvu. Nii uuritava kemikaaliga mulla kui ka kontrollmulla puhul tuleks kasutada kaheksat paralleelnõu.

Katse kestus ja mõõtmised

31. Kõik täheledataud erinevused uuritava kemikaaliga nõudes ja kontrollnõudes olevate lestade käitumises ja morfoloogias tuleks registreerida.
32. Ellujäänud lestad eemaldatakse mullast 14. katsepäeval kuumusega/valgusega ekstraheerimise teel või muu sobiva meetodiga (vt 5. liide). Noorloomad (st vastsed, protonümfid ja deutonümfid) ja täiskasvanud loomad loendatakse eraldi. Ekstraheerimise käigus leidmata jäänud täiskasvanud lestad registreeritakse surnud lestadena, kuna eeldatavalt surid nad ja lagundati enne hindamist. Ekstraheerimise tõhusust tuleb kontrollida kord või kaks aastas, kasutades kontrollrühma, milles täiskasvanud ja noorloomade arv on teada. Ekstraheerimise keskmine tõhusus peaks kõiki arenguetappe hõlmavate koondtulemuste puhul olema üle 90 % (vt 5. liide). Täiskasvanud ja noorloomade arvu ei korrigeerita ekstraheerimise tõhususe suhtes.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

33. Teave statistiliste meetodite kohta, mida võib kasutada katsetulemuste analüüsimiseks, on esitatud punktides 36–41. Peale selle tuleks tutvuda OECD dokumendiga nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” („Praegused meetodid ökotoksilisuse andmete statistiliseks analüüsiks: rakendamissuunised”) (31).
34. Katse peamine lõppnäitaja on sigivus, mida siin väljendatakse katsenõu kohta saadud noorloomade arvuna (alustades katset 10 täiskasvanud emasloomaga). Statistilise analüüsi käigus tuleb arvutada sigivuse määra aritmeetiline keskmine (X) ja hajuvus (s^2) uuritava kemikaaliga rühmades ja kontrollrühmas. Näitajaid X ja s^2 kasutatakse selliste dispersioonanalüüsi meetodite puhul nagu Studenti t-test, Dunnetti test või Williamsi test, samuti usaldusvahemiku leidmiseks usaldusnivool 95 %.

Märkus: kõnealune peamine lõppnäitaja on samaväärne sigivuse määraga, mida väljendatakse katses saadud elus noorloomade arvu ja katse alguses lisatud täiskasvanud emasloomade arvu jagatisena.

35. Ellujäänud emasloomade arv kemikaalita kontrollrühmas on üks oluline nõuetekohasuse kriteerium ja see tuleb registreerida. Sarnaselt kontsentratsioonivahemiku leidmise katsele tuleks lõpp-protokolli märkida ka kõik muud kahjuliku mõju ilmingud.

EC_x

36. Punktis 34 kirjeldatud näitajat iseloomustavad 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). EC_x leidmiseks sisestatakse kasutatavasse võrrandisse kontrollproovide keskvaartusest x % moodustav väärtus. EC₅₀ või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleks kasutatud kontsentratsioonidele vastavate keskmiste (X) suhtes kohaldada regressioonanalüüsi.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon / vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon

37. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha kindlaks täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon või vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon, on vaja statistilisi andmeid iga nõu kohta (eraldi nõusid käsitletakse paralleelproovidenäidena). Tuleks kasutada asjakohaseid statistilisi meetodeid kooskõlas OECD dokumendiga nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”. Uuritava kemikaali pärssiva mõju hindamiseks kontrollrühmaga võrreldes kasutatakse üldjuhul hüpoteesi ühepoolset (väiksemamahulist) kontrollimist p väärtusel $\leq 0,05$. Sellekohased näited on esitatud järgnevatel punktides.
38. Andmete normaaljaotust saab kontrollida näiteks andmete mudeliga sobivuse hindamiseks kasutatava Kolmogorovi-Smirnovi testi, variatsiooniulatus 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 (ANOVA) ja järgnevaid 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 mitmese võrdluse testi (nt Dunnett'i t-testi) või muutujate sammuviisilise elimineerimisega trenditesti (kontsentratsiooni ja mõju vahelise monotoonse sõltuvuse korral nt Williamsi testi) (soovitava testi valimisel lähtutakse OECD dokumendist nr 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”). Et määrata LOEC ja NOEC, tuleks kasutada mitteparameetrilist meetodit (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmille või Jonckheere'i-Terpstra trenditesti).

Piirsalduskatse

39. Kui on tehtud piirsalduskatse (kontrollrühma võrdlemine ainult ühele kontsentratsioonile vastava katserühmaga) ja parameetrilise testi eeldused (normaaljaotus, homogeensus) on täidetud, võib arvulise tunnuse 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.
40. 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.

Katseprotokoll

41. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

— Uuritav kemikaal:

- uuritava kemikaali identifitseerimisandmed, nimetus, partii, CASi number, puhtus;
- uuritava kemikaali füüsikalised-keemilised omadused (nt log K_{ow}, vees lahustuvus, aururõhk, Henry konstant (H) ja soovitatavalt teave kemikaali säilivuse kohta mullas).

— Katseorganismid:

- katseorganismide identifitseerimisandmed ja tarnija, kultiveerimistingimuste kirjeldus;
- katseorganismide vanusevahemik.

- *Katsetingimused:*
 - katseplaani ja katse läbiviimise kirjeldus;
 - katsemulla valmistamise üksikasjad; loodusliku mulla kasutamise korral mulla üksikasjalikud andmed (päritolu, taust, osakeste suurusjaotus, pH, orgaanilise aine sisaldus ja võimaluse korral mulla klassifitseerimisandmed);
 - mulla maksimaalne veemahutavus;
 - selle meetodi kirjeldus, mida kasutati mulla töötlemiseks uuritava kemikaaliga;
 - üksikasjad abikemikaalide kohta, mida kasutati uuritava kemikaaliga töötlemiseks;
 - katsenõude suurus ja katsemulla kuivmass nõu kohta;
 - katsetingimused: valgustustihedus, valgus- ja pimedusperioodi kestus, temperatuur;
 - söötmissrežiimi kirjeldus, kates kasutatud sööda liik ja kogus, söötmisskuupäevad;
 - mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja kestel (kontrollrühmas ja igas uuritava kemikaaliga rühmas);
 - ekstraheerimismeetodi üksikasjalik kirjeldus ja ekstraheerimise tõhusus.
- *Katsetulemused:*
 - noorloomade arv igas katsenõus katse lõpus;
 - täiskasvanud emasloomade arv ja täiskasvanud loomade suremus (%) igas katsenõus katse lõpus;
 - ilmsete sümptomite ja selgete käitumuslike muutuste kirjeldus;
 - võrdluskemikaaliga saadud tulemused;
 - kokkuvõtlikud näitajad (EC_x ja/või täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) koos usalduspiiridega usaldusnivool 95 % ning nende arvutamise meetodi kirjeldus;
 - kontsentratsiooni ja mõju vahelise sõltuvuse graafik;
 - kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse ajal täheldatud ebatavalised ilmingud.

KIRJANDUS

- (1) Casanueva, M. E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57: 21–46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pac. Insects* 24: 259–274.
- (3) Bakker, F. M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E. D., ja van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *J. Soils Sediments* 3: 73–77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. väljaanne. Väljaandes: Dahl, F. (toim.), *Die Tierwelt Deutschlands*, 59. Teil. G. Fischer, Jena, 523 lk.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males? Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). Väljaandes: Dusbabek, F., ja Bukva, V. (toim.), *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haag. 1. köide, lk 487–492.
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*, lk 241–249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio, lk 621–628.
- (8) Krogh, P. H., ja Axelsen, J. A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. Väljaandes: Løkke, H., ja van Gestel, C. A. M., *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley and Sons, Chichester, lk 239–251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C. R., Lanno, R. P., Römbke, J., Rundgren, S., ja Van Straalen, N. M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. Väljaandes: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., Van Straalen, N. M., ja Tarazona, J. V. (toim.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 lk.
- (10) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992a). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beitr. N. F.* 34: 395–412.
- (11) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992b). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. N. F.* 34: 413–433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K., ja Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environ. Sci. Technol.* 39: 7154–7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. *Natura Jutlandica* 20, lk 95–122.
- (14) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (15) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- (16) EPPO (2003). EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP / EPPO Bull. 33, lk 195–209.
- (17) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1993). Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., Van Straalen, N. M., ja Tarazona, J. V. (2002). Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. (1981). Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.* 3: 122–125.
- (20) Schlosser, H.-J., ja Riepert, F. (1992c). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). *Zool. Beitr. N. F.* 34: 395–433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M., ja Krogh, P. H. (2007). Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. *Appl. Soil Ecol.* 36: 130–135.
- (22) Käesoleva lisa peatükk C.32 „Valgeliimuklaste sigivuse katse”.
- (23) Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon, Genf.
- (24) Southwood, T. R. E. (1991). Ecological methods: With particular reference to the study of insect populations. (2. väljaanne.) Chapman & Hall, London, 524 lk.
- (25) Dunger, W., ja Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. (2. väljaanne.) G. Fischer, Jena, 539 lk.
- (26) Lesna, I., ja Sabelis, M. W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes” in a soil predatory mite. *Nature* 401: 581–583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol.* 7: 103–107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

-
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zool. Pol.* 24: 11–59.
- (30) Kevan, D. K. McE., ja Sharma, G. D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6: 647–658.
- (31) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54, ENV/JM/MONO (2006)18.
-

1. liide

Mõisted

Käesoleva katsemeetodi puhul kasutatakse järgmisi mõisteid (kõiki kontsentratsioone, mille puhul mõju avaldub teatud kindlal määral, väljendatakse uuritava kemikaali massina katsemulla kuivmassi ühiku kohta).

Kemikaal – aine või segu.

Täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) – 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.

Vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – uuritava kemikaali väiksem kontsentratsioon, mille juures täheldatakse teatava kokkupuuteperioodi vältel kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) mõju.

EC_x (kontsentratsioon, mille puhul toime on x %) – kontsentratsioon, mille juures teatava kokkupuuteperioodi vältel katseorganismidele avalduva mõju ulatus on 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.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks peetakse sobivaks järgmist meetodit. Seda kirjeldatakse standardi ISO/DIS 11268-2 („Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction”) (23) C lisas.

Sobiva proovivõtuseadme (puuriga toru vmt) abil kogutakse kindlaksmääratud kogus (nt 5 g) katsemulda. Toru alumine ots kaetakse filterpaberi tükiga, toru täidetakse veega ja pannakse resti peale veevanni. Toru tuleks vette lasta vähehaaval, kuni veetase on mullapinnast kõrgemal. Seejärel tuleks toru umbes kolmeks tunniks vette jätta. Kuna muld ei suuda hoida kogu kapillaaridesse absorbeerunud vett, tuleks mullaproovil lasta kahe tunni vältel nõrguda, asetades toru väga märja peeneks jahvatatud kvartslüüva kihile, mis paikneb kuivamise ärahoidmiseks suletud nõus. Seejärel tuleks proov kaaluda ning kuivatada seda 105 °C juures, kuni selle kaal enam ei muutu. Veemahutavuse saab seejärel arvutada järgmise valemiga:

$$\text{Veemahutavus (protsentides kuivmassist)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100,$$

kus:

S on veega küllastunud substraadi mass + toru mass + filterpaberi mass;

T on tühi mass (toru mass + filterpaberi mass);

D on substraadi kuivmass.

—

3. liide

Mulla pH määramine

Allpool kirjeldatud meetod mulla pH määramiseks põhineb kirjeldusel, mis on esitatud standardis ISO/DIS 10390 „Soil Quality – Determination of pH” (16).

Kindlaksmääratud mullakogusel lastakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi kuivada. Seejärel valmistatakse vähemalt 5 grammi mulda sisaldav suspensioon, kasutades 1 M analüütilise puhtusastmega kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütilise puhtusastmega kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahust, mille maht on mulla mahust viis korda suurem. Suspensiooni loksutatakse põhjalikult viis minutit ja seejärel lastakse sellel settida vähemalt kaks tundi, kuid mitte kauem kui 24 tundi. Seejärel mõõdetakse vedela faasi pH väärtus pH-meetriga, mis kaliibritakse enne mõõtmist sobiva rea puhverlahustega (nt pH väärtustel 4,0 ja 7,0).

4. liide

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*'i ja söödaks kasutatavate lestade kasvatamine ning kultuuri sünkroonimine**Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*'i kasvatamine**

Kultuure võib säilitada plastnõudes või klaaspurkides, mis on täidetud kipsi ja söepulbri seguga (9:1). Kipsi niiskena hoidmiseks võib vajaduse korral lisada mõne tilga destilleeritud või deioniseeritud vett. Optimaalne kasvatustemperatuur on 20 ± 2 °C; valgus- ja pimedusperioodi pikkus ei ole selle liigi puhul oluline. Saakloomana võib kasutada lesti liigist *Tyrophagus putrescentiae* või *Caloglyphus* sp. (söödaks kasutatavate lestade käsitsemisel tuleb olla ettevaatlik, kuna need võivad inimesel allergiat põhjustada), ent sobivad ka ümarussid, valgeliimuklased ja hooghännalised. Saakloomade päritolu tuleks registreerida. Populatsioon võib tekkida ühestainsast emasloomast, sest isasloomad arenevad viljastamata munarakkudest. Põlvkonnad eksisteerivad suures osas samaaegselt. Emaslooma eluiga võib ulatuda vähemalt 100 päevani ja ta võib muneda elu jooksul umbes 100 muna. Maksimaalne munemissagedus saavutatakse 10–40 päeva pärast täiskasvanuks saamist ja see on 2,2 muna emaslooma kohta päevas. Aeg munast täiskasvanud emaslooma väljaarenemiseni on 20 °C juures umbes 20 päeva. Eelnevalt tuleks säilitada ja kasvatada enam kui ühte kultuuri.

***Tyrophagus putrescentiae* kasvatamine**

Lesti hoitakse klaasnõus, mis on täidetud peene õllepärimipulbriga ja mis paigutatakse põgenemise ärahoidmiseks KNO_3 lahusega täidetud plastämbrisse. Söödaks kasutatavad lestad pannakse selle pulbri pinnale. Seejärel segatakse need spaatli abil ettevaatlikult pulbriga (mida tuleb vahetada kaks korda nädalas).

Kultuuri sünkroonimine

Katses kasutatavad isendid peaksid olema umbes ühevanused (täiskasvanuks saamisest peaks olema möödunud umbes 7 päeva). Kasvatustemperatuuril 20 °C on see saavutatav järgmiselt:

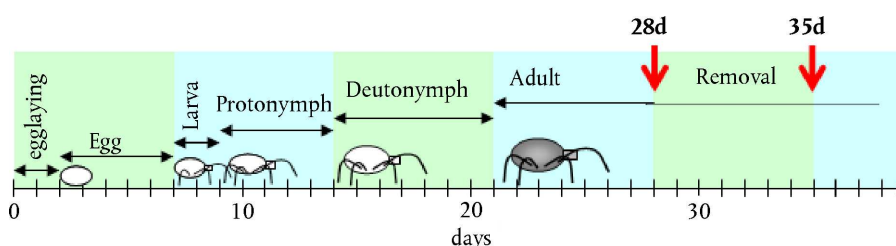
emasloomad viiakse puhtasse kasvatusnõusse ja lisatakse piisavas koguses sööta;

— loomad lastakse kaks kuni kolm päeva muneda ja seejärel emasloomad eemaldatakse;

— 28–35 päeva pärast täiskasvanud emasloomade viimist puhtasse kasvatusnõusse võetakse nõust täiskasvanud emasloomad katse tegemiseks.

Täiskasvanud emasloomi saab muus arenguetapis olevaist loomadest ja isasloomadest hõlpsalt eristada nende suuremate mõõtmete, paisunud kehakuju (isasloomad on peenemad ja lamedad) ja seljakilbi pruuni värvuse järgi: ebaküpsede lestade värvus varieerub valgest kreemikani. Lestade areng temperatuuril 20 °C toimub üldjoontes vastavalt allpool kirjeldatud skeemile (joonis): munastaadium 5 päeva, vastsestaadium 2 päeva, protonümfia staadium 5 päeva, deutonymfia staadium 7 päeva, emaslooma munemiseelne periood 2 päeva. Seejärel on lestad täiskasvanud.

Joonis.

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*'i areng temperatuuril 20 °C. („Eemaldamine” – katses kasutatavate emasloomade eemaldamine.)**

Täiskasvanud katseloomad eemaldatakse sünkroonitud kultuurist ja viiakse katsenõudesse 28–35 päeva pärast seda, kui eelmise põlvkonna emasloomad on alustanud munemist (st 7–14 päeva pärast täiskasvanuks saamist). Sellega tagatakse, et katseloomad on munemiseelse etapi juba läbinud ja kultiveerimisnõus olevate isasloomadega paaritunud. Laborikultuurides tehtud vaatlustest nähtub, et isasloomade juuresolekul paarituvad emasloomad kohe või veidi aega pärast täiskasvanuks saamist (Ruf, Vaninnen, isiklikud tähelepanekud). Seitsme päeva pikkune periood on valitud selleks, et hõlbustada ühildamist laboritöö tavarütmiga ja jätta ruumi individuaalse varieeruvuse jaoks lestade arengus. Munemist peaks alustama vähemalt sama palju emasloomi, kui vajatakse hiljem katse jaoks. Näiteks kui katse jaoks on vaja 400 emaslooma, tuleks lasta vähemalt 400 emasloomal kaks kuni kolm päeva muneda. Sünkroonitud populatsiooni saamiseks on vaja vähemalt 1 200 muna (emasloomade osakaal umbes 0,5; suremus umbes 0,2). Kannibalismi ärahoidmiseks on otstarbekas hoida ühes nõus kõige rohkem 20–30 munevat emaslooma.

5. liide

Ekstraheerimismeetodid

Mikrolüljalgsete puhul on sobiv meetod isendite mullast/substraadist eraldamiseks kuumusega ekstraheerimine (vt joonis allpool). See meetod põhineb organismide aktiivsusel, seega on võimalik registreerida üksnes liikuvad isendid. Kuumusega ekstraheerimise põhimõte seisneb selles, et organismide elutingimusi proovis halvendatakse järk-järgult, mistõttu nad lahkuvad substraadist ja kukuvad fikseerimisvedelikku (nt etanool). Olulised aspektid on seejuures ekstraheerimise kestus ning organismide elutingimuste heast mõõdukaks ja mõõdukast halvaks muutumise gradient. Ekstraheerimise kestus peaks ökotoksikoloogiliste katsete puhul olema võimalikult lühike, sest populatsiooni juurdekasv ekstraheerimise ajal muudaks tulemused ebausaldusväärseks. Teisest küljest peavad proovide temperatuur ja niiskustingimused jääma alati vahemikku, mille puhul lestadel on võimalik liikuda. Mullaproovi kuumutamine toob kaasa substraadi kuivamise. Kui kuivamine on liiga kiire, võib ka mõni lest ära kuivada, enne kui ta jõuab põgeneda.

Seejärel pakutakse välja järgmine meetod (24, 25).

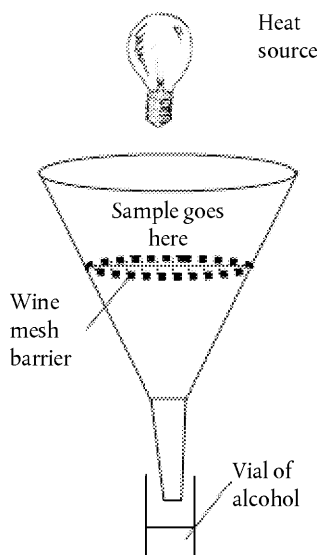
Seade: Tullgreni lehter või muu võrreldav seade, näiteks MacFadyeni lehter (ülalkuumutusega, proov asetatakse lehtri kohale).

Kuumutusrežiim: 12 tunni vältel 25 °C, 12 tunni vältel 35 °C, 24 tunni vältel 45 °C (kokku 48 tundi). Temperatuuri tuleks mõõta substraadi sees.

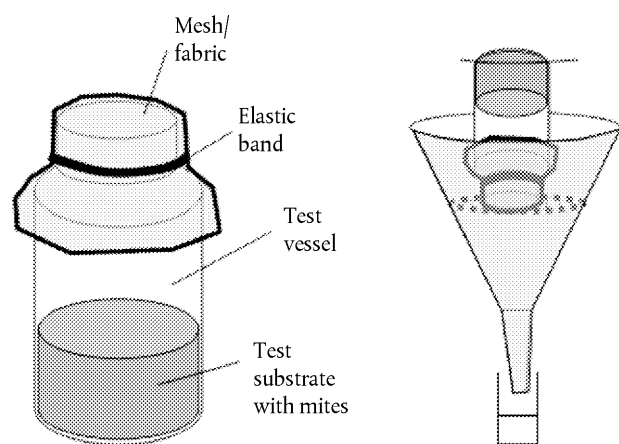
Fikseerimisvedelik: 70 % etanool.

Üksikasjalik käik: võetakse kates kasutatud klaasnõu. Selle kaas eemaldatakse ja nõu suu ümber mähitakse tükk võrku või kangast. Kanga ava suurus peaks olema 1,0–1,5 mm. Kangas kinnitatakse kummipaelaga. Nõu pööratakse ettevaatlikult tagurpidi ja asetatakse ekstraheerimisseadmesse. Kangas hoiab ära substraadi pudenumise fikseerimisvedelikku, kuid võimaldab lestadel proovist lahkuda. Kui kõik nõud on paigale asetatud, alustatakse kuumutamist. Ekstraheerimine lõpetatakse 48 tunni pärast. Fikseerimisnõud eemaldatakse ja lestad loendatakse anatoomilise mikroskoobi abil.

Valitud meetodiga saavutatav ekstraheerimise tõhusus peab olema tõendatud üks või kaks korda aastas tehtava katsega, milles kasutatakse kemikaaliga töötlemata katesubstraati sisaldavaid nõusid, kus hoitakse teadaoleval arvul noorloomi ja täiskasvanud lesti. Ekstraheerimise keskmine tõhusus peaks kõiki arenguetappe hõlmavate koondtulemuste puhul olema ≥ 90 %.

Tullgreni ekstraheerimiseseade

Katsenõu ettevalmistamine ekstraheerimiseks pärast katse lõppemist



6. liide

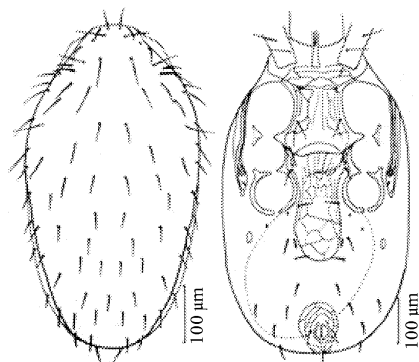
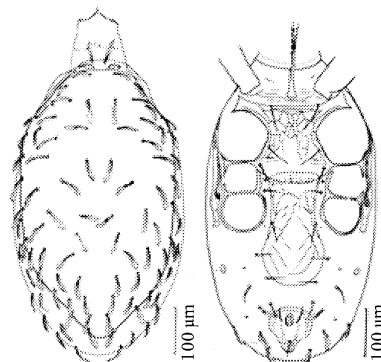
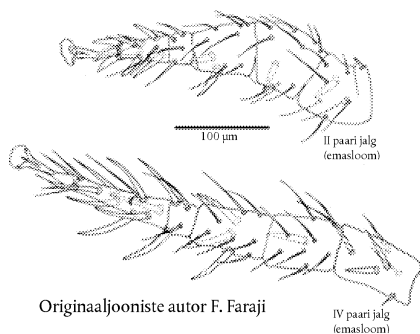
Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer'i määramine

Alamklass/selts/alamselts	Sugukond	Perekond/alamperekond/liik
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>

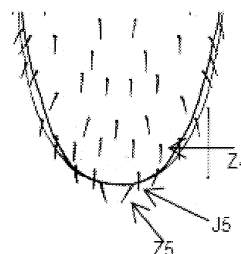
Autor ja kuupäev	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. jaanuar 2007
------------------	--

Kasutatud kirjandus	<p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Die Tierwelt Deutschlands, 59. Teil. (2. muudetud väljaanne.) Lk 1–523.</p> <p>Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9. 400 lk.</p> <p>Krantz, G. W. (1978). A Manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc. 509 lk.</p>
---------------------	---

Määramiseks olulised tunnused	<p>Kilp kumera hammasja servaga; hüpostoomi soontes üle 6 hambakese; tagumised seljaharjased Z4 mitte väga pikad; seljaharjased harjasekujulised; genitaalkilp tavapärase suurusega, mitte oluliselt suurenenud, ei ulatu anaalkilbini; seljakilbi tagumisel poolel puuduvad paarumata harjased; II ja IV jalapaaril mõned suured paksud harjased; seljaharjased Z5 umbes kaks korda pikemad kui J5; lõugtundla liikumatul lülil 12–14 hammast ja liikuvall lülil 2 hammast; idiosoomi pikkus 520–680 µm.</p> <p>Bioloogilises tõrjes kasutatakse ka liiki <i>Hypoaspis miles</i> ning see võidakse <i>H. aculeifer</i> iga segi ajada. Peamine erinevus on järgmine:</p> <p><i>H. miles</i> kuulub alamperekonda <i>Cosmolaelaps</i> ja sellel liigil on noakujulised seljaharjased, samas kui <i>H. aculeifer</i> kuulub alamperekonda <i>Geolaelaps</i> ja tema seljaharjased on harjasekujulised.</p>
-------------------------------	---

*Hypoaspis aculeifer* Hughesi järgi (Hughes, 1976)*Hypoaspis miles* Hughesi järgi (Hughes, 1976)

Originaaljooniste autor F. Faraji

IV paari jalg
(emasloom)*Hypoaspis aculeifer*,
seljakilp iseloomulike harjastega

7. liide

Põhiteave *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*'i bioloogia kohta

Hypoaspis aculeifer kuulub sugukonda *Laelapidae*, seltsi *Acari* (lestad), klassi *Arachnida*, hõimkonda *Arthropoda*. Selle liigi esindajaid leidub iga tüüpi mullas ning nad toituvad teistest lestadest, ümarussidest, valgeliikumlastest ja hooghännalistest (26). Toidunappuse korral lähevad nad üle kannibalismile (27). Röövlestade keha jaguneb idiosoomiks ja gnatosoomiks. Idiosoom ei ole selgelt jagunenud prosoomiks (pearindmik) ja opistosoomiks (tagakeha). Gnatosoomil (näokilp) paiknevad toitumiseks kasutatavad suised: lõugkobijad ja lõugtundlad. Lõugtundlad on kolmeharulised ja neil on eri kujuga hambad. Isasloomad kasutavad lõugtundlaid peale toiduneelamise peamiselt spermatofooride ülekandmiseks emasloomadele. Seljakilp katab peaaegu kogu idiosoomi. Suure osa emaslooma idiosoomist võtavad enda alla suguorganid, mis muutuvad eriti märgatavaks veidi aega enne munemist. Kõhuosal on kaks kilpi: rinnakukilp ja genitaalkilp. Kõik jalad on varustatud harjaste ja ogadega. Harjaseid kasutavad lestad enda kohalhoidmiseks mullas või mullapinnal liikumisel. Esimest paari jalgu kasutatakse peamiselt tundlatena. Teist paari jalgu kasutatakse liikumise kõrval ka saagi haaramiseks. Neljandal jalapaaril paiknevaid ogasid kasutatakse nii kaitseks kui ka edasiliikumiseks (28). Isasloomade pikkus on 0,55–0,65 mm ja kaal 10–15 µg. Emasloomade pikkus on 0,8–0,9 mm ja nad kaaluvad 50–60 µg (8, 28) (joonis 1).

Joonis 1.

***H. aculeifer*'i emasloom, isasloom, protonümf ja vastne.**

Temperatuuril 23 °C saavad lestad suguküpseks 16 päevaga (emasloomad) või 18 päevaga (isasloomad) (6). Seemnerakud viiakse emaslooma solenostoomi ja sealt liiguvad need edasi munasarja. Munasarjas toimub seemnerakkude küpsemine ja säilitamine. Viljastamine leiab aset alles pärast seemnerakkude küpsemist munasarjas. Emasloomad munevad viljastatud või viljastamata munarakud eraldi või kogumikena eelistatult pragudesse või aukudesse. Paaritud emasloomad saavad kummaski soost järglasi, samas kui paaritumata emasloomadel kooruvad üksnes isased noorloomad. Täiskasvanuks saamiseks läbitakse neli arenguetappi (munast vastseks, vastsest protonümfiks, protonümfist deutonümfiks, deutonümfist täiskasvanuks).

Munad on piimjasvalged, klaasjad, ovaalsed, umbes 0,37 mm pikkused ja kõva kestaga. Vastavalt allikale 8 on vastsete pikkus 0,42–0,45 mm. Neil on vaid kolm paari jalgu. Peaosas on lõugkobijad ja lõugtundlad juba välja arenenud. Mõne väikese hambaga lõugtundlaid kasutatakse munast koorumiseks. Esimese kestamise järel, mis toimub 1–2 päeva pärast koorumist, arenevad välja protonümfid. Nad on samuti valged, nende pikkus on 0,45–0,62 mm (8) ja neil on neli paari jalgu. Lõugtundlatel on kõik hambad olemas. Selles etapis alustavad lestad toitumist. Sel otstarbel torgatakse lõugtundlad läbi saaklooma kutiikuli ja tema kehasse eritatakse sekreeti kehaväliseks seedimiseks. Seejärel saab lest vedeldatud toidu sisse imeda. Lõugtundlaid saab kasutada ka toidutükkidest suuremate osakeste rebimiseks (28). Pärast veel ühte kestamist arenevad välja deutonümfid. Nad on 0,60–0,80 mm pikkused (8) ja nende värvus varieerub kollasest helepruunini. Alates sellest etapist on võimalik eristada emasloomi isasloomadest. Veel ühe kestamise järel, mille vältel loomad ei ole aktiivsed ja neil areneb välja pruun kilp (umbes 14 päeva möödudes), on lestad täiskasvanud (28, 29, 30). Nende eluiga 25 °C juures on 48–100 päeva (27).

8. liide

Hypoaspis'ega katse tegemiseks vajalike toimingute kokkuvõte ja ajakava

Aeg (päevades) (katse alustamise päev = 0-päev)	Tegevus/ülesanne
28–35 päeva enne katset	Emasloomad viiakse sünkroonimise alustamiseks tüvikultuurist puhastesse nõudesse 2 päeva hiljem: emasloomad eemaldatakse Kaks kuni kolm korda nädalas: lisatakse piisavas koguses sööta
5 (± 2) päeva enne katset	Valmistatakse kunstlik muld
4 (± 2) päeva enne katset	Määratakse kunstliku mulla veemahutavus Lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: proovid kaalutakse ja arvutatakse veemahutavus
4 (± 2) päeva enne katset	Kunstlik muld eelniisutatakse, et saavutada niiskusesisaldus 20–30 % veemahutavusest
Katse alustamise päev (0-päev)	Alustatakse katset: uuritav kemikaal lisatakse kunstlikule mullale Igasse paralleelnõusse viiakse 10 emaslooma Kõik paralleelnõud kaalutakse Valmistatakse abiootilised kontrollproovid niiskusesisalduse ja pH mõõtmiseks – 2 paral- leelproovi iga kontsentratsiooni kohta Niiskusesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovidel lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: niiskusesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovid kaalutakse Järgmisel päeval: mõõdetakse kuivatatud abiootiliste kontrollproovide pH
3., 6., 9., 12. päev (ligi- kaudne)	Igasse paralleelnõusse lisatakse piisav kogus saakloomi Kõik paralleelnõud kaalutakse ja lisatakse vett aurustunud vee asendamiseks
14. päev	Katse lõpetatakse, alustatakse ekstraheerimist kõikidest paralleelproovidest ja ekstraheeri- mise tõhususe hindamiseks valmistatud kontrollproovidest Veesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovidel lastakse öö läbi kuivada Järgmisel päeval: veesisalduse määramiseks valmistatud kontrollproovid kaalutakse Järgmisel päeval: mõõdetakse kuivatatud kontrollproovide pH
16. päev	Ekstraheerimine lõpetatakse
16. päevale järgnevad päevad	Registreeritakse täiskasvanud ja noorloomade arv ekstraheeritud materjalis Esitatakse tulemused, kasutades näidistabeleid Esitatakse katseprotokoll, kasutades katseprotokolli vormi

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 vöötdaanio); androgeense toime kindlakstegemine on võimalik tüseda tõmpnina ja jaapani riisikala, kuid mitte vöötdaanio 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-ajuripatsisugunäärmete (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 inhibeervä või androgeense toime kohta; need näitajad on vitellogeniin ja teisesed sootunnused. Vitellogeniini määratakse nii tüseda tõmpnina, jaapani riisikala kui ka vöötdaanio puhul; teisesed 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 munasarjadesse, kus arenevad munarakud seda seovad ja modifitseerivad. Vitellogeniin on peaaegu tuvastamatu isaskalade ja ebaküpsede emaskalade vereplasmas, kuna sellistel kaladel ei ole vereringes piisavalt östrogeeni, kuid nende maks on võimeline vitellogeniini sünteesima ja verre eritama vastuseks stimuleerimisele eksogeense östrogeeniga.
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 β -östradiooliks, põhjustab see vitellogeniini kontsentratsiooni vähenemise; seda kasutatakse selliste kemikaalide leidmiseks, mis inhibeervad 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 on töötatud ja tavakasutamiseks edukalt standarditud mitu mõõtmismeetodit. Nende hulgas on liigspetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (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. Laialdaselt 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 teiseid sootunnuseid. Emaskaladel säilib võime omandada isaskalale iseloomulikud teisesed 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. Võõtdaanio kasutamisele selles katses on piiranguid, kuna sellel kalal puuduvad mõõdetavad teisesed sootunnused, mille kaudu hinnata reaktsiooni androgeense toimega kemikaalidele.
8. Tüseda tõmpnina puhul on eksogeensete androgeenidega kokkupuute peamine näitaja pulmarüü kõbrukeste 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 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. Kokkupuute 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 tüsedal tõmpninal 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 KRITERIUMID

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 ± 2 °C katsealusele liigile ettenähtud temperatuurist (2. liide);
- peaksid olema tõendid selle kohta, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni lahuses on suudetud hoida rahuldavalt vahemikus ± 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 vöötdaanio kudemissubstraat; vajalikud üksikasjad vt 4. liide;
 - f) sobiva täpsusega kaalud (st täpsusega $\pm 0,5$ mg).

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 lahendusvesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (näiteks uuritava kemikaaliga kompleksimoodustumise kaudu), tuleks vaheaegade järel võtta proove analüüsimiseks. Kui lahendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga, tuleks raskmetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- ja 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 lahendusvee nõutavad keemilised omadused.

Katselahused

15. Valitud kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisega. Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava kemikaali segamise või loksutamise lahendusvees, 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 µl/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 lahendusvee 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 katset kohandatud selliste veekvaliteedi ja valgustustingimustega, mis sarnanevad katses kasutatavatele. On oluline, et laadimisnorm ja loomkoormus (vt mõisted, 1. liide) sobiksid katses kasutatavale liigile (vt 2. liide).
18. Pärast 48-tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse surmajuhtumid ja rakendatakse järgmisi kriteeriume:
 - 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, kokkupuute 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 tüsedä tömpnina ja jaapani riisikala puhul selgelt nähtavad) ning kes aktiivselt koevad. Üksnes üldiseks orienteerumiseks tuleb öelda (ja seejuures ei tohi jätta arvestamata konkreetse kalapartii tegelikku paljunemiskäitumist), et tüsedä tömpnina 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. Vöötdaanio 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 avalduv mõju) väljaselgitamiseks (24).
22. Vöötdaanio 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 vitellogeniin ja vajaduse korral teisesed sootunnused. Tüsedä tömpnina 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 vitellogeniin 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.
24. Katse on vaja teha kolmel kontsentratsioonil, mis erinevad konstantse kordaja võrra, mis võib olla kuni 10; lisaks tuleb teha kontrollkatse lahendusveega (ja vajaduse korral ka lahusti kontrollkatse). Soovitav on, 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. Soovitatav on enne katset kaaluda samast kalade partiist osaproov, et arvutada välja keskmine kaal.

Kokkupuutetingimused

Kestus

26. Katse kestab 21 päeva alates kokkupuute-eelse perioodi lõppemisest. Soovitatav 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 aroomaatsete süsivesinike (PAH) ja polüklooritud bifenüülide (PCB) sisaldus. Suure fütoöstrogeenisaldusega sööta, mis maskeeriks kalade reaktsiooni teadaolevale östrogeeni agonistile (nt 17 β -östradiool), ei tohiks kasutada.
29. Sööda ülejäägid ja väljaheidet 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 korrapäraste 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 soovatakse 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 μm suuruste pooridega filtri) või tsentrifuugida. Sellise vajaduse korral tuleks eelistada tsentrifuugimist. Kuid kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtrimine lubatud.

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 surmajuhtumid tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei tohiks asendada ei kontrollrühma(de) ega ka katserühmade 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 tüsedal tõmpnina puhul täheldatud normaalsetel isaskaladel või maskuliniseerunud emaskaladel androgeense kemikaaliga kokkupuute tagajärjel territooriumiga seotud agressiivsust; võetdaanio 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. Tüsedal tõmpnina saadud seniste kogemuste kohaselt võivad mõned endokriinse toimega kemikaalid esialgu tekitada muutusi järgmistes välistes tunnustes: keha värvus (hele või tume), 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 limaskestast ärrituse vähendamiseks puhverdatud 300 mg/l NaHCO₃-ga (naatriumvesinikkarbonaat, CASi nr 144-55-8); seejärel võetakse veri või koed vitellogeniini määramiseks, nagu on selgitatud jaotises „Vitellogeniin”.

Teiseste sootunnuste vaatlemine

40. Mõned endokriinse toimega kemikaalid võivad põhjustada muutusi spetsiifilistes teistes sootunnustes (pulmarüü kõbrukeste arv isasel tüsedal tõmpninal, isase jaapani riisikala papillaarjätked). Teatava toimemehhanismiga kemikaalid võivad põhjustada teiseste sootunnuste ebanormaalsel ilmumisel 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 mikrokapillaartoru või selle asemel süstla abil tehtava südamepunktsiooniga. Sõltuvalt kala suurusest on kogutava vere maht tüseda tõmpnina isendi puhul üldiselt vahemikus 5–60 µl ja vöötdaanio 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 vöötdaanio pea-saba homogenaati (6. liide). Vitellogeniin tuleks mõõta valideeritud homoloogse ELISA meetodiga, kasutades homoloogset vitellogeniini standardit ja homoloogseid antikehi. Soovitav on kasutada meetodit, millega on võimalik tuvastada vitellogeniini nii väikeses sisalduses kui mõni mg plasma ml kohta (või mg 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 kalibrimisstandardit, mille kontsentratsioonivahemik hõlmab vitellogeniini kontsentratsiooni eeldatavat vahemikku, ja vähemalt üks mittespetsiifilise sidumise tühikatse (kaks paralleelkatset). Nendes tühikatsetes peaks neeldumine olema vähem kui 5 % kalibrimisstandardi puhul täheldatavast maksimaalsest neeldumisest. Igast proovi lahjendusest analüüsitakse vähemalt kahte alikvooti (kahes paralleelaugus). Kui tulemused paralleelaugudes erinevad rohkem kui 20 %, tuleb teha kordusanalüüs.
43. Kalibrimisgraafiku korrelatsioonikordaja (R^2) peab olema suurem kui 0,99. Hea korrelatsioon ei ole siiski piisav, et tagada ennustatavate väärtuste õigsus kõigis kontsentratsioonivahemikes. Lisaks kalibrimisgraafiku piisavalt heale korrelatsioonile peab ka iga standardi kontsentratsioon, mis arvutatakse kalibrimisgraafiku põhjal, olema vahemikus 70–120 % oma nominaalsest kontsentratsioonist. Kui nominaalsed kontsentratsioonid kalduvad eemalduma kalibrimise regressioonisirgest (nt madalatel kontsentratsioonidel), võib olla vajalik jagada kalibrimisgraafik 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 otsustuskeem, 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 iseloomustus;
- füüsikalised ja asjakohased füüsikalise-keemilised omadused;
- 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 tegelikus 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, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud ja kloororgaanilised pestitsiidid).

Tulemused:

- tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid nõuetekohasuse kriteeriumidele;
- andmed suremuse kohta iga katsekonsentratsiooni rühmas ja kontrollrühmas;
- kasutatud statistilise analüüsi meetodid, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite valimise põhjendus;
- bioloogiliste vaatluste andmed üldiste morfoloogiliste muutuste kohta, sealhulgas teiseste sootunnuste ja vitellogeniini kohta;
- 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. Valideerimisuuringuid kasutati selliste suuniste väljatöötamiseks.
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 toimetehhanisme või mis avaldavad mõju mitmele otsitavale näitajale. Praktikakutsutakse 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-östradiol 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-trenboloone kontsentratsioonis 5 µg/l), mis põhjustab emastel tüsedatel tõmpninel ja jaapani riisikaladel isaskalade teiseste sootunnuste ilmumist. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate valideerimisuuringute 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 vähenemine olla tingitud üksnes endokriinsest mehhanismist, kuid positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada tõendina endokriinse mõju kohta *in vivo* ja seda tuleks selguse saamiseks tavaliselt täiendavalt uurida.

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.
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131.
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4: 87–98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M 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, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22 (6): 1350-60.

- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3): 774-81.
 - (22) OECD (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.
 - (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,” not „traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve 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.
-

1. liide

Lühendid ja mõisted

Kemikaal – aine või segu.

CV – variatsioonikordaja.

ELISA – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs.

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 % LC₅₀ väärtusest.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

Kalade endokriinsüsteemi mõjutavate kemikaalide sõeluuringu katse tingimused

1. Soovitatav 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. Valgustatus	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 luksi (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m ² /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 kemikaalikeskonnakohale	Vähemalt 4	Vähemalt 2	Vähemalt 2
16. Kalade arv ühe katse 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
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 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 24 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil	Lahustunud hapnikku > 60 % küllastuskontsentratsioonist; keskmine temperatuur 26 ± 2 °C; kontrollrühma(de)s jäi ellu 90 % kaladest; katse ajal mõõdetud kontsentratsioonid vahemikus ± 20 % mõõdetud väärtuste keskvaärtusest igal kontsentratsioonil

3. liide

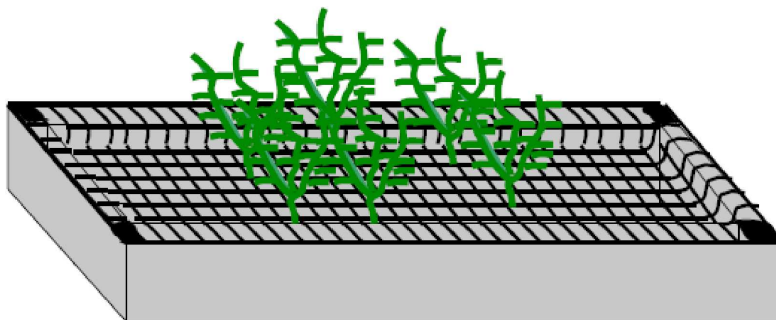
Mõned lahjendusvee nõutavad keemilised omadused

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

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.

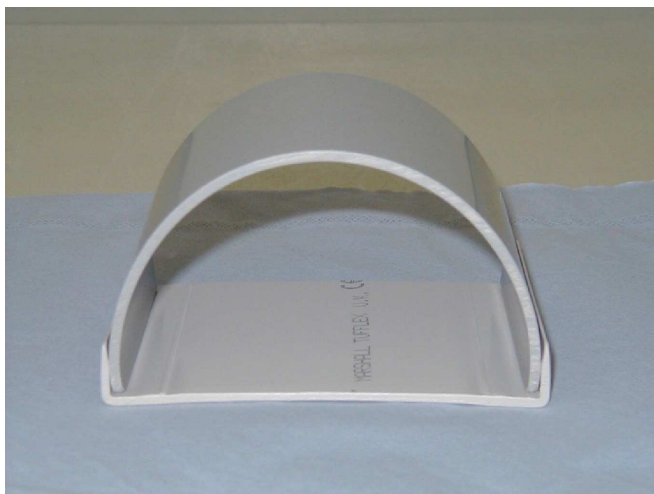
Vahemaa aluse ja kambri klaasseinte vahel peaks olema vähemalt 3 cm, et kudemine toimuks kindlalt vaagnale. Alusele koetud marjaterad langevad läbi võre ja need võib koguda 45–60 minutit pärast valgustuse sisselülitamist. Läbipaistvad marjaterad ei ole kleepuvad ja on külvalguses kergesti loendatavad. 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.

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 plastikalusele). Kõiki kudemissubstraate 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.

5.A liide

Teiseste 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 teisese sootunnused (st pulmarüükõbrukeste arv ja suurus, turjapadjandi ja kudemiselundi 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 kõbrukesti 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 otse sõõrmete all ja suu kohal. Paljudel kaladel on kõbrukeste rühmad alalõua all; suule kõige lähemaid kõbrukesti 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) kõbrukesti 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 teiseste sootunnuste ebanormaalse ilmumise; näiteks sellised androgeenireseptori agonistid nagu 17 β -metüültestosteron ja 17 β -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. Konkreetsed tooted ja/või seadmed võib asendada võrreldavate kättesaadavate materjalidega.

Kõbrukesti on kõige parem vaadelda valgustusega suurendusklaasi või valgustusega (3X) lahkamismikroskoobiga. Vaadeldge kala selja poolt ja eest (peaga vaataja poole).

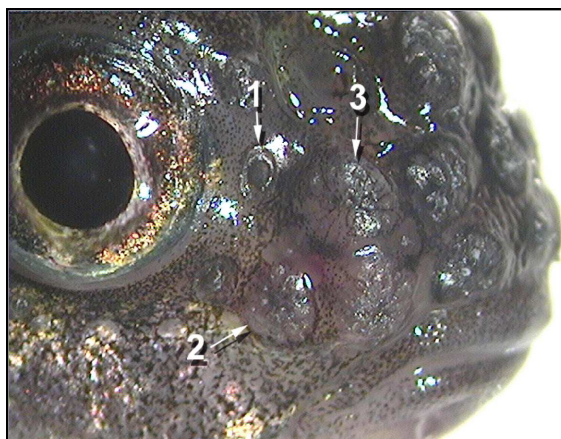
- a) Pange kala väiksele Petri tassile (läbimõõt nt 100 mm), esiotsaga enda poole ja kõhuga allapoole. Seadke objektiiv fookus nii, et oleks võimalik vaadelda kõbrukesti. Pöörake kala ettevaatlikult ja aeglaselt küljelt küljele, et tuvastada kõbrukeste piirkonnad. Loendage ja hinnake kõbrukesed.
- b) Korrake vaatlust pea kõhupoolel, olles pannud kala Petri tassil selili esiotsaga enda poole.
- c) Iga kala vaatlus tuleks viia lõpule kahe minutiga.

Kõbrukeste arv ja hindamine

Täiskasvanud tüseda tõmpnina kõbrukeste olemasolu ja suuruse hindamiseks on määratletud kuus konkreetset ala. Olemasolevate kõbrukeste asukohta ja arvu kaardistamiseks on välja töötatud vorm (vt käesoleva liite lõpus). Iga kala kõbrukeste arv ja suurus registreeritakse kvantitatiivselt järgmiselt: 0 – puuduvad, 1 – olemas, 2 – suurenenud ja 3 – tugevasti väljendunud (joonis 1).

0 punkti – kõbrukesti ei ole. 1 punkt – kõbrukesed on olemas, igal kõbrukesel on üks kõrgeim punkt, mille kõrgus on ligikaudu võrdne raadiusega (diameetriga). 2 punkti – suurenenud kõbrukesed, mille kude meenutab kujult täрни, millel on tavaliselt lai alus keskelt algavate radiaalsete vagudega. Kõbrukeste tipp on sageli ebakorrapärasem, mõnikord võib olla mõnevõrra ümardunud. 3 punkti – selgelt väljendunud kõbrukesed, on tavaliselt üsna suured ja ümmargused; struktuur on ebaselgem. Mõnikord on need kõbrukesed 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 kõbrukeste omale, kuid on mõnikord raskesti eristatavad. Selle süsteemi kasutamise korral on normaalsel kontrollrühma isasel, kelle kõbrukeste arv on 18–20, üldine kõbrukeste punktisumma < 50 (Jensen *et al.*, 2001).

Joonis 1



Tegelik kõbrukeste arv võib mõnel kalal olla suurem, kui on vormil (liide A) asjaomases hindamispiirkonnas lahtreid. Kui see on nii, võib täiendavad hinded märkida lahtri sisse, lahtrist paremale või vasakule. Vormist ei pea olema näha sümmeetriat. Täiendav meetod selliste kõbrukeste kaardistamiseks, mis paiknevad piki suu horisontaaltasapinda vertikaalselt paaris või ühendatuna, on märkida kummagi kõbrukeste hinne samasse lahtrisse.

Kaardistamispiirkonnad on järgmised.

A – silmade ümber olevad kõbrukesed. 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 kõbrukesed. 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 kõbrukesed. Suguküpsetel kontrollrühma isaskaladel on need tavaliselt suurenenud ja selgelt väljendunud. Vähem arenenud isaskaladel ja androgeeniga kokku puutunud emaskaladel on need olemas või suurenenud.

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- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Köbrukeste hindamise vorm

ID _____

Kuupäev _____

Üldsumma _____

Numbriline hinnang

1 – on olemas

2 – suurenenud

3 – tugevasti väljendunud

	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

5.B liide

Teiseste sootunnuste hindamine jaapani riisikala puhul endokriinse mõjuga kemikaalide tuvastamiseks

Allpool on kirjeldatud papillaarjätmete (*) mõõtmist; nimetatud jätked on jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) teiseseid 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 jätkeid siiski ka pärakuuime tagumisest otsast lugedes esimesel uimekiirel. Käesolev standardne töökord hõlmab jätmete mõõtmist esimesel uimekiirel (uimekiire järjekorranumber saadakse siin loendamise ja pärakuuime tagumisest otsast).

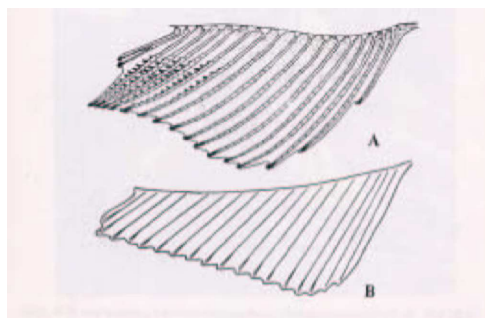
- (1) Pärast maksa väljalõikamist (6. liide) pannakse rümp (pea ülespoole, saba allapoole) koonilisse katseklaasi, mis sisaldab ligikaudu 10 ml puhverdatud neutraalse pH-ga 10 % formaliinilahust. Kui sugunäärmed fikseeritakse mingi muu lahusega kui neutraalne puhverdatud 10 % formaliinilahus, tehke pärakuuime eesosa ja päraku vahelt žiletiteraga ristilõige läbi rümba, 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 papillaarjätmete 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 lõigake väikeste lahkamiskääridega pärakuuim ettevaatlikult ära (parem on lõigata 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 katteklaasiga. Olge ettevaatlik, et pintsettidega pärakuuimest kinni võttes ei saaks papillaarjätked kriimustada.
- (4) Loendage bioloogilise mikroskoobi abil (tavaline või invertmikroskoop) loenduri abil papillaarjätketega liigeseplaatide arv. Papillaarjätketeks loetakse väikest rühma jätkeid liigeseplaadi tagumisel serval. Kirjutage iga 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 pärakuuimest pilt ja loendage papillaarjätketega liigeseplaatide arv fotolt.
- (5) Pärast mõõtmist pange pärakuuim koonilisse katseklaasi (1) ja hoidke see alles.

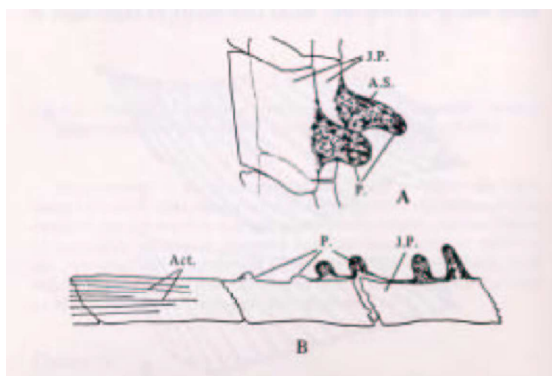
Joonis 1.

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., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



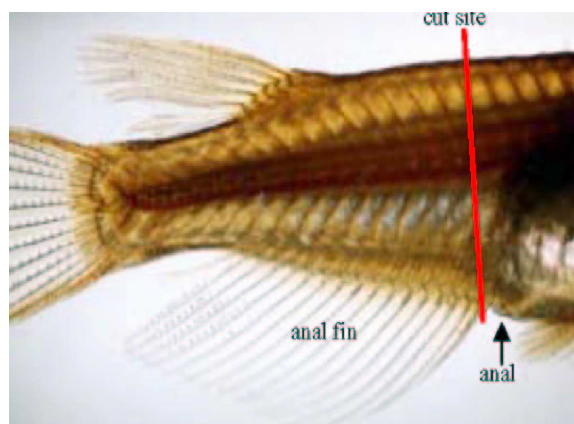
Joonis 2.

A. Jätked pärakuuime 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.



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.



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 (proteasiinhibiitor) 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 mikrolitrit (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 (alikoovidena, 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 katsekambris.
- (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 välise teiseste sootunnuste järgi (nt pärakuuime kuju).
- (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 katsekambris 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.

Maksa väljalõikamine

- (1) Viige kala väikse kahvaga transpordimahutist üle tuimestilahusesse.
- (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 seedekulgl maksast samal viisil lahti. Olge ettevaatlik, et seedekulgl sisu ei voolaks välja. Lõigake sabapoolne seedekulgl osa pärakust lahti ja eemaldage seedekulgl 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 mikrokatsutit. 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.
- (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 eeltötlust tegema varsti pärast väljalõikamist, viiakse proovid järgmisele tööalale jahutusega katsutihoidjas (või jääl olevas hoidjas).

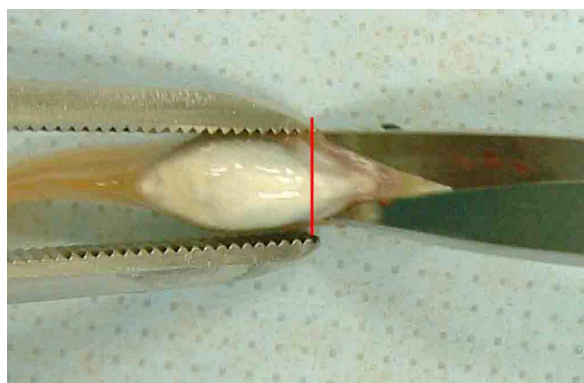
Pärast kaladelt maksa väljalõikamist on rümp valmis teiste sootunnuste mõõtmiseks.

Proov

Säilitage maksaproove temperatuuril ≤ -70 °C, kui neile ei hakata eeltötlust tegema vahetult pärast väljalõikamist.

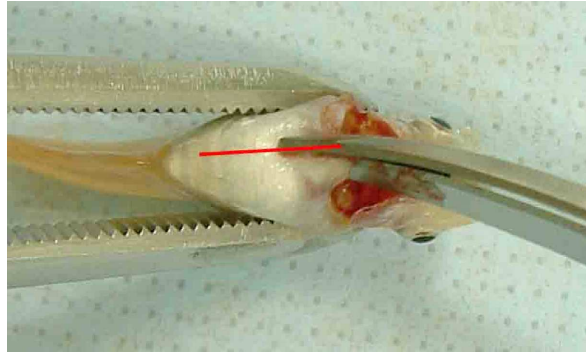
Joonis 1.

Lõige kääridega tehakse vahetult rinnauimedest eespool.



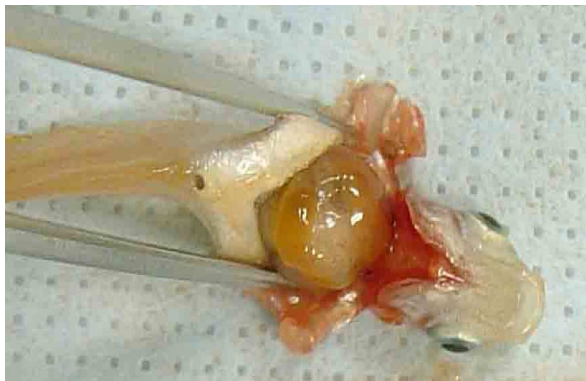
Joonis 2.

Kõhu keskjoont mööda lõigatakse kõht lahti punktini, mis asub umbes 2 mm pärakust pea pool.



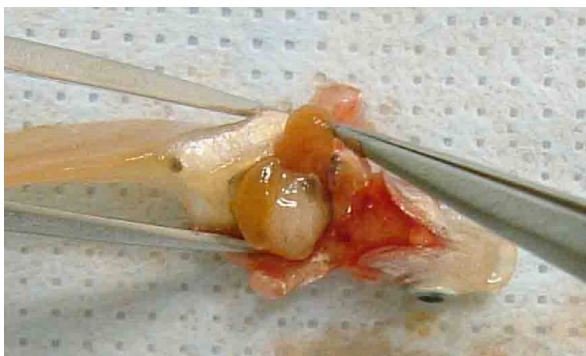
Joonis 3.

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.

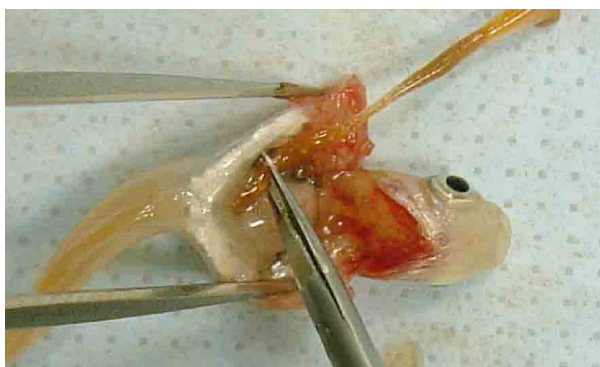
Sooled tõmmatakse ettevaatlikult pintsettidega eemale.

*Joonis 6.*

Soolestiku mõlemad otsad ja mesenteeriumimanused lõigatakse käärde abil lahti.

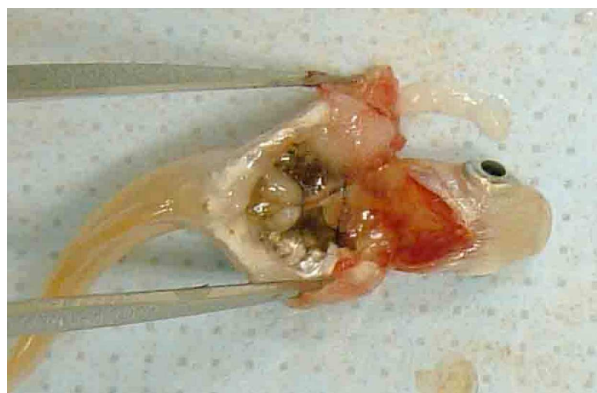
*Joonis 7 (emaskala).*

Emaskala puhul toimitakse samal viisil.



Joonis 8.

Lõpule viidud lahkamine.



Meetod 2B. Jaapani riisikala (*Oryzias latipes*) maksa eeltöötlemine vitellogeniini määramiseks

Võtke ELISA komplektist homogeniseerimispuhver ja jahutage see purustatud jää abil maha (lahuse temperatuurini ≤ 4 °C). Kui kasutatakse EnBio ELISA süsteemi homogeniseerimispuhvrit, sulatage lahus toatemperatuuril ja siis jahutage pudelit purustatud jääs.

Arvutage maksa jaoks vajalik homogeniseerimispuhvri maht, lähtudes maksa massist (lisage 50 μ l homogeniseerimispuhvrit homogeniseeritava maksa mg kohta). Kui maksa mass on näiteks 4,5 mg, on vajalik homogeniseerimispuhvri kogus 225 μ l. 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 katserühmade 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 maksaproovide sisaldavate 1,5 ml mikrokatsutite arv ei tohiks ületada proovide arvu, mida saab samaaegselt tsentrifuugida.
- (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 (mahuahemikuga 100–1 000 μ l) vajalikule mahule. Pange mikropipeti otsik üles 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 mikrokatsutitesse, 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 nui ja 1,5 ml mikrokatsuti seinaga 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 vaadeldage suspensiooni.
- (5) Kui suspensioonis on näha maksatükikesi, korrake toiminguid (3) ja (4), et saada rahuldav maksahomogenaat.
- (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 ≤ 5 °C.
- (2) Pange 1,5 ml mikrokatsutid homogeniseeritud maksa suspensiooniga jahutatud tsentrifuugi (vajaduse korral tasakaalustage tsentrifuug).
- (3) Tsentrifugeerige homogeniseeritud maksa suspensiooni 13 000 g juures 10 minutit temperatuuril ≤ 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 ≥ 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.
- (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 ≤ -70 °C, kuni neid kasutatakse ELISA tegemiseks.

Meetod 3A. Vöötdaanio 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 fosfaatpuhvrilisandiga 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. Vöötdaanio vere võtmine südamepunktsiooniga

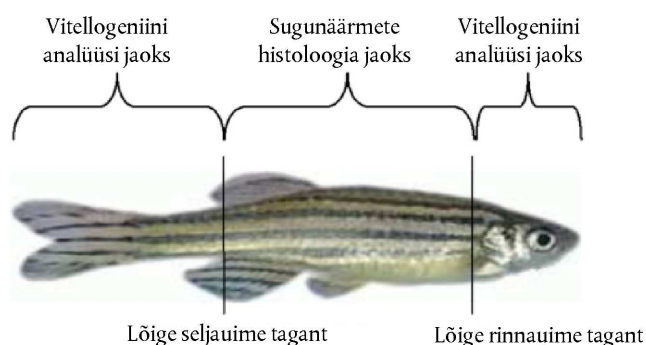
Vere hüübimise ja valkude lagunemise takistamiseks võetakse proovid fosfaatpuhvrilisandiga soolalahusesse (PBS), mis sisaldab hepariini (1 000 ühikut/ml) ja proteaaside inhibiitorit aprotiniini (2 trüpsiiniinhibiitori ühikut (TIU) / ml). Puhvrikomponentidena soovitatakse kasutada hepariini ammoniumsoola 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 vöötdaanio 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 vöötdaanio 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.

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 °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 °C ja 50 000 g juures 30 minuti jooksul.
- (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 kasutamiseni.

(*) **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 (imetajate kudede jaoks), tootenumber P 8340.
 - *Märkus:* homogeniseerimispuhver peaks olema valmistatud samal päeval. Pange kasutamise ajaks jää peale.
-

7. liide

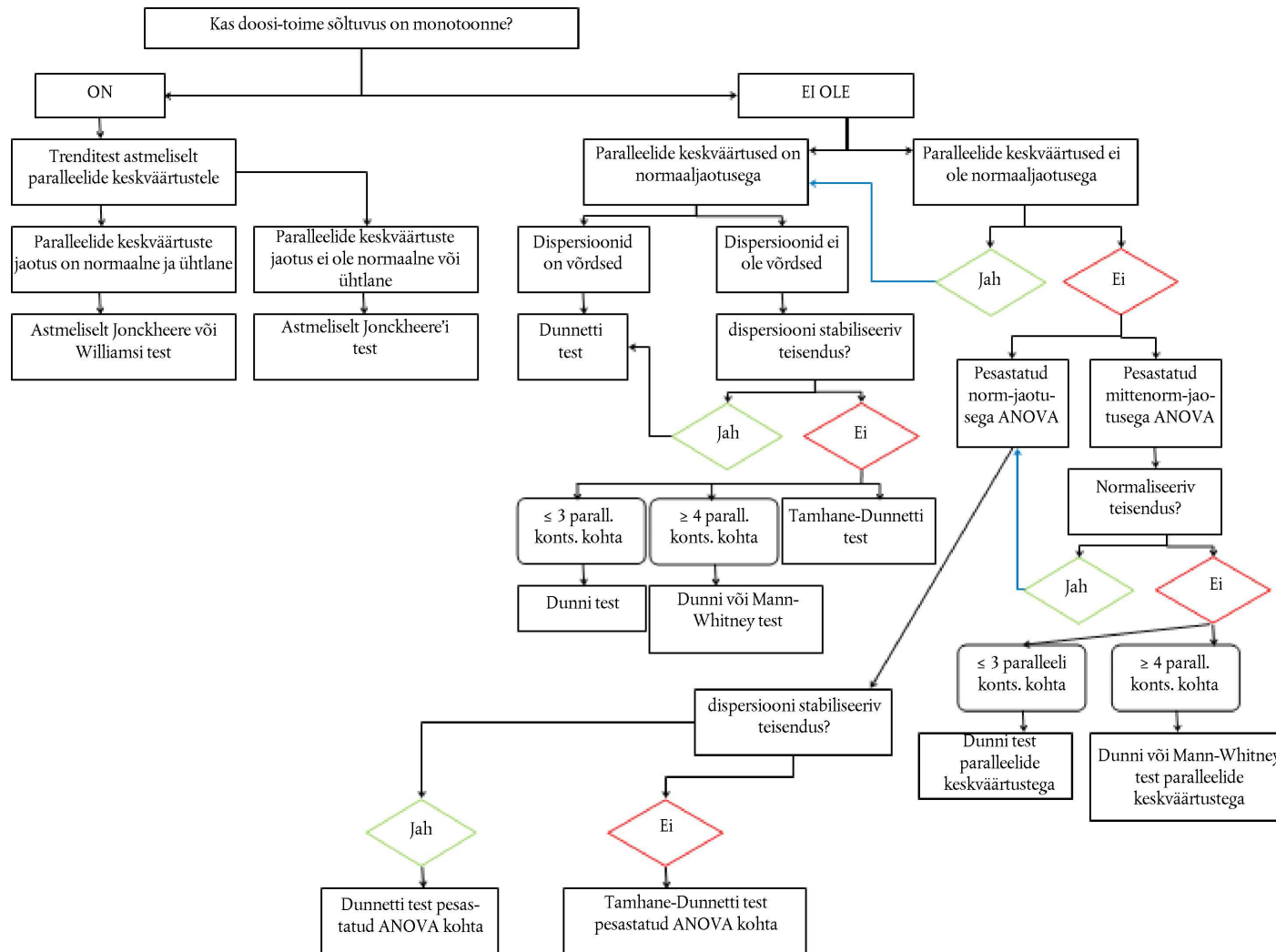
Vitellogeniiniga rikastatud proovid ja eri analüüsid kasutatav vitellogeniini võrdlusstandard

Igal vitellogeniinanalüüsi 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 plasmat analüüsitakse samuti vähemalt kahes paralleelaugus. Eeldatava kontsentratsiooni määramiseks liidetakse kontrollrühma isaskalade kahes rikastamata proovis sisalduva vitellogeniinikoguse keskväärtusele rikastamisel lisatud arvutuslik vitellogeniinikogus. Eeldatava kontsentratsiooni ja mõõdetud kontsentratsiooni suhtarv esitatakse koos samal päeval tehtud määramiste tulemustega.

Statistilise analüüsi otsustamisskeem



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 tegevussuunana 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 lahjendusveega 21 päeva jooksul. Iga kokkupuuteuuring tehakse nelja paralleelkatsega. Kulleste tihedus katse alustamise ajal on 20 kullest katseakvaariumi kohta iga katserühma puhul. Uuritavad näitajad on tagajäseme pikkus, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani (*snout to vent length*, SVL), arengustaadium, märgkaal, kilpnäärme histoloogia ja igapäevased tähelepanekud surmajuhumite kohta.

MEETODI KIRJELDUS

Katses kasutatav liik

4. *Xenopus laevis*'t kasvatatakse plaaniliselt kogu maailma laborites ja see liik on kaubanduslikult kergesti kättesaadav. Selle liigi esindajateesindajate paljunemist on kerge aastaringselt esile kutsuda inimese kooriongonadotropiini süstimisega ja saadavaid vastseid võib regulaarselt kasvatada valitud arengustaadiumideni suurtes kogustes, mis võimaldab kasutada konkreetse arengujärguga seotud katse-eeskirja. Katses on soovitatav kasutada vastseid, kes on saadud 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 ± 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 × 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 kemikaalitäüpe, 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. Omadused, mis näitavad, et kemikaali mõju veesüsteemides võib olla raske uurida: kõrge oktanolli-vee jaotuskoefitsient ($\log K_{ow}$), suur lenduvus, kalduvus hüdrolüüsiks, kalduvus fotolüüsiks tavalistes labori valgustustingimustes. Ka muud tegurid võivad olla asjakohased uuritavuse seisukohast ja neid tuleks määrata iga juhtumi puhul eraldi. Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik korralikult uurida läbivoolukatse süsteemis, 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 polütetrafluoröüleenist. 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 asukoha, 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 luxi (luumen/m²). 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 veekeskkonna suhtes mürgisuse määramise juhendites.

Vee kvaliteet

8. Kasutada võib iga kohapeal kättesaadavat vett (nt allikavesi või aktiivsõel 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, perklooraadi ja klooraadi sisaldust, kuna kõik need anioonid on kilpnäärme 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 kilpnäärme süsteemi reageerimisvõimet kilpnääret aktiveerivatele teguritele ja on teada, et see mõjutab kilpnäärme baasaktiivsust; see aspekt väärrib tähelepanu kilpnäärme histopatoloogia alaste tulemuste tõlgendamisel. Seepärast tuleb katsearuandes ära märkida katseks kasutatud vees mõõdetud jodiidi kontsentratsioonid. Olemasolevate valideerimisuuringute tulemuste põhjal on käesolev eeskiri andnud häid tulemusi, kui jodiidi (I⁻) 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 paljundusnõus peaks olema roostevabast terasest või plastikvõrgust topeltpõhi, 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 paljundusnõust.

Vastsete eest hoolitsemine ja vastsete valimine

11. Pärast täiskasvanud isendite eemaldamist paljundusnõust kogutakse munad ja hinnatakse nende eluvõimet, kasutades esindavat loodete valikut kõikidest paljundusnõudest. Parim kudu (parimad kudu) (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). Loodet viiakse üle suurele lamedale vaagnale või pannile ning kõik ilmselt surnud või ebanormaalsed munad (vt määratlus (5)) kõrvaldatakse pipeti või silmapipeti abil. Kõigi kolme kudu terved looded viiakse üle kolme eraldi koorumisnõusse. Neli päeva pärast koorumisnõusse üleviimist valitakse välja parim kudu, arvestades elujõulisust ja koorumise edukust, ning vastsed kantakse üle kasvatusnõudesse, mida võetakse vajalik arv ja milles temperatuur on 22 ± 1 °C. Lisaks võetakse veel täiendavaid vastseid lisanõudesse, et kasutada neid asendusmaterjalina, kui kasvatusnõudes peaks osa vastseid esimese nädala jooksul surema. Sellisel 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 nitriliumist, 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 tsükkel 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 kulleseid 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 käsitlemise 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 (valgustus, temperatuur, pH, lahustunud hapniku sisaldus, vee voolukiirus, jne) järsud muutused. Kui kulleseid 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 söötmissüsteemi 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 tuleks suurendada vastavalt kulleste kasvule kuni ligikaudu 30 mg-ni looma kohta päevas enne katse alustamist. Valideerimisuuringud 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 valideerimisuuringu elupuhuses järgus kasutatud *X. laevis*'e kulleste kaubandusliku sööda kasutamise kord läbivoolumeetodi tingimustes

Uuringu päev	Söödaratsioon (mg sööta 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 analüüsides 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 proovivõtuperioodi 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 küllastuskolooni abil (7). Parem oleks kasutada kandeaineta katsesüsteemi, kuid uuritavatel kemikaalidel on erinevad füüsikalise-keemilised omadused, mistõttu tõenäoliselt on vaja kasutada erinevaid meetodeid kemikaali viimiseks vette, milles korraldatakse kokkupuude kemikaaliga. Tuleks püüda toime tulla ilma lahustita või kandeaineta, kuna: i) teatavad lahustid võivad ise 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 füüsikalise-keemilised omadused. Veekeskkonna suhtes avalduva mürgisuse uurimisel on edukalt kasutatud lahustina atsetooni, etanooli, metanooli, dimetüülformamiidi ja trietüleenglükooli. Kui kandeainena kasutatakse lahustit, peab lahusti kontsentratsioon olema tunduvalt allpool pikaajaliselt täheldatavat toimet mitteavaldatavat kontsentratsiooni (NOEC); OECD juhenddokumendis soovitataks kontsentratsiooni kuni 100 µl/l; hiljutises ülevaates (12) on soovitatud kasutada lahusti kontsentratsiooni 20 µl lahendamiseks kasutatava vee 1 liitri kohta. Kui kandeainena kasutatakse lahustit, tuleks hinnata vastavaid lahusti kontrollkatseid, lisaks lahustivabadele kontrollkatsetele (puhas vesi). Kui uuritavat kemikaali ei ole võimalik vee kaudu manustada, kas kemikaali füüsikalise-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 LC₅₀ väärtusest. Katses kasutatava liigi kohta ei tarvitse ägeda mürgisuse andmeid siiski olemas olla. Kui liigispetsiifilisi ägeda mürgisuse andmeid ei ole, võib teha 96-tunnise LC₅₀ katse kullestega, kes on esindavad (st samas arengustaadiumis) kahepaiksete metamorfoosi katses kasutatavate kulleste suhtes. Kui on olemas andmed muude liikide (nt LC₅₀ 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.”
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 kogumisinõust 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 viia 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 väljalimisel 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.

Tabel 2.

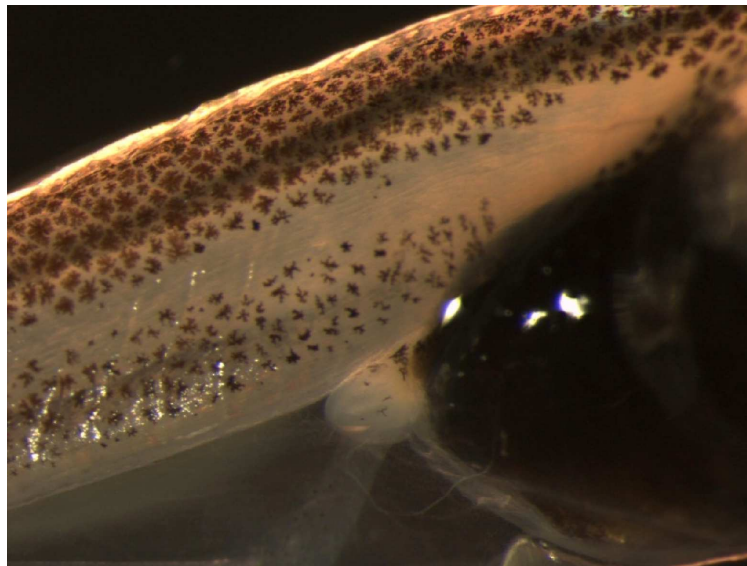
Silmatorkavad morfoloogilised tunnused arengustaadiumi määramiseks Nieuwkoopile ja Faberi juhendi järgi.

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			
Haistmisnärvi morfoloogia											X	X	X			
Saba pikkus													X	X	X	X

23. Katse alustamisel peaksid kõik kulleled olema staadiumis 51. Selle staadiumi kõige silmatorkavam morfoloogiline tunnus on tagajäseme morfoloogia, mis on näidatud joonisel 1.

Joonis 1.

***Xenopus laevis*'e kullese tagajäseme 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 Nieuwkoopi 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 ± 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. Kulleled, kellel esineb selgelt nähtavaid väärarendeid või vigastusi, tuleks katsest välja jätta.
25. Kulleled, kes vastavad eespool kirjeldatud arengustaadiumi etapi kriteeriumidele, pannakse puhta kasvatamisveega nõusse, kuni staadiumi määramine on lõpule viidud. Kui staadiumide määramine on lõpetatud, jaotatakse kulleled juhuslikult 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 kulleled tuleks kokkupuutenõudest kõrvaldada ja asendada värskest valitud kullestega kogumisnõust.

Vaatlused

26. Põhjalikum teave katse lõpetamise korra ja kulleste töötlemise kohta on esitatud kahepaiksete kilpnäärme histoloogiat käsitlevas OECD juhenddokumendis (9).

7. päeval tehtavad mõdtmised

27. Igast paralleelkatsenõust eemaldatakse 7. päeval viis juhuslikult valitud kullest. Kasutatav juhusliku valiku kord peaks tagama igale katseloomale ühesuguse tõenäosuse olla valitud. Seda on võimalik saavutada iga juhuvalikumeetodiga, kuid selle jaoks tuleb kõik kulleled püüda võrku. Valimata jäänud kulleled lastakse esialgsesse nõusse tagasi ja väljalitunud kulleled surmataks humaanselt näiteks MS-222 lahuses kontsentratsiooniga 150–200 mg/l, mille pH on naatriumvesinikkarbonaadi juuresolekul viidud 7,0 juurde. Humaanselt surmatud kulleled loputatakse veega ja pühitakse kuivaks; seejärel määratakse kehamaas milligrammi täpsusega. Iga kullese puhul määratakse tagajäseme pikkus, vahemaa ninamikust kuni pärakuavani ja (binokulaarse lahkamis- mikroskoobi abil) arengustaadium.

21. päeval tehtavad mõõtmised (katse lõpetamine)

28. Katse lõpetamisel (21. päeval) eemaldatakse ülejäänud kullest katsenõudest ja surmataakse 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 kullest 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 kulleste 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 kulleste 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.
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 kullest olema võetud lähimast madalamast staadiumist. Kui kemikaaliga kokkupuute aga kiirendab arengut, peaksid täiendavad kullest 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 arvutatud mediaanse arengustaadiumiga kattuvust. Ainult sellistel juhtudel tuleks valimismeetodit muuta ja kasutada kontrollrühma mediaanses 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 kullest, 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			•

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 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 väärmoodustistega ega ebanormaalset, kuid ühe kullese morfogeneesi suhteline ajastus või eri kudede arengu ajastus on häiritud.

Tagajäseme pikkus

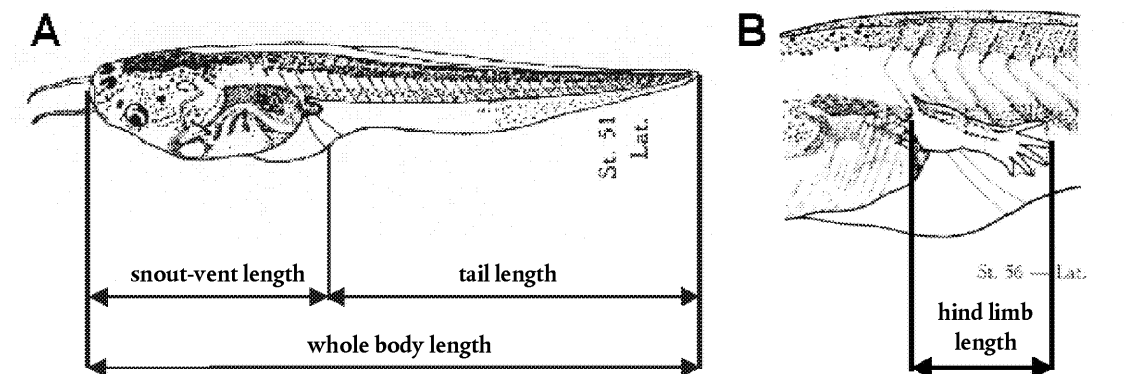
36. Kilpnäärmehormoonide kontrolli all olevad tagajäseme diferentseerumine ja kasv on peamised arengunäitajad, mida on juba kasutatud arengustaadiumi määramisel. Tagajäseme areng on arengustaadiumi määramisel kvalitatiivne näitaja, kuid siin vaadeldakse seda kvantitatiivse näitajana. Seepärast mõõdetakse tagajäseme pikkus kui näitaja, mis võimaldab kindlaks teha mõju kilpnäärmeteljele (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.

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, folliikularakkude hüpertroofia ja hüperplaasia ning täiendavate kvalitatiivsete kriteeriumidena: folliikuli valendiku ristlõikepindala, kolloidsus ja folliikularakkude 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 arengupeetust 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 kulleled hõljuvad veesambas, saba peast kõrgemal, sabauim peksleb korrapäraselt kindlas rütmis, nad tõusevad aeg-ajalt pinnale, nende lõpusekatted 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 nimetada 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 biolagunemise 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 katsesüsteemi, toetava keskkonna ja taristu toimimise kohta. Tüüpilised andmed hõlmavad järgmist: ruumi temperatuur, katsenõude temperatuur, valgustusperiood, kokkupuutesüsteemi oluliste osade (nt pumbad, tsükliloendajad, rõhud) toimimine, voolukiirused, veetasemed, varulahusepudeli vahetamised ja andmed söötmise kohta. Üldised vee kvaliteedi näitajad on järgmised: pH, lahustunud hapniku sisaldus, elektrijuhtivus, 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 surmajuhutumite, sööda tarbimise, ebanormaalse ujumise, letargia, tasakaalukaotuste, väärarendite, vigastuste jne kohta. Ettenähtud ajavahemike järel kogutavad tähelepanekud ja andmed hõlmavad järgmist: arengustaadium, tagajäseme pikkus, ninamiku-pärakuava vahekaugus ja märgkaal;
- 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 suuniseks. 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. protsentiil ei tohiks erineda rohkem kui 4 staadiumi võrra
Lahustunud hapniku kontsentratsioon	$\geq 40\%$ õhu küllastuskontsentratsioonist (*)

Kriteerium	Lubatavad piirid
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 ± 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	≥ 2
Paralleelkatsete tulemused	Kuni 2 paralleelkatset kogu uuringu kohta võivad ebaõnnestuda
Eritingimused lahusti kasutamise korral	Kui kandainena 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 uuendussüsteemi 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 söödatsiooni 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 paralleelkatse 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:

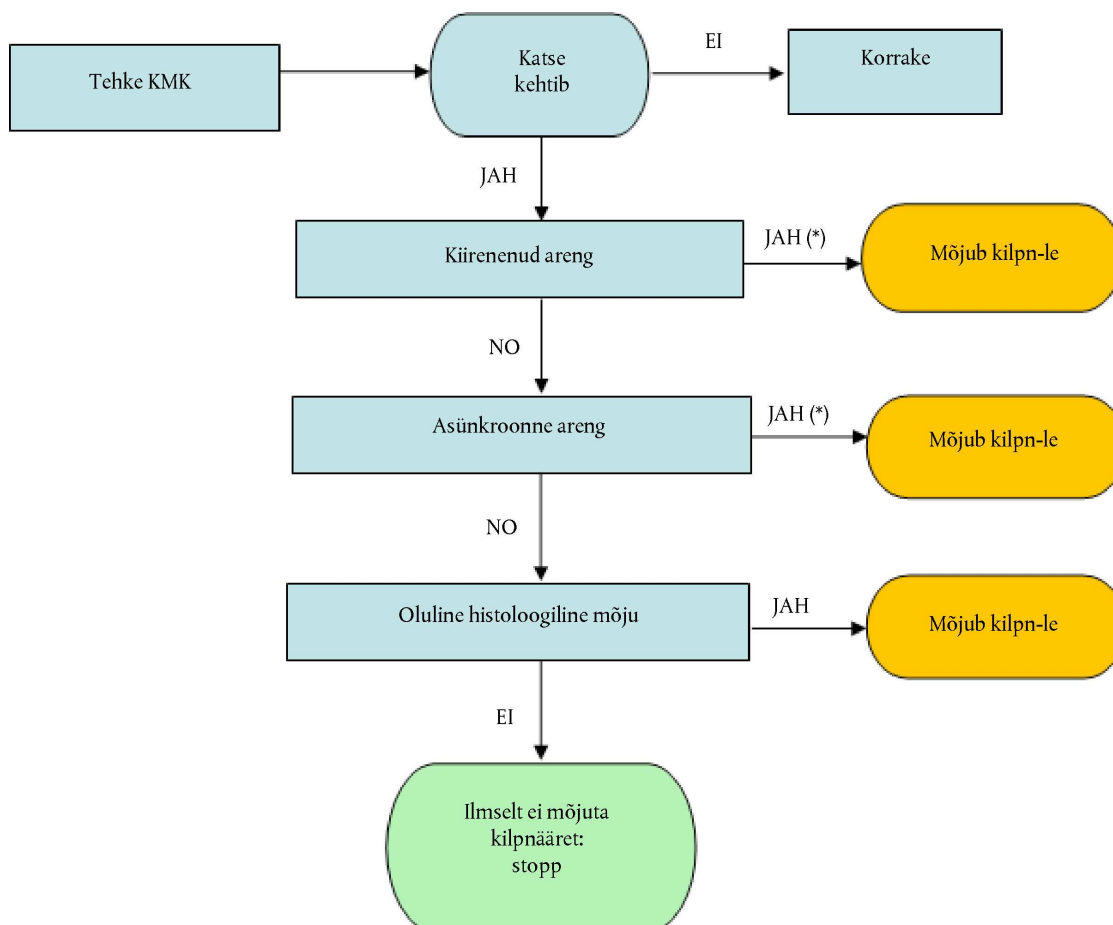
- (1) kontrollrühmades ei ületa suremus kahte kullest paralleelkatse kohta.

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.

Joonis 3.

Otsustamisskeem kahepaiksete metamorfoosi katse (KMK, ingl k. AMA) puhul



(*) Mõni reguleeriv asutus võib nõuda histoloogiat 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.
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 toimemehhanismid on kemikaalide mõju kilpnäärmehormoonide perifeersele mõjule ja/või kilpnäärmehormoonide metabolismile arenevates kudedes, nagu on täheldatud dejodinaasi inhibiitorite puhul.
53. Asünkroonse arengu hindamine katseloomadel võrreldes kontrollrühmade loomadega põhineb üldisel morfoloogilisel hindamisel, mis toimub uuringu 7. ja 21. päeval.
54. Nieuwkoopi ja Faberi esitatud *Xenopus laevis*'e normaalse arengu kirjeldus (8) määrab raamistiku, mille põhjal tehakse kindlaks normaalne kudede ümberkujunemise järjestus. Mõiste „asünkroonne areng” osutab konkreetselt

sellele kõrvalekalletele kullese 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 lisaõrmi/-varbaid), või muid limseid jäsemete vääraarenguid 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.

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

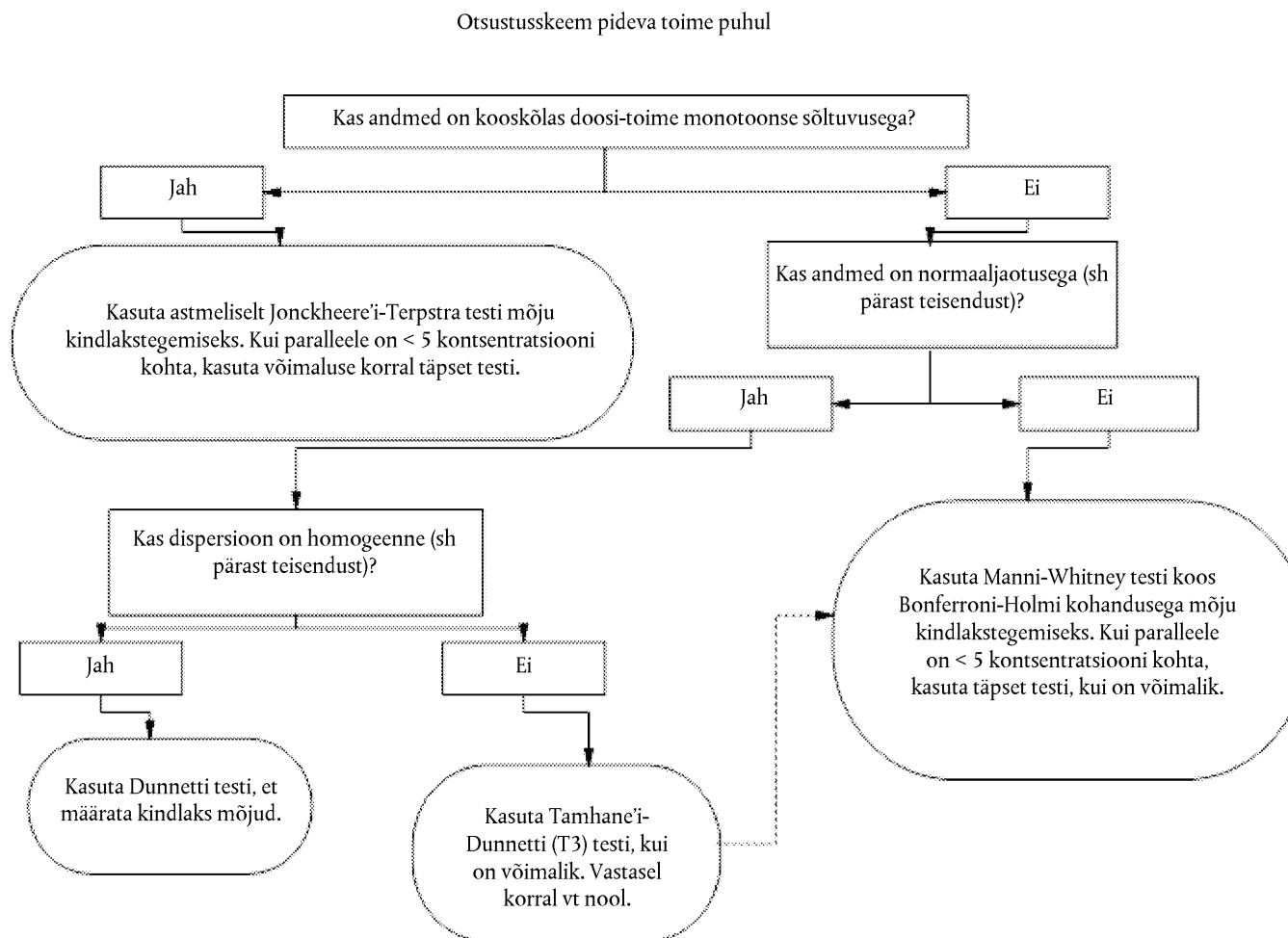
vähendatakse valepositiivsete tulemuste tõenäosust. Ülemäärane suremus näitab selgelt, et olulised on muud mürgisuse mehhanismid. Samuti tähendab kasvu kerge vähenemine, mis tehakse kindlaks märgkaalu ja/või ninamiku-päraku vahemaa kaudu, et tegemist on muu kui kilpnäärmele suunatud mürgisusega. Kasvu 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 söödatabimine, 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.

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. Rakendamisjuhend) (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 U-testiga. Kui ei õnnestu leida normaliseerivat teisendust, leitakse oluline kemikaaliga kokkupuute mõju Mann-Whitney-Wilcoxon 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 suremust ei eeldata, kuid seda tuleks hinnata astmelise Cochran-Armitage'i testiga, kui andmed on kooskõlas doosi-toime vahelise monotoonse sõltuvusega; vastupidisel juhul tuleks teha Fisheri täpne test Bonferroni-Holmi kohandusega.
66. Seda, kas kemikaaliga kokkupuude 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.



Konkreetsed kaalutlused andmete analüüsi puhul

Ebaõnnestunud kokkupuuetasemekatsete kasutamine

69. Kui otsustatakse, et kas ühe paralleelkatse või terve kokkupuuetaseme puhul võib avalduda selge mürgisus ja see tuleks analüüsist kõrvale jätta, tuleb arvestada mitut tegurit. Selge mürgisus on määratletud rohkem kui kahe surmajuhumiga 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 kilpnäärmeiga 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 lahendusvee 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 analüüsides jätetakse välja üksnes väike osa ($\leq 20\%$) katseloomadest. Kui rohkem kulleseid ($\geq 20\%$) on ühel või mitmel nimikontsentratsioonil 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 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76, Paris.
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92, Paris.
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23, Paris.

- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
 - (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98
 - (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
 - (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
 - (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
 - (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
 - (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
-

1. 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	Aktiivsöel 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
	Valgustuse intensiivsus	600 kuni 2 000 luksit (möödetuna 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)

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

	Kontsen- tratsioon	Kokku- puute- rühma number	Paralleel- katse number	Isendi number	Isendi tun- nus	Arengus- taadium	Ninamiku- pärakuava vahemaa (mm)	Tagajä- seme pik- kus (mm)	Kogu or- ganismi 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							

	Kontsen- tratsioon	Kokku- puute- rühma number	Paralleel- katse number	Isendi number	Isendi tun- nus	Arengus- taadium	Ninamiku- pärakuava vahemaa (mm)	Tagajä- seme pik- kus (mm)	Kogu or- ganismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Kontsen- tratsioon	Kokku- puute- riühma number	Paralleel- katse number	Isendi number	Isendi tun- nus	Arengus- taadium	Ninamiku- pärakuava vahemaa (mm)	Tagajä- seme pik- kus (mm)	Kogu or- ganismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Kontsen- tratsioon	Kokku- puute- rühma number	Paralleel- katse number	Isendi number	Isendi tun- nus	Arengus- taadium	Ninamiku- pärakuava vahemaa (mm)	Tagajä- seme pik- kus (mm)	Kogu or- ganismi märgmass (mg)
RIDA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	MASS
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							

Tabel 3.

Uuritavate näitajate 7. ja 21. päeva andmetest arvutatud koondtulemused

Konts.	Parall.	Arenngustaadium			Ninamiku-pärakuava vahemaa (mm)		Tagajäseme pikkus (mm)		Mass (mg)	
		MIN	Mediaan	MAX	Keskmine	Std-hälve	Keskmine	Std-hälve	Keskmine	Std-hälve
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 2 sisestatud andmetega.

Tabel 4.

Igapäevased suremuse andmed

Katsepäev	Kuupäev	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!																
Arv paralleelkatses		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arv kokkupuuetaseme 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:

Tabel 6.

Keemiaandmete koondtabel

Kemikaali nimetus:																					
CASi nr:																					
Katsepäev	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!																				

Kemikaali nimetus:

CASi nr:

Katsepäev	Kuupäev	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
6	#Value!																					
7	#Value!																					
8	#Value!																					
9	#Value!																					
10	#Value!																					
11	#Value!																					
12	#Value!																					
13	#Value!																					
14	#Value!																					
15	#Value!																					
16	#Value!																					
17	#Value!																					
18	#Value!																					
19	#Value!																					
20	#Value!																					
21	#Value!																					

Märkus: arvutused lahtrites on seotud tabelisse 1 sisestatud andmetega.

Tabel 7.

Tabel histopatoloogiliste leidude esitamiseks põhikriteeriumide järgi

Kuup äev:

Keemiline aine:

Patoloog:

Kontroll-looma ID - paralleelkatse 1	Kontroll-looma ID - paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Doosilooma ID - paralleelkatse 1	Doosilooma ID - paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Doosilooma ID - paralleelkatse 1	Doosilooma ID - paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Doosilooma ID - paralleelkatse 1	Doosilooma ID - paralleelkatse 2	Kilpnäärme hüpertroofia	Kilpnäärme atroofia	Follikulaarrakkude hüpertroofia	Follikulaarrakkude hüperplaasia
Kokku:					

Tabel 8.

Täiendavad histopatoloogilised kriteeriumid

Kuupäev:

Keemiline aine:

Patoloog:

Kontroll-looma ID - paralleelkatse 1		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kontroll-looma ID - paralleelkatse 2		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID - paralleelkatse 1		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Doosilooma ID - paralleelkatse 2		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID - paralleelkatse 1		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Doosilooma ID - paralleelkatse 2		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

Doosilooma ID - paralleelkatse 1		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Doosilooma ID - paralleelkatse 2		Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala suurenemine	Folliikulaarvalendiku ristlõikepindala vähenemine
Kokku:			

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		

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-pärakuava vahe- maa (mm)	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Keskmine:																				
Märgmass (mg)	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	Keskmine:																				

Tabel 11.

Kahepaiksete metamorfoosi katse protokollis arengustadiumi andmete koondtabeli vorm päeva X jaoks (7. või 21. päev)

	Paralleel- katse	Kontroll				Doos 1					Doos 2					Doos 3				
		Mediaan	Min- ima- alne	Mak- sim- aaln- e	N	Mediaan	Min- ima- alne	Mak- sim- aaln- e	N	p- väärtus	Mediaan	Min- ima- alne	Mak- sim- aaln- e	N	p- väärtus	Mediaan	Min- ima- alne	Mak- sim- aaln- e	Mediaan	p- väärtus
Arengu-staa- dium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Kesk- mine:																			

3. liide

Massi ja pikkuse alternatiivne analüüs, kui hilisesse arengustaadiumi jõuab ühel või mitmel kontsentratsioonil üle 20 % kullestest

Kui paljud kullest ($\geq 20\%$) on ühel või mitmel nominaalsel kontsentratsioonil jõudnud arengus kaugemale kui 60. staadiumini, tuleks kõikide kulleste 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 Kullest(REP) on teine juhuslik mõju. Sellega käsitletakse paralleelkatset (REP) analüüsi üksusena ja see annab sisuliselt sama tulemuse kui REP*latestage keskvaartuste kaalutud analüüs, milles kaaludena on kasutatud loomade arvu iga keskvaartuse kohta. Kui andmed on vastuolus ANOVA normaaloletuse 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 keskvaartustega kõigi kontsentratsioonide puhul, kus LateStage = EI ja teise toime keskvaartustega 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.

*4. liide***Mõisted**

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

C.39. HOOGHÄNNALISTE MULLAS PALJUNEMISE KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 232 (2009). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata kemikaalide mõju hooghännaliste sigivusele mullas. Selle aluseks on olemasolevad meetodid (1, 2). Neitsissigiv *Folsomia candida* ja suguliselt sigiv *Folsomia fimetaria* on kaks kõige kättesaadavat hooghännaliste liiki; neid saab kasvatada ja need on kaubanduslikult kättesaadavad. Kui tuleb hinnata konkreetseid elupaiku, kus neid kaht liiki ei esine, saab käesolevat katse-eeskirja laiendada ka muudele hooghännaliste liikidele, kui need täidavad uuringu nõuetekohasuse kriteeriume.
2. Mullas elavad hooghännalised on ökotoksikoloogiliste katsete puhul ökoloogiliselt asjakohased loomad. Hooghännalised on kuuejalgsed, kellel on õhuke eksoskelett, mis laseb kergesti läbi õhku ja vett; nad on lüljalgsed, kelle kemikaalidega kokkupuute tee ja määr on teistsugused kui vihmaussidel ja valgeliimuklastel.
3. Hooghännaliste asustustihedus mullas ja lehekõdu kihtides ulatub paljudes maismaaökosüsteemides tavaliselt 10^5 isendini m^2 kohta (3, 4). Täiskasvanud looma pikkus on tavaliselt 0,5–5 mm, nende panus pinnases elavate loomade summaarsesse biomassi ja hingamisse on madal, hinnanguliselt 1–5 % (5). Nende kõige olulisem osa võib seepärast seisneda mulla protsesside reguleerimises, kuna nad toituvad mikroobidest ja on mikrofauna röövlomad. Hooghännalised on saakloomad paljude mullas ja selle pinnal elavate selgrootute jaoks nagu lestad, sajajalgsed, ämblikud, jooksiklased ja lühitiiblasted. Hooghännalised aitavad kaasa lagunemisprotsessidele happelises mullas, kus nad võivad osutada kõige olulisemateks selgrootuteks valgeliimuklaste kõrval, kuna vihmausse ja tuhatjalgseid seal tavaliselt ei ole.
4. *F. fimetaria* on levinud üle kogu maailma ja on tavaline mitmes mullatüübis liivmuldadest liivsavimuldadeni ja kõdumullast huumusmullani. See on silmadeta ja pigmendita hooghännaline. Teda on leitud põllumajanduslikust pinnasest kogu Euroopas (6). Ta on kõigesööja, sööb muu hulgas seeneniite, baktereid, algloomi ja detriti. Toitumise kaudu puutub ta kokku taimede seenhaiguste tekitajatega (7) ja võib mõjutada seeneniidistikku, nagu on teada *F. candida* kohta. Nagu enamik hooghännalisi, paljuneb ta suguliselt, seepärast peavad alati kohal olema isasloomad munade viljastamiseks.
5. Ka *F. candida* on levinud kogu maailmas. Kuigi ta ei ole tavaline enamikus looduslikest muldadest, esineb teda väga rohkearvuliselt huumusrikastes kohtades. See on silmadeta ja pigmendita hooghännaline. Tal on hästi arenenud *furca* (hüppamisorgan, hark), ta jookseb aktiivselt ja on häirimise korral kohe valmis hüppama. *F. candida* ökoloogiline roll on sarnane *F. fimetaria* omale, kuid tema elupaigaks on rohke orgaanilise aine sisaldusega muld. *F. candida* paljuneb neitsissigimisega. Isasloomi esineb harvemini kui üks tuhande kohta.

KATSE PÕHIMÕTE

6. Sünkroonsed täiskasvanud (*F. fimetaria*) või noorjärgus (*F. candida*) hooghännalised viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaali mitme kontsentratsiooniga; kemikaal on segatud kunstlikku pinnasesse (8), mille puhul kasutatakse 5 % orgaanilise aine sisaldust (või mingisse muusse pinnasesse). Katse käigu võib jagada kahte etappi:
 - doosipiirkonna määramise katse, kui ei ole piisavalt teavet mürgisuse kohta; katses määratakse kaks peamist näitajat, suuremus ja paljunemine, mida hinnatakse pärast 2 nädalat *F. fimetaria* ja 3 nädalat *F. candida* puhul;
 - paljunemise põhikatse, millega hinnatakse vanemloomadest saadavate noorloomade arvu ja vanemate ellujäämist. Selle põhikatse kestus on 3 nädalat *F. fimetaria* või 4 nädalat *F. candida* puhul.

Uuritava kemikaali mürgised mõjud täiskasvanute suuremusele ja sigivusele väljendatakse LC_x ja EC_x kujul, mille leidmiseks töödeldakse andmeid sobiva mittelineaarse regressiooniga, et leida kontsentratsioon, mis põhjustab loomadel x % isendite surma või sigivuse vähenemise x %, või alternatiivina NOEC/LOEC väärtusena (9).

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Oleks hea eelnevalt teada uuritava kemikaali füüsikalisi omadusi, vees lahustuvust, $\log K_{ow}$ väärtust, pinnases oleva vee ja pinnase vahel jaotumise koefitsienti ja aururõhku. Soovitatav oleks teada, mis juhtub uuritava kemikaaliga pinnases, näiteks fotolüüsi ja hüdrolyüsi ning biolagunemise kiirust. Protokolli tuleks kanda uuritava kemikaali keemiline nimetus IUPACi nomenklatuuri järgi, CASi number, partii, saadeti, struktuurivalem ja puhtus, kui need on kättesaadavad.
8. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada nii vees lahustuvate kui ka lahustumatute kemikaalide puhul. Uuritava kemikaaliga kokkupuutesse viimise meetod on kummalgi juhul siiski erinev. Katsemeetod ei ole kohaldatav lenduvatele kemikaalidele, s.t kemikaalidele, mille Henry konstant või õhu/vee jaotuskoefitsient on suurem kui 1, või kemikaalidele, mille aururõhk temperatuuril 25 °C on suurem kui 0,0133 Pa.

KATSE NÕUETEKOHASUS

9. Järgmised kriteeriumid kemikaaliga mitte kokku puutunud kontrollrühmade puhul peaksid olema täidetud selleks, et katse tulemusi saaks lugeda nõuetekohaseks:
 - täiskasvanud isendite suremus ei ületa katse lõpuks 20 %;
 - noorte keskmine arv nõus peaks katse lõpus olema vähemalt 100;
 - noorloomade arvu jaoks arvutatud dispersioon peaks olema väiksem kui 30 % põhikatse lõpus.

VÕRDLUSKEMIKAAL

10. Katse jaoks valitud mullatüübi puhul tuleks teha katseid võrdluskemikaaliga selle kontsentratsioonil EC_{50} kas korrapäraste ajavahemike järel või igas uuritava kemikaaliga tehtavas katses; sellega kontrollitakse, et katsesüsteemis reageerivad uuritavad loomad kemikaalile normaalselt. Sobiv võrdluskemikaal on boorhape, mis peaks kontsentratsioonil ligikaudu 100 mg mulla kuivmassi kg kohta (10, 11) vähendama mõlema liigi paljunemist 50 %.

KATSE KIRJELDUS

Katsenõud ja seadmed

11. Sobiv katsenõu on selline, milles saab hoida 30 g niisket pinnast. Nõu materjal peab olema klaas või inertne plastik (mitte mürgine). Plastiknõude kasutamist tuleks siiski vältida, kui loomade kokkupuude uuritava kemikaaliga selles väheneb, kuna kemikaal sorbeerub nõule. Katsenõu ristlõike pindala peaks olema selline, et tegelik pinnase sügavus nõus on 2–4 cm. Nõud peaksid olema kaanega (nt klaasist või polüetüleenist), ning kaas peaks olema selline, mis vähendab vee aurustumist, kuid võimaldab gaaside vahetust pinnase ja õhu vahel. Nõu peaks olema vähemalt osaliselt läbipaistev, et sellesse pääseks valgus.
12. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:
 - kuivatuskapp;
 - stereomikroskoop;
 - pH-meeter ja luksmeeter;
 - sobiv täpne kaal;
 - temperatuuri reguleerimiseks vajalik varustus;
 - asjakohased seadmed õhuniiskuse kontrolli all hoidmiseks (ei ole kohustuslikud, kui nõud on kaetud kaanega);
 - reguleeritava temperatuuriga inkubaator või väike ruum;
 - pintsetid või õhuvooluga töötav imemisseade.

Katses kasutatava pinnase ettevalmistamine

13. Katses kasutatakse modifitseeritud tehismulda, mille orgaanilise aine sisaldus on 5 % (8). Teise võimalusena võib kasutada looduslikku mulda, kuna tehismuld ei sarnane loodusliku mullaga. Tehismulla soovitatav koostis on järgmine (väljendatud kuivmassina, kuivatatud 105 °C juures püsiva massini):
 - 5 % *Sphagnum*-turvast, kuivatatud õhu käes ja peeneks jahvatatud (lubatud on osakese suurus 2 ± 1 mm);
 - 20 % kaoliinsavi (kaoliiniisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
 - ligikaudu 74 % õhukuiva tööstuslikku liiva (olenevalt vajalikust CaCO_3 kogusest), valdavalt peen liiv, milles üle 50 % osakekestest on vahemikus 50–200 mikronit. Liiva täpne kogus sõltub CaCO_3 kogusest (vt allpool); kokku peaksid nad moodustama 75 %;
 - 1,0 % kaltsiumkarbonaati (pulbriline CaCO_3 , analüütiliselt puhas), et viia pH vahemikku $6,0 \pm 0,5$; lisatava kaltsiumkarbonaadi kogus võib sõltuda peamiselt turba kvaliteedist ja laadist (vt märkus 1).

Märkus 1: vajalik CaCO_3 kogus sõltub pinnase substraadi komponentidest ja see tuleks määrata eelinkubeeritud niiske pinnase osaproovide pH määramisega vahetult enne katset.

Märkus 2: soovitatav on mõõta pH ja soovi korral ka C/N suhe, kationivahetuse mahtuvus (*Cation Exchange Capacity*, CEC) ja orgaanilise aine sisaldus pinnases, et võimaldada nende normaliseerimist hilisemas etapis ja tulemuste paremat tõlgendamist.

Märkus 3: vajaduse korral, näiteks eriotstarbelise katse korraldamisel, võib katses ja/või kasvusubstraadina kasutada ka looduslikku pinnast saastumata kohtadest. Kui kasutatakse looduslikku mulda, tuleb seda iseloomustada, esitada vähemalt päritolu (võtmise koht), pH, tekstuur (osakeste suurusjaotus), kationivahetuse mahtuvus (*cation exchange capacity*, CEC) ja orgaanilise aine sisaldus ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid. Loodusliku mulla puhul on soovitatav näidata selle sobivust katse jaoks ja katse nõuetekohasuse kriteeriumide täitmist enne põhikatse tegemist.

14. Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (näiteks suuremahulises laborisegistis). Tehismulla maksimaalne veemahutavus määratakse 5. liites esitatud meetodiga. Katses kasutatava pinnase niiskusesisaldus tuleks optimeerida, et saavutada kohev poorne mulla struktuur, mis võimaldab hooghännalistel pooridesse siseneda. See on tavaliselt 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest.
15. Kuiv tehismuld tehakse 2–7 päeva enne katse alustamist niiskeks, et tasakaalustada/stabiliseerida happesust; selleks lisatakse piisav kogus deioniseeritud vett, et saada ligikaudu pool lõplikust veesisaldusest. pH määramiseks kasutatakse mulla ja 1 M kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M kaltsiumkloriidi (CaCl_2) lahuse segu suhtega 1:5 (vt 6. liide). Kui pinnas on nõutavast happelisem, võib seda reguleerida vajaliku koguse CaCO_3 lisamisega. Kui pinnas on liiga aluseline, saab seda reguleerida mõne hooghännaliste jaoks kahjutu anorgaanilise happe lisamisega.
16. Eelnevalt niisutatud muld jagatakse nii mitmeks osaks, kui palju on uuritavaid kemikaali (ja vajaduse korral võrdluskemikaali) kontsentratsioone ja kontrollrühmi, mida kasutatakse katses. Lisatakse uuritav kemikaal ja mulla niiskusesisaldus reguleeritakse vastavalt punktile 24.

Katsealuste loomade valimine ja ettevalmistamine

17. Soovitatav liik on neitsissigiv hooghännaline *F. candida*, kuna käesoleva meetodi võrdleval katsetamisel eri laborites (11) vastasid ellujäämise tulemused selle liigi korral sagedamini nõuetekohasuse kriteeriumidele kui *F. fimetaria* puhul. Kui kasutatakse muud liiki, peaks see vastama punktis 9 esitatud nõuetekohasuse kriteeriumidele. Katse alguses peaksid katseloomad olema hästi söödetud ja nende vanus peaks olema vahemikus 23–26 päeva *F. fimetaria* ja 9–12 päeva *F. candida* puhul. Igas paralleelkatsenõus tuleks kasutada *F. fimetaria* puhul 10 isas- ja 10 emaslooma ning *F. candida* puhul 10 emaslooma (vt 2. ja 3. liide). Sünkroonsed loomad võetakse nõudest juhuvalikuga ning nende tervislikku ja füüsilist seisundit kontrollitakse iga paralleelkatsetes kasutatava partii puhul. Kõik 10 või 20 isendist koosnevad rühmad viiakse üle juhuslikkuse alusel valitud katseanumatesse ning suured *F. fimetaria* emasloomad valitakse selliselt, et neid saaks korralikult eristada *F. fimetaria* isasloomadest.

Uuritavate kontsentratsioonide valmistamine

18. Uuritavat kemikaali võib manustada nelja meetodiga: 1) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena vett, 2) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena orgaanilist lahustit, 3) kemikaal segatakse pinnasesse, kasutades kandeainena liiva, või 4) kemikaal kantakse mulla pinnale. Sobiva meetodi valik sõltub kemikaali omadustest ja katse eesmärgist. Üldiselt soovitatakse uuritav kemikaal segada mulla sisse. Vajalik võib olla siiski eelistada sellist manustamisviisi, mis on kooskõlas uuritava kemikaali praktilise kasutamisega (näiteks vedelikvormi pihustamine või eriliste pestitsiidivormide, nagu graanulid või seemnete puhtimislahused, kasutamine). Pinnast töödeldakse enne hooghännaliste lisamist, välja arvatud juhul, kui uuritav kemikaal kantakse mulla pinnale – sel juhul tuleks hooghännalistel lasta enne tungida pinnasesse.

Vees lahustuv uuritav kemikaal

19. Valmistatakse piisav kogus uuritava kemikaali lahust deioniseeritud vees, millest piisab ühe uuritava kontsentratsiooni kõikide paralleelkatsete loomiseks. Iga uuritava kemikaali lahust segatakse põhjalikult eelnevalt niisutatud mullaga, enne kui see viiakse katsenõusse.

Vees mittelahustuv uuritav kemikaal

20. Kui kemikaal ei lahustu vees, kuid lahustub orgaanilistes lahustites, võib uuritava kemikaali lahustada sobiva lahusti (nt atsetooni) võimalikult väikses koguses, mis veel võimaldab lahuse korraliku segamise mullaga, ja segada see vajaliku kvartsliivakogusega. Tuleks kasutada üksnes lenduvaid lahusteid. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit, tuleb kõikide uuritavate kontsentratsioonide ja täiendava lahusti negatiivse kontrolli puhul lisada ühesugune minimaalne kogus lahustit. Nõud, millesse lahusti abil viidi uuritav kemikaal, tuleb jätta teatavaks ajaks ilma katteta, et uuritava kemikaali lisamiseks kasutatud lahusti saaks auruda; tuleb tagada, et mürgine kemikaal ei lenduks selle ajaga.

Uuritav kemikaal, mis lahustub halvasti vees ja orgaanilistes lahustites

21. Kui kemikaal lahustub halvasti vees ja orgaanilistes lahustites, segatakse uuritavat kemikaali kvartsliiivaga, mis peaks olema osa pinnasesse lisatavast liivakogusest, et saada katseks vajalik kontsentratsioon. See kvartsliiiva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelnevalt niisutatud mullale ning segatakse sellega põhjalikult läbi pärast sobiva niiskusesisalduse saamiseks vajaliku koguse deioniseeritud vee lisamist. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Sama protseduuri korratakse iga uuritava aine kontsentratsiooni puhul ja samuti asjakohase kontrolli valmistamisel.

Uuritava kemikaali kandmine mulla pinnale

22. Kui uuritav kemikaal on pestitsiid, võib olla asjakohane kanda seda mulla pinnale pihustamise teel. Mulda töödeldakse pärast hooghännaliste lisamist. Katsenõud täidetakse kõigepealt niisutatud pinnasesubstraadiga, seejärel lisatakse katseloomad ja seejärel katsenõud kaalutakse. Selleks, et vältida loomade otsest kokkupuudet uuritava kemikaaliga, lisatakse viimane vähemalt pool tundi pärast hooghännaliste lisamist. Uuritav kemikaal tuleks kanda mulla pinnale võimalikult ühtlaselt, kasutades põllu töötlemise modelleerimiseks sobivat laboratoorset pihustusseadet. Pealekandmine peaks toimuma temperatuuridel, mille vahemik ei ületa ± 2 °C, ning vesilahuste, -emulsioonide või -dispersioonide puhul vee peale kandmise kiirusega, mis on kooskõlas riskihindamise soovistustega. Seda kiirust tuleks kontrollida, kasutades sobivat kaliibrimismeetodit. Erilisi pestitsiidivorme nagu graanulid või seemnete puhtimislahused tuleks peale kanda viisil, mis on kooskõlas põllumajandusliku kasutusega. Sööt lisatakse pärast pihustamist.

MÄÄRAMISE KÄIK**Katsetingimused**

23. Katse keskmine temperatuur peaks olema 20 ± 1 °C temperatuuri vahemikus 20 ± 2 °C. Katse tehakse kontrollitavate valgustusüklite režiimis (eelstatavalt 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust), valgustus katsenõude piirkonnas 400 kuni 800 luksit.

24. Pinnase niiskuse kontrolli all hoidmiseks kaalutakse katsenõud katse alguses, keskel ja lõpus. Kaalu vähenemine > 2 % kompenseeritakse deioniseeritud vee lisamisega. Tuleb märkida, et veekadu saab vähendada kõrge õhuniiskuse sisaldusega (> 80 %) katseinkubaatoris.
25. pH-d mõõdetakse nii doosipiirkonna leidmise katse kui ka põhikatse alguses ja lõpus. Mõõtmised tuleb teha ühe täiendava kontrollkatse ja ühe täiendava kemikaalikatse (kõik kontsentratsioonid) jaoks valmistatud pinnaseproovidega, mis on valmistatud ja mida säilitatakse samal viisil kui uuritava ainega katsetes, kuid millele hooghännalisi ei lisata.

Katse käik ja mõõtmised

26. Iga uuritava kontsentratsiooni jaoks pannakse katsenõusse 30 g värsket uuritavat mulda. Samuti valmistatakse ette ka vee kontrollkatsed ilma uuritava kemikaalita. Kui uuritava kemikaali pealekandmiseks kasutatakse kandainet, tuleks lisaks uuritava kemikaali seeriale teha ka üks kontrollseeria, mis sisaldab üksnes kandainet. Lahusti või dispergaatori kasutamise korral peaks nende kontsentratsioon olema sama, mida kasutati uuritavat kemikaali sisaldavates nõudes.
27. Hooghännaliste üksikisendid viiakse hoolikalt üle igasse katsenõusse (mille vahel nad jaotatakse juhuvaliku alusel) ja paigutatakse mulla pinnale. Loomakesi saab tõhusamalt üle kanda õhuvooluga, kasutades nõrgatoimelist imemisseadet. Iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollrühmaga tehtavate paralleelkatsete arv sõltub katse kavandamisest. Katsenõud paigutatakse inkubaatorisse juhuslikult ja need paigutatakse iga nädal uuesti juhuslikkuse alusel ümber.
28. Igas *F. fimetaria*'ga tehtavas katses kasutatakse 20 täiskasvanut, 10 isas- ja 10 emaslooma (vanusega 23–26 päeva) katsenõu kohta. 21. päeval võetakse hooghännalised mullast välja ja loendatakse. Sünkroniseeritud loomade partiis eristatakse *F. fimetaria* isendeid soo järgi suuruse põhjal. Emasloomad on selgelt suuremad kui isasloomad (vt 3. liide).
29. Kui katse tehakse *F. candida*'ga, tuleks kasutada kümnet 9–12 päeva vanust noorlooma katsenõu kohta. 28. päeval võetakse hooghännalised mullast välja ja loendatakse.
30. Sobiva söödaallikana lisatakse katse alguses ja pärast umbes kahte nädalat igasse nõusse piisav kogus, nt 2–10 mg granuleeritud kuivatatud pagaripärmi, mida müüakse koduseks kasutamiseks.
31. Katse lõpus hinnatakse suremust ja paljunemist. Kolme nädala (*F. fimetaria*) või nelja nädala (*F. candida*) pärast võetakse hooghännalised katses kasutatud mullast välja (vt 4. liide) ja loendatakse (12). Hooghännaline loetakse surnuks, kui teda ei ole väljavõetute hulgas. Loomakeste väljavõtmise ja loendamise meetodid peavad olema valideeritud. Valideeritud meetodi puhul on noorloomade väljavõtmise tõhusus üle 95 %; näiteks viiakse neid selle määramiseks pinnasesse loetud arv.
32. Katse praktilise läbiviimise kokkuvõtte ja ajakava on kirjeldatud 2. liites.

Katse kavandamine

Doosipiirkonna leidmise katse

33. Vajaduse korral tehakse doosipiirkonna leidmise katse, näiteks uuritava kemikaali viie kontsentratsiooniga, 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg pinnase kuivmassi kg kohta, kasutades iga kokkupuutetaseme juures ja kontrollrühma puhul kaht paralleelkatset. Täiendav teave hooghännaliste suremuse või paljunemise kohta kas sarnaste kemikaalidega tehtud katsetest või kirjandusest võib aidata teha otsust doosipiirkonna määramise katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.
34. Doosipiirkonna määramise katse kestus on kaks nädalat *F. fimetaria* ja kolm nädalat *F. candida* puhul, et tagada ühe põlvkonna järglaste saamine. Katse lõpus hinnatakse hooghännaliste suremust ja paljunemist. Tuleb registreerida täiskasvanute ja noorloomade arv.

Põhikatsed

35. EC_x (nt EC_{10} , EC_{50}) määramiseks tuleb teha katse 12 kontsentratsiooniga. Soovitav on teha vähemalt kaks paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja kuus paralleelkatset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide vahekaugused võivad olla mitmesugused, sõltuvalt doosi ja toime seosest.
36. Tähtsatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni (NOEC) ja vähima tähtsatavat toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) leidmiseks tuleb kasutada vähemalt viit geomeetrilises reas olevat kontsentratsiooni. Soovitav on teha neli paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja lisaks kaheksa katset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide erinevused ei tohiks olla suuremad kui 1,8 korda.
37. Kombineeritud lähenemisviis võimaldab määrata nii NOEC/LOEC kui ka EC_x . Sellise kombineeritud lähenemisviisi puhul tuleks kasutada kaheksat kontsentratsiooni geomeetrilises jadas. Soovitav on teha neli paralleelkatset iga uuritava kontsentratsiooni juures ja kaheksa katset kontrollrühmaga. Kontsentratsioonide erinevused ei tohiks olla suuremad kui 1,8 korda.
38. Kui doosipiirkonna määramise katses ei täheldata mingit mõju suurimal kontsentratsioonil (st 1 000 mg/kg juures), võib teha paljunemise katse piirsalduskatsena, kasutades uuritava aine kontsentratsiooni 1 000 mg/kg ja kontrollrühma. Piirsalduskatse annab võimaluse näidata, et piirkontsentratsiooni juures ei ole statistiliselt märkimisväärset mõju. Tuleb teha kaheksa paralleelkatset nii kemikaaliga töödeldud mullaproovidega kui ka kontrollrühmadega.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

39. Sigivus on peamine näitaja (nt saadud noorloomade arv katsenõu kohta). Statistilises analüüsis, näiteks ANOVA arvutustes, võrreldakse kemikaaliga töödeldud rühmade tulemusi Studenti t-testi, Dunnetti testi või Williamsi testi abil. Üksikute kontsentratsioonitasemete keskvärtuste jaoks arvutatakse 95 % usaldusvahemikud.
40. Ellujäänud täiskasvanud loomade arv kemikaaliga mõjutamata kontrollrühmades on üks peamisi katse nõuetekohasuse kriteeriume ja see tuleb dokumenteerida. Nagu doosipiirkonna määramise katse, nii ka põhikatsed tuleks lõpp-protokollis teatada ka kõik muud kahjulikkuse sümptomid.

LC_x ja EC_x

41. EC_x väärtused koos nendega seotud 95 % usaldusvahemiku ülemise ja alumise piiriga arvutatakse asjakohaste statistiliste meetoditega (nt logistiline või Weibulli funktsioon, kohandatud Spearman-Kärberi meetod või lihtne interpolatsioon). EC_x saadakse leitud võrrandisse väärtuse sisestamisega, mis vastab x %-le kontrollrühma keskvärtusest. EC_{50} või mõne muu EC_x arvutamiseks tuleb kõiki andmeid töödelda regressioonanalüüsiga. LC_{50} määratakse tavaliselt probitanalüüsi vms analüüsiga, milles võetakse arvesse suremusandmete binomiaaljaotust.

Tähtsatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) / vähim tähtsatavat toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC)

42. Kui statistilise analüüsi eesmärk on määrata NOEC/LOEC, siis on vaja statistikat iga nõu kohta (iga üksik nõu on paralleelkatse). Tuleb kasutada vastavaid statistilisi meetodeid vastavalt OECD dokumendile 54 „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” (Ökotoxilisuse andmete statistilise analüüsi kaasaegsed meetodid. Rakendamisjuhend) (9). Üldiselt otsitakse andmetest uuritava kemikaali negatiivset mõju võrreldes kontrollrühmaga, kasutades selleks ühepoolse hüpoteesi testimist $p \leq 0,05$ juures.
43. Normaaljaotuse olemasolu ja dispersiooni homogeensust võib kontrollida asjakohase statistilise testiga, nt Shapiro-Wilki testi ja Levene'i testiga ($p \leq 0,05$). Võib teha ühesuunalise dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja sellele järgnevat mitmese võrdluse teste. Mitmeseid võrdlusi (nt Dunnetti testi) või sammuviietilise muutujate elimineerimise trendi teste (nt Williamsi testi) saab kasutada selleks, et arvutada, kas esineb olulisi erinevusi ($p \leq 0,05$) kontrollrühmade ja uuritava kemikaali eri kontsentratsioonide vahel (soovitav test valitakse vastavalt OECD dokumendile nr 54 (9)). Teiselt poolt võib NOEC ja LOEC määramiseks kasutada mitteparameetrilisi meetodeid (nt Bonferroni U-testi vastavalt Holmi või Jonckheere'i-Terpstra trenditestile).

Piirsalduskatse

44. Kui tehakse piirsalduskatse (kontrollrühma võrreldakse uuritava kemikaali üheainsa kontsentratsiooni rühmaga) ja parameetrilise testimismeetodi nõuded (normaalsus, homogeenus) on täidetud, võib meetrilisi reaktsioone hinnata Studenti testiga (t-test). Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-testi (Welchi t-test) või mitteparameetrilist testi nagu Manni-Whitney U-test.
45. Oluliste erinevuste kindlakstegemiseks kontrollrühmade (kontroll ja lahusti kontroll) vahel võib iga kontrollrühma paralleelkatseid töödelda nii, nagu on kirjeldatud piirsalduskatse puhul. Kui nende testidega ei leita olulisi erinevusi, võib kontrolli ja lahusti kontrolli paralleelkatsed kokku panna. Vastasel korral tuleb kõiki kemikaaliga töödeldud rühmi võrrelda lahusti kontrolliga.

Katseprotokoll

46. Katseprotokollis esitatakse vähemalt alljärgnev teave:

Uuritav kemikaal

- uuritava kemikaali nimetus, partii, saadetise ja CASi number, puhtus;
- uuritava kemikaali füüsikalised-keemilised omadused (nt $\log K_{ow}$, lahustuvus vees, aururõhk, Henry konstant (H)) ja eelistatavalt teave selle kohta, mis juhtub uuritava kemikaaliga mullas, kui see on teada;
- kui katseid ei tehtud puhta kemikaaliga, tuleks täpsustada uuritava kemikaali koostis ja lisandid;

Katseloomad

- liigi nimetus ja loomade tarnija, kasvatustingimuste kirjeldus ja vanusevahemik;

Katsetingimused

- katseplaani ja läbiviimise kirjeldus;
- katsepinnase valmistamise üksikasjad; kui kasutatakse looduslikku mulda, siis selle üksikasjalik kirjeldus (võtmiskoht, ajalugu, osakeste suurusjaotus, pH, orgaanilise aine sisaldus);
- pinnase veemahutavus;
- kirjeldus, millist meetodit kasutati uuritava kemikaali viimiseks pinnasesse;
- katsetingimused: valguse intensiivsus, valgustustsüklite kestus, temperatuur;
- söötmissrežiimi kirjeldus, sööda tüüp ja kogus, mida katses kasutati, söötmissajad;
- mulla pH ja veesisaldus katse alguses ja lõpus (kontrollnõudes ja igal uuritud kontsentratsioonil);
- loomakeste väljavõtmise meetodi üksikasjalik kirjeldus ja tõhusus;

Katsetulemused

- noorloomade arv, mis määratakse igas katsenõus katse lõpus;
- täiskasvanute arv ja nende suremus (%) igas katsenõus katse lõpus;
- ilmnunud füsioloogiliste või patoloogiliste sümptomite või selgete käitumise muutuste kirjeldus;
- võrdluskemikaaliga saadud tulemused;
- NOEC/LOEC, suremuse LC_x ja paljunemise EC_x väärtused (tavaliselt LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} ja EC_{10}) koos 95 % usaldusvahemikuga. Andmete kirjeldamiseks kasutatud mudeli graafik, selle võrrand ja sobitamise leitud parameetrid (vt (9));

- kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.
- kui testiti hüpoteesi, siis tegeliku testi võimsus (9);
- kõrvalekalded käesolevast katsemeetodist ja kõik katse jooksul esinenud ebatavalised nähtused;
- katse nõuetekohasus;
- kui hinnati täheldatavat toimet mitteavaldavat kontsentratsiooni (NOEC), siis minimaalne tuvastatav erinevus.

KIRJANDUS

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneva
- (3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- (8) Käesoleva lisa peatükk C.36, „Röövlesta (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) sigivuse katse nullas”.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.
- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

1. liide

Mõisted

Käesolevas katsemeetodis on kasutatud järgmisi mõisteid (kõik mõjuga seotud kontsentratsioonid on väljendatud uuritava kemikaali massina katsepinnase kuivmassi kohta):

Kemikaal – aine või segu.

NOEC (*no observed effect concentration* – täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali kontsentratsioon, millel puudub täheldatav mõju. Käesoleva katsemeetodi puhul ei avalda NOEC-le vastav kontsentratsioon kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt olulist ($p < 0,05$) täheldatavat toimet teatava kokkupuuteaja jooksul.

LOEC (*lowest observed effect concentration* – vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon) – uuritava kemikaali madalaim kontsentratsioon, millel on kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt oluline mõju ($p < 0,05$) teatava kokkupuuteaja jooksul.

EC_x (x % toimet avaldav kontsentratsioon) – kontsentratsioon, mis põhjustab katseorganismidel kontrollrühmaga võrreldes x % toimest teatava kokkupuuteaja jooksul. Näiteks EC₅₀ on hinnanguline kontsentratsioon, mis avaldab 50 % kemikaaliga kokkupuutesse viidud isendite puhul teatava kokkupuuteaja jooksul mõju, mida mõõdetakse katses määratava näitajaga.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

2. liide

Hooghännaliste katse peamised toimingud ja ajakava

Katse etapid võib kokku võtta järgmiselt:

Aeg (päevad)	Toimingud
– 23 kuni – 26	Sünkroonse <i>F. fimetaria</i> kultuuri ettevalmistamine
– 14	Valmistatakse tehismuld (kuivade koostisosade kokkusegamine) Kontrollitakse tehismulla pH-d ja viiakse see vajaliku väärtuseni Mõõdetakse mulla maksimaalne veemahutavus
– 9 kuni – 12	Sünkroonse <i>F. candida</i> kultuuri ettevalmistamine
– 2 kuni – 7	Mulla eelnev niisutamine
– 1	Noorloomad jaotatakse partiidesse Valmistatakse põhilahused ja lisatakse uuritav kemikaal, kui on vajalik lahusti kasutamine
0	Valmistatakse põhilahused ja lisatakse uuritav kemikaal, kui see on vaja lisada tahke kemikaalina, vesilahusena või kui see on vaja kanda pinnale. Mõõdetakse mulla pH ja kaalutakse nõud. Lisatakse sööt. Mullale kantakse hooghännalised.
14	Doosipiirkonna leidmise katse <i>F. fimetaria</i> puhul: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass). Põhikatsed: mõõdetakse niiskusesisaldus ja täiendatakse veega ning lisatakse 2–10 mg pärmi
21	<i>F. fimetaria</i> põhikatse: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass). Doosipiirkonna leidmise katse <i>F. candida</i> puhul: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass).
28	<i>F. candida</i> põhikatse: lõpetatakse katse, võetakse loomad välja, mõõdetakse mulla pH ja veekadu (mass).

3. liide

F. fimetaria ja F. candida kasvatamise ja sünkroniseerimise juhised

Siinses juhendis esitatud aegu ja kestust tuleks kontrollida iga konkreetse hooghännalisetüvega, kuna on vaja tagada, et ajastamine võimaldaks saada piisavalt sünkroniseeritud noorloomad. Põhimõtteliselt määrab sobiva päeva munade ja sünkroonsete noorloomade kogumiseks munemise aeg pärast täiskasvanud loomade viimist värskesse substraati ja munade koorumiseni kuluv aeg.

Soovitav on kasutada alalist tüvikultuuri, mis koosneb näiteks 50 nõust / Petri tassist. Tüvikultuuri hoitakse heas toitumuses iganädalase söötmise, kastmise ja vana sööda ja laipade kõrvaldamisega. Kui hooghännalisi on substraadil liiga vähe, võib see pärssida nende elutegevust liigse seente kasvu tõttu. Kui tüvikultuuri kasutatakse munade tootmiseks liiga sageli, võib kultuur väsida. Väsimuse tunnused on surnud täiskasvanud ja hallitus substraadil. Kultuuri noorendamiseks võib kasutada sünkroniseeritud loomade saamisest ülejäänud mune.

Sünkroonses kultuuris saab *F. fimetaria* isasloomi eristada emasloomadest peamiselt suuruse alusel. Isasloomad on emasloomadest selgelt väiksemad ja nende kõndimise kiirus on suurem kui emasloomadel. Õige valimine soo järgi nõuab vaid natuke harjutamist ja tulemust saab kontrollida suguelundi piirkonna vaatlemisega mikroskoobi all (13).

1. Kasvatamine**1.a. Kasvatamissubstraadi valmistamine**

Kasvatamissubstraat on nn Pariisi krohv (kips ehk kaltsiumsulfaat) aktiivsõega. Need moodustavad kokku niiske substraadi, milles aktiivsõe ülesanne on siduda eralduvaid gaase ja väljaheiteid (14, 15). Hooghännaliste vaatlemise hõlbustamiseks võib kasutada mitmesuguseid aktiivsõe vorme. Näiteks *F. candida* ja *F. fimetaria* puhul kasutatakse pulbrilist aktiivsütt (mille tulemusel saadakse must/hall Pariisi krohv):

Substraadi koostisained:

- 20 ml aktiivsütt,
- 200 ml destilleeritud vett,
- 200 ml kipsi

või

- 50 g pulbrilist aktiivsütt,
- 260–300 ml destilleeritud vett,
- 400 g kipsi.

Substraadisegul lastakse enne kasutamist seista.

1.b. Paljundamine

Hooghännalisi hoitakse sellistes nõudes nagu Petri tassid (90 mm × 13 mm), mille põhi on kaetud 0,5 cm paksuse kipsi-sõe kihiga. Neid kasvatatakse 20 ± 1 °C juures ja valguse-pimeduse tsükkel on 12-12 tundi (400–800 luksit). Nõusid hoitakse alati niiskena ja tagatakse suhteline õhuniiskus nõudes 100 %. Seda saab tagada vaba vee olemasoluga poorses kipsis, kuid tuleb vältida veekihi tekkimist kipsi pinnal. Veekadu on võimalik vältida, kui ruumis tagatakse kõrge õhuniiskus. Kõik surnud isendid tuleks nõudest kõrvaldada, samuti hallitanud sööt. Munemise stimuleerimiseks on vaja viia täiskasvanud isendid üle Petri tassidesse, milles on kipsis ja aktiivsõest valmistatud värsket substraati.

1.c. Sööda päritolu

Nii *F. candida* kui ka *F. fimetaria* söödana kasutatakse granuleeritud kuivatatud pagaripärmi. Värsket sööta antakse üks või kaks korda nädalas, et vältida sööda hallitamist. Sööt pannakse väikse kuhjakesena otse kipsile. Lisatava pagaripärmi massi tuleb kohandada hooghännaliste populatsiooni suurusele; üldjuhul on piisav 2–15 mg.

2. Sünkroniseerimine

Katse tuleb teha sünkroniseeritud loomadega, et saada homogeenised katseloomad, kellel on üks ja sama arengustaadium ja suurus. Lisaks võimaldab sünkroniseerimine eristada *F. fimetaria* isas- ja emasloomi alates 3 nädala vanustest loomadest ja kasutada edaspidi soolist dimorfismi st suuruseerinevusi. Allpool esitatud toimumiskäik on ettepanek, kuidas saada sünkroniseeritud loomi (praktilised sammud ei ole kohustuslikud).

2.a. Sünkroniseerimine

- Valmistage ette nõud, milles on 0,5 cm paksune kiht kipsi-söe substraati.
- Munade saamiseks viige 150–200 täiskasvanud *F. fimetaria* isendit või 50–100 täiskasvanud *F. candida* isendit 15–20 parimast tüvikultuurinõust, milles on 4–8 nädala vanune substraat, ettevalmistatud nõudesse ja söödaks pange neile 15 mg pagaripärmi. Tuleks vältida noorloomade üle kandmist koos täiskasvanutega, kuna noorloomade juuresolek võib pidurdada munemist.
- Hoidke kultuuri 20 ± 1 °C juures (keskmine peaks olema 20 °C) ja valguse-pimeduse tsükli juures 12-12 tundi (400–800 luksit). Hoolitsege selle eest, et värske sööt oleks kättesaadav ja õhk oleks veeauruga küllastunud. Sööda puudumisel võivad loomad roojata munade peale, mille tulemusel hakkab munadel kasvama hallitus, või *F. candida* võib hakata sööma oma mune. 10 päeva pärast koguge munad ettevaatlikult nõela ja spaatli abil ja viige üle nn munapaberile (väiksed filterpaberitükid, mis on kastetud kipsi-aktiivsöe kõrdisse), ja pange see nõusse, milles on värske kipsi-aktiivsöe substraat. Lisage substraadile mõned terad pärmi, et noori juurde meelitada ja sundida neid lahkuma munapaberilt. Oluline on, et munapaber ja substraat oleksid niisked, muidu munad kuivavad ära. Teise võimalusena võib täiskasvanud loomad eemaldada sünkroniseerimiskultuuri nõudest pärast seda, kui nad on munenud 2 või 3 päeva.
- Kolme päeva pärast on koorunud enamik munapaberil olevaid mune ja mõned noorloomad võivad olla juba munapaberi all.
- Ühesuguse vanusega noorloomade saamiseks kõrvaldage munapaber koorumata munadega Petri tassist pintsettidega. Noorloomad vanusega 0–3 päeva jäävad Petri tassi ja neid söödetakse pagaripärmiga. Koorumata munad visake minema.
- Hoolitsege munade ja koorunud noorloomade eest samuti kui täiskasvanud loomade eest. Eelkõige *F. fimetaria* puhul võtke järgmised meetmed: tagage piisav varustatus värske söödaga; kõrvaldage vana hallitanud sööt; ühe nädala pärast jagage noorloomad uutesse Petri tassidesse nii, et nende tihedus oleks üle 200 isendi tassi kohta.

2.b. Toimimine hooghännalistega katse alustamisel

- 9–12 päeva vanused *F. candida* või 23–26 päeva vanused *F. fimetaria* isendid kogutakse, näiteks vaakuumiga imemise abil, ning lastakse lahti väiksesse nõusse, milles on niiske kipsi-söe substraat, ja kontrollitakse nende füüsilist seisundit binokulaarmikroskoobiga (vigastuste või kahjustustega loomad visatakse ära). Kogu selle tegevuse vältel tuleb hooghännalisi hoida niiskes atmosfääris, et vältida kuivamisstressi; näiteks tehakse kõik pinnad veega märjaks jne.
- Nõu pööratakse põhjaga ülespoole ja koputatakse sellele, et kanda hooghännalised üle pinnasele. Tuleks vältida staatilise elektri tekkimist, muidu võivad loomakesed õhku tõusta või kleepuda katsenõu seinale ja ära kuivada. Staatilise elektri neutraliseerimiseks võib kasutada ionisaatorit või märga lappi nõu all.
- Sööt tuleks jaotada üle kogu mullapinna, et see ei oleks ühe klombina.

- Nõude transportimise või katse ajal tuleks vältida nõudele koputamist või muud füüsilist häirimist, kuna selle tulemusel võib pinnas kokku vajuda ja see võib takistada hooghännaliste vahelisi toimeid.

3. Alternatiivsed hooghännalisiigid

Käesoleva katsemeetodi järgi katsete tegemiseks võib valida ka muid hooghännaliseliike, nagu *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Enne muu liigi kasutamist peab olema täidetud rida eeltingimusi:

- hooghännalised peavad olema üheselt ära määratud;
 - tuleb esitada muu liigi valimise põhjendus;
 - tuleb tagada, et katsetamisfaas hõlmab paljunemise bioloogiat, nii et see võiks olla kemikaaliga kokkupuute üks võimalikke sihtmärke;
 - nende elutsükli üksikasjad peaksid olema teada: küpseks saamise vanus, munade koorumiseks kuluv aeg ja arengujärk, milles loomad viiakse kokkupuutesse kemikaaliga;
 - katses kasutatava substraadi ja söödaga tuleks tagada nende jaoks optimaalsed kasvu ja paljunemise tingimused;
 - täpseks ja usaldusväärseks mürgisuse hindamiseks peaks variaablus olema piisavalt madal.
-

4. liide

Loomade väljavõtmine ja loendamine**1. Väljavõtmiseks võib kasutada kahte meetodit.**

- 1.a. Esimene meetod: võib kasutada MacFaydeni põhimõtete alusel töötavat kontrollitud temperatuurigradiendiga ekstraktorit (1). Väljavõtmiskasti ülaosas paikneb kütteelement, mille poolt antavat soojust reguleeritakse termistoriga, mis on pandud mullaproovi pinnale. Kogumisnõud ümbritseva jahutusvedeliku temperatuuri reguleeritakse termistoriga, mis on pandud kogumiskasti põhjale (pinnasekihi alla). Termistorid on ühendatud programmeeritava juhtimisplokiga, mis tõstab temperatuuri vastavalt programmis ettenähtud ajakavale. Loomad kogutakse jahutatud kogumiskasti (2 °C), mille põhjal on kipsi-aktiivsöe kiht. Väljavõtmist alustatakse 25 °C juures ja temperatuuri tõstetakse automaatselt iga 12 tunni jooksul 5 °C ja kokku kestab väljavõtmine 48 tundi. Pärast 12 tundi temperatuuril 40 °C on väljavõtmine lõppenud.
- 1.b. Teine meetod: Pärast eksperimentaalset inkubatsiooniperioodi hinnatakse hooghännaliste noorloomade arvu flotatsiooniga. Sel eesmärgil tehakse katse nõudes, mille maht on ligikaudu 250 ml. Katse lõpus lisatakse umbes 200 ml destilleeritud vett. Pinnast segatakse ettevaatlikult peene värvipintsliga, et lasta hooghännalistel tõusta vee pinnale. Veele võib lisada väikse koguse, umbes 0,5 ml musta Kentmere'i fotovärvainet, et lihtsustada loendamist, suurendades kontrasti vee ja valgete hooghännaliste vahel. See värvaine ei ole hooghännaliste jaoks mürgine.

2. Loendamine

Loendada võib silma järgi või valgusmikroskoobiga, kasutades ujutamisnõu pinnale pandud võret, või iga nõu pinna fotografeerimisega; fotod võib hiljem hooghännaliste loendamiseks suurendatult välja trükkida või projekteerida slaididena. Loendada võib ka digitaalsete kujutiste töötlemise meetodiga (12). Kõik meetodid peaksid olema valideeritud.

5. liide

Mulla maksimaalse veemahutavuse määramine

On leitud, et sobiv on kasutada järgmist meetodit mulla maksimaalse veemahutavuse määramiseks. Seda on kirjeldatud standardi ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction) (Mulla kvaliteet. Saasteainete mõju vihmaussidele (*Eisenia fetida*). 2. osa. Paljunemisvõimes avalduva mõju määramine) C lisas.

Võetakse teatav kindel kogus (nt 5 g) katses kasutatud pinnast, kasutades sobivat vahendit (tigupuuriga toru vms). Toru põhi kaetakse märja filterpaberiga ja pannakse siis vees olevale tugiraamile. Toru tuleks aeglaselt sukeldada vette, kuni veetase jõuab kõrgemale pinnaseproovi ülemisest osast. Seejärel tuleks see jätta vette ligikaudu kolmeks tunniks. Kuna mitte kogu mulla kapillaaridesse adsorbeerunud vesi ei jää sinna püsima, tuleks pinnaseproovil lasta nõrguda kaks tundi, hoides toru väga peeneks jahvatatud ja väga märjal kvartsliaival, mis asub kaanega nõus (et vältida kuivamist). Seejärel tuleks proov kaaluda ja kuivatada konstantse massini 105 °C juures. Veemahutavus (VM) tuleks arvutada järgmiselt:

$$VM (\% \text{ kuivmassist}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kus:

S = veega küllastunud substraat + toru mass + filterpaberi mass,

T = taara (toru mass + filterpaberi mass),

D = substraadi kuivmass.

—

6. liide

Mulla pH määramine

Järgmine meetod mulla pH määramiseks on esitatud standardis ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (Mulla kvaliteet – pH määramine).

Kindlat kogust mulda kuivatatakse toatemperatuuril vähemalt 12 tundi. Seejärel valmistatakse mulla suspensioon (mis sisaldab vähemalt 5 grammi mulda), lisades mullale selle mahuga võrreldes vähemalt viiekordse koguse 1 M analüütiliselt puhta kaaliumkloriidi (KCl) või 0,01 M analüütiliselt puhta kaltsiumkloriidi (CaCl₂) lahust. Suspensiooni loksutatakse seejärel tugevasti viis minutit ja jäetakse seejärel settima 2–24 tunniks. Seejärel mõõdetakse vedelfaasi pH pH-meetriga, mis on kalibreeritud enne iga mõõtmist sobivate puhverlahustega (nt pH 4,0 ja 7,0).

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 eluaega 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 settekihi vahel ei paku huvi ning adsorptsioon settele tuleks minimeerida, siis võib kaaluda kunstliku asendussette (nt kvartslüüsi) 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 füüsikalise-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide või settega kovalentseid sidemeid moodustavate kemikaalide puhul võib tähtis kokkupuutetee olla saastunud sööda allaneelamine. Väga lipofiilsete kemikaalide mürgisuse alahindamiseks 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), munanöörade arv emassäse kohta (ainult 1. põlvkond) ja munanöörade viljakus (ainult 1. põlvkond).
5. Tungivalt soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:
 - väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriks 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, paarituda ja muneda. Hinnatakse munetud munanööride arvu ja nende viljakust. Kõnealustest munanööridest saadakse 2. põlvkonna esimese kasvujärgu vastsed. Need vastsed pannakse värskelt 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 katsemeetodis järgmiste muudatuste 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 veekihi, poorivese ja settes peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava 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 võrdlustoksikandidid 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 munanööride 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 ⁽¹⁾) 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 cm² 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 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 polütetrafluoroeleenist).

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, tehislilikuks 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):
 - 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 (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);

⁽¹⁾ Temperatuuril 20 °C on standardse atmosfäärirõhu puhul magevee ASV 9,1 mg/l (60 % sellest on 5,46 mg/l).

- c. 75–76 % (kuivmass) kvartslüüva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm);
- d. lisatakse deioniseeritud vett, et lõplikus segus oleks niiskusesisaldus 30–50 %;
- e. sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (CaCO₃);
- f. 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 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 lahendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekloritud 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 CaCO₃-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. a. Uuritava aine kontsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahendamise 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 ≤ 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. Vees halvasti lahustuva uuritava kemikaali võib lahustada võimalikult väikeses 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 uuritav kemikaal 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, 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 katses 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 kokkupuutunud 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, Fisher'i 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, 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 väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisher'i 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 (munanöörid 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 veekihiga 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 soovitakse 48-tunnist tasakaalustumise ajavahemikku. Kui aga kemikaali lagunemise poolestusaeg settes on pikk (vt punkt 8), võib tasakaalustumisaega pikendada. Kõnealuse täiendava tasakaalustumise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava kemikaali kontsentratsioon katvas veekihis, pooriveses 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 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. yoshimatu* 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 juhuslikult 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_{50}) 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 stsenaariumi 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 kemikaalikesksentratsiooni 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 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 kerget 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 (EC₅₀) 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 afiinsus orgaaniliste süsinikuühendite suhtes või mis seovad end 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 α -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 paljunemispuuris tavaliselt ei vaja söötmist, kuid viljakus ja sigivus on tavaliselt paremad, kui täiskasvanud sääskedele pakkuda söödaallikana küllastunud saharoosilahusega 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 (± 2 °C). *C. dilutus*'e 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. 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 kokkupuude 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: kokkupuude 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 sulgjatele tundlatele ja kõhnema keha hoiakule kergesti äratuntavad.
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. yoshimatui* 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 munanöörid, mis on munetud 1. põlvkonna katsenõudesse, tuleks ükskõik 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 munanööride arvu ja nende munanööride fertiilsuse järgi. Üks kord päevas kogutakse munanöörid kristallisaatorist, mis on pandud igasse paljunduspuuri. Munanöörid tuleks koguda ja viia koos vähemalt 2,5 ml veega samast nõust 12 süvendiga mikrotiiterplaatidele (üks munanöör igasse süvendisse) või muusse sobivasse nõusse, mis kaetakse olulise aurumise vältimiseks kaanega. Iga munanööri 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 munanöör või ebanormaalne, nt mittespiraalne munanöör) ja fertiilsus (fertiilne või mitte). Kuue päeva jooksul pärast munanööri munemist hinnatakse selle fertiilsus. Munanöör on fertiilne, kui vähemalt üks kolmandik munadest koorub. Paljunduspuuri viidud emassääskede üldarvu põhjal arvutatakse munanööride arv emassääse kohta ja fertiilsete munanööride arv emassääse kohta. Vajaduse korral saab munade arvu munanööris 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 munanöörid 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 analüüsi. 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 analüüsi. Sette mõõtmised rikastatud veega katse puhul ei tarvitse olla vajalikud, kui uuritava kemikaali jaotumine vee ja sette vahel on vee-sette uuringus võrreldavates tingimustes (näiteks sette ja vee suhtarv, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) selgelt ära määratud või kui katvas veekihi 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 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 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 kristallisaatorites ning vee temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ning ühes kõrgeima kontsentratsiooniga katsenõus ja kristallisaatoris mõõta karedust ja ammoniaaki.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Käesoleva katse eesmärk on määrata uuritava kemikaali poolt kogu elutsükli jooksul avaldatav mõju paljunemisele ning kahe põlvkonna puhul ka arengukiirusele ning elusate ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede 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 veekihi (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 veekihi kemikaaliga kokkupuute alguses ja kristallisaatoris, keskmistatakse iga kontsentratsioonitaseme puhul. Rikastatud sette puhul keskmistatakse kontsentratsioonid, mis tavaliselt on mõõdetud mõlema põlvkonna katsenõudes kemikaaliga kokkupuute alguses (ja soovi korral ka kristallisaatoris), iga kontsentratsioonitaseme puhul.
44. Selleks et arvutada punkti hinnang, näiteks EC_x , võib iga katsenõu ja paljunduspuuri statistilisi näitajaid kasutada tegelike paralleelkatsetena. Iga EC_x 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 kohta arvutatud statistilisi andmeid teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x -väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist (31).
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 monotoonse hüpoteesi 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 Fisherit täpset testi või Manteli-Haensztzali 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 Fisherit 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 katsenõusse 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 arkussinus-ruutjuure-teisenduse või Tukey-Freemani teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Mantel-Haentzali testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussinus-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 arenguaja arvutamisel tuleb arvesse võtta vastsete vanust katsesse sisseviimise ajal). Arengu kiirus (ühik: 1/päev) on pöördvõrdeline 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 homogeensem 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 keskvärtusele 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:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i X_i}{n_e}$$

kus

\bar{x} – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i kontrollivahemiku indeks;

m kontrollivahemike maksimaalne arv

f_i – kontrollivahemikul i väljaarenenud sääskede arv

n_e eksperimendi lõpuks väljaarenenud sääskede koguarv (Σf_i)

x_i ajavahemikul i väljaarenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1 / \text{päev}_i - \frac{l_i}{2}$$

kus:

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 Fisheri 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 paralleelkatsetest väljaarenenud elusate isas- ja emassääskede summaarsed arvud. Neid teisendamata andmeid võrreldakse (lahusti) kontrolli või koondatud kontrolli andmetega 2×2 kooslustabelis.

Paljunemine

53. Paljunemist hinnatakse sigivuse kaudu, mida iseloomustatakse munanööride arvuga emassääse kohta. Täpsemalt, paljunduspuuris munetud munanööride 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. Munanööride fertiilsust kasutatakse selleks, et määrata viljakate munade arv ühe emassääse kohta. Paljunduspuuris munetud fertiilsete munanööride 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 füüsikalise-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);
- 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 munanööride arv paljunduspuuri ja iga päeva kohta;
- 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_x (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), Paeartctic 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 (*Hyaella 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 *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) 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., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
 - (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
 - (19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
 - (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
 - (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
 - (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
 - (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
 - (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
 - (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
 - (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
 - (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
 - (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
 - (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
 - (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
 - (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
 - (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
 - (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.
-

*1. liide***Mõisted**

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

Kemikaal – aine või segu.

Spetsiaalselt koostatud sete ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete – 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.

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 kvartslüüva 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 luksit) 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, deklooritud kraanivett ja tehisklikke kasvukeskkondi (näiteks Elandti 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 kestadid.

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 valmisseedmisel 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.

Väljaarenemine

8. Temperatuuril 20 ± 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. 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 madalam. Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 ja K_2HPO_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 makrotoitaine 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 deioniseeritud veega 1 liitrini		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
H_3BO_3 (l)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (l)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (l)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (l)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (l)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (l)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

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 katselahustes (mg/l)	
		M 4	M 7	M 4	M 7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ 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 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabel 3.

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katse- lahustes 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.

ElenDt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

ElenDt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

3. 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 ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartslüiv	Tera suurus: > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliinisisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 ($\pm 0,5$)
Kaltsiumkarbonaat	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 CaCO_3 abil vahemikku $5,5 \pm 0,5$. Suspensiooni konditseeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 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 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 konditseerida 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.

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

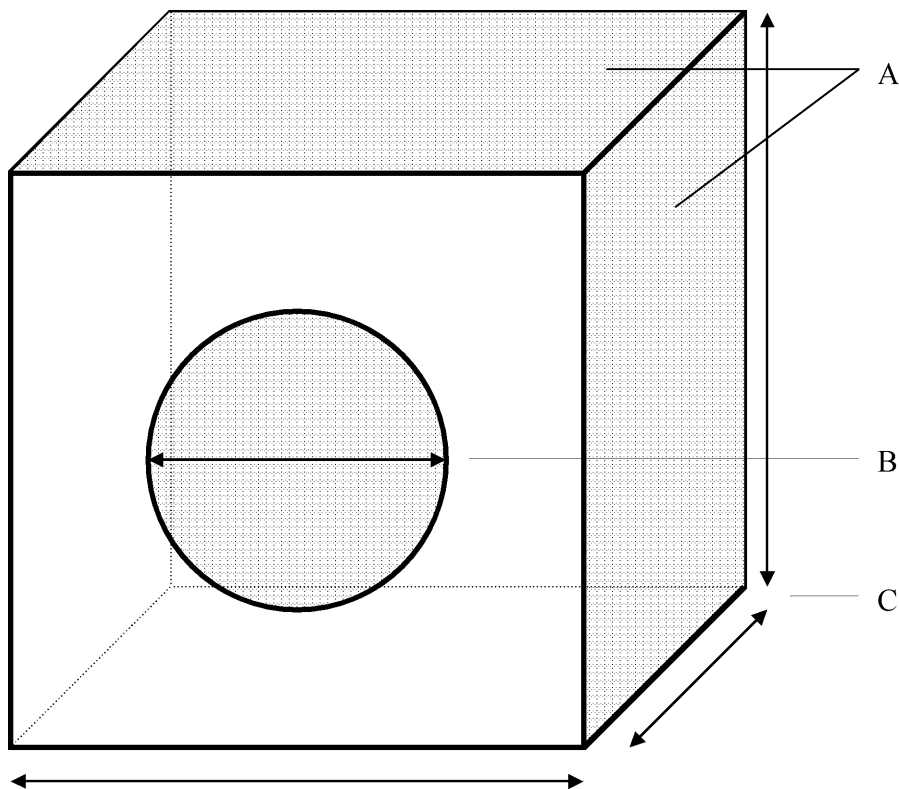
KOOSTISOSA	KONTSENTRATSIOONID
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO ₃ -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide 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).

5. liide

Juhised katse tegemiseks

Paljunduspuuri näide:

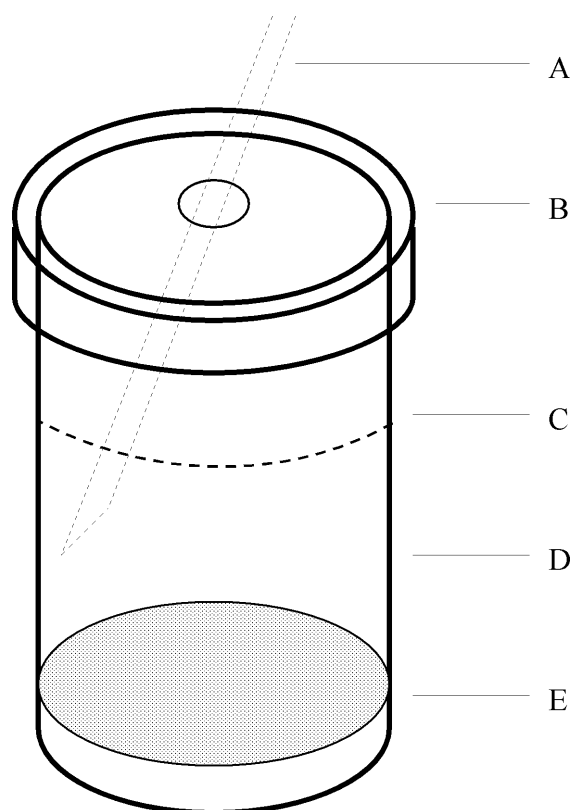


A: ažuurne riie puuri peal ja vähemalt ühel küljel (võrgusilma suurus ca 1 mm)

B: ava väljaarenenud valmikute puuri panemiseks ja munetud munanöörade väljavõtmiseks kristallisaatorist (ei ole näidatud sellel pildil).

C: paljunduspuuri mõõtmed on vähemalt $30 \times 30 \times 30$ cm (pikkus \times laius \times kõrgus).

Katsenõu näide:



A: Pasteuri pipett katva veekihi aereerimiseks

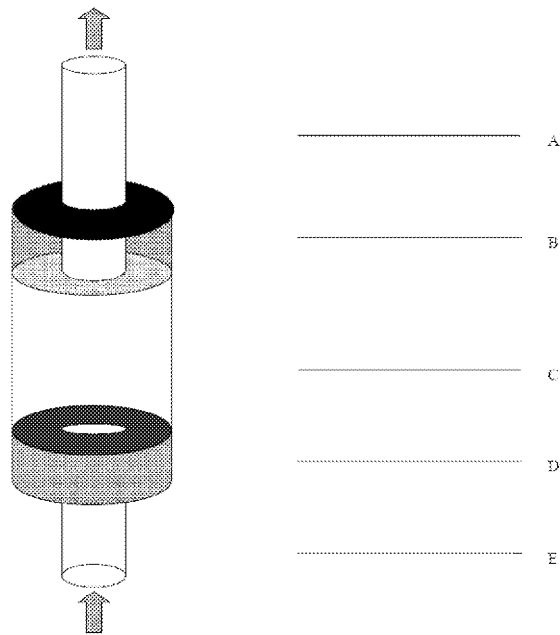
B: klaaskaas, et hoida ära väljaarenenud sääskede väljapääsemine

C: vee pinnakiht

D: katsenõu (vähemalt 600 ml keeduklaas)

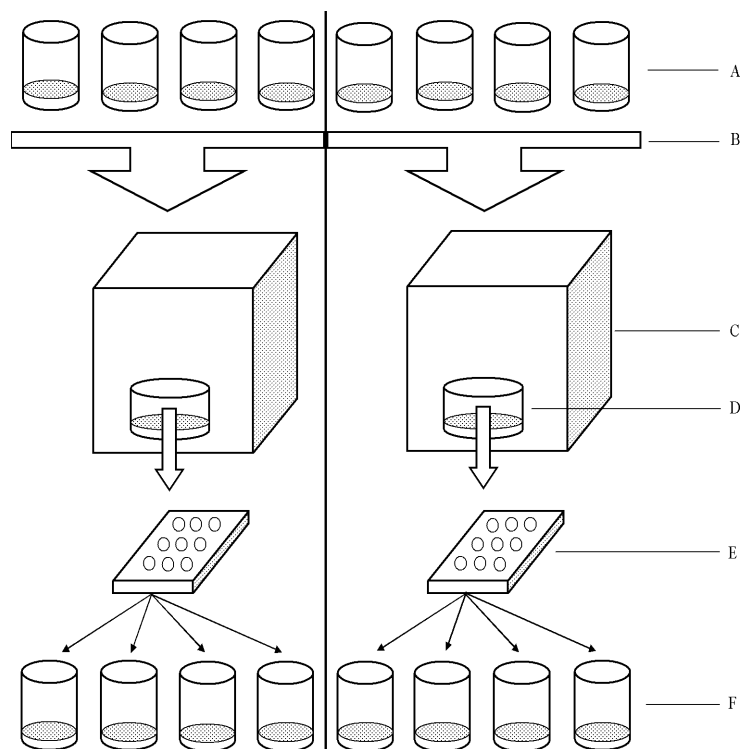
E: settekiht

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 mm²), 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.

Elutsükli 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

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*), vöötdaanio (*Danio rerio*) ja ogalik (*Gasterosteus aculeatus*) ning osaliselt valideeriti tüse tõmpnina (*Pimephales promelas*) (41, 42, 43). Käesolevas katsejuhendis on käsitletud jaapani riisikala, ogalikku ja vöötdaanio. 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 vöötdaanio puhul (muude, edaspidi valideeritavate liikide puhul võib kokkupuuteaeg olla lühem või pikem), ning lisatakse sisekretsiooni suhtes tundlikke näitajaid. Kalade sugulise arengu katsega hinnatakse oletatavate endokriinsüsteemi kahjustavate kemikaalide (nt östrogeenid, androgeenid ja steroidogeneesi inhibiitorid) mõju ja võimalikke kahjulikke tagajärgi kalade sugulise 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 ogalikku, 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 kehamaass. Meetodit võib kohandada muudele liikidele kui eespool nimetatud, tingimusel et muu liik on läbinud valideerimise, mis on võrdne jaapani riisikala, ogaliku ja vöötdaanio 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 tunnistatud rahuldavaks.

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 verrega munasarjadesse, kus see seotakse ja seda modifitseeritakse munade arengu käigus. Vitellogeniini süntees on väga piiratud (kuigi siiski avastatav) ebaküpsedes 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 β -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 vöötdaanio, ogaliku ja jaapani riisikala puhul, samuti osaliselt valideeritud tüseda tömpnina puhul; vitellogeniini immunokeemiliseks mõõtmiseks on kättesaadavad liigispetsiifilised ensüümimmuunsorptsioonanalüüsi (ELISA) meetodid (5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Jaapani riisikala ja vöötdaanio 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 vöötdaanio 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 spermatogeneesi 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 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 geneetilist 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, vitellogeniini 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 katsemeetodis 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 kalamaimud, 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 värskelt viljastatud marjaterade (enne looteketta jagunemist) panemisega katsekambritesse. Kambrite täitmist iga kalaliigi puhul on kirjeldatud punktis 27. Valideeritud kalaliikide (jaapani riisikala, ogalik ja vöötdaanio) 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 arenguetaapi 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 vöötdaanio) jaoks on esitatud 2. liites.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

14. Kättesaadavad 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_{ow} 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 ± 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):

		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 laadimishormi 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.

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 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , 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 plastikatorsid või muid materjale, mis võivad sisaldada bioloogiliselt aktiivseid kemikaale või adsorbeerida 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 veekeskonda 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 vatsed kanda ettevaatlikult üle uutesse kambritesse; teise võimalusena võib katseorganismide hoida samades katsekambrites ja uuendatakse osa katseveest (vähemalt kaks kolmandikku) iga päev.

KATSE KÄIK**Kokku puutetingimused***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 looteketta jagunemise algust või 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 vöötdaanio 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 kontsentratsioonitasemete vahel juhuvaliku 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 iga proovis oleks võimalikult ühesugune arv kalu. Kui kokkupuude kemikaaliga põhjustab suuremust, 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 jäätmete kogunemist. 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_{50} ja kokkupuuteperioodi vahelist sõltuvust. Riskide hindamiseks sobivate andmete saamiseks on soovitatav kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni.
31. Kemikaali kontsentratsioone, mis on suuremad kui 10 % täiskasvanud isendi jaoks ägeda mürgisuse LC_{50} või 10 mg/l, milline neist on madalam, ei ole vaja uurida. Suurim katses kasutatav kontsentratsioon peaks olema 10 % LC_{50} -st vastse- või noorjärgustaadiumi jaoks.

Kontrollkatsed

32. Lisaks uuritava aine kontsentratsioonidele tuleks teha üks lahjendusvee kontrollkatse (≥ 4 paralleelkatset) ja, kui see on asjakohane, lahusti kontrollkatse (≥ 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 μm) 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 ± 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 koagulatsioonist ja/või sadestumisest, mille tulemusel välimus muutub valgeks ja läbipaistmatuks;
 - vastsete ja noorkalade puhul: liikumatus ja/või hingamisliigutuste puudumine ja/või südamelöökide 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 katsekambriks 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 usaldusväärselt 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 koordineerimise 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 NaHCO₃ 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. 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 skalpellilõigetega 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 homogeenimise juhised (5. liide) ja vitellogeniini kvantitatiivse määramise juhend (6. liide).

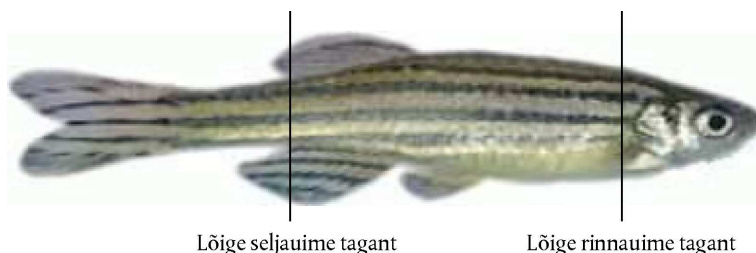
Maksa homogenaadi meetod vitellogeniini määramiseks

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 sejärel 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 võõtdaanio 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.

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. Laborisestest ja laboritevahelistest 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 ensüümimmuunsorptsioonanalüüsiga (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 arengustaadiumi 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 frontaalasandi 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 hematoksüliini ja eosiini abil, ning uuritakse valgusmikroskoobiga soo määramiseks (isane, emane, vahesugu või diferentseerumata). Vahesugu on määratletud rohkem kui ühe munaraku leidumisega niias kuue analüüsitud lõike kohta või spermatogeneesirakkude leidumisega (jah/ei) munasarjades. Munasarjade ja munandite histopatoloogia ja arengustaadiumi määramine on vabatahtlik, kuid kui seda tehakse, tuleks andmeid statistiliselt analüüsida ja need esitada. Tuleks märkida, et mõnel kalaliigil (nt jaapani riisikalal ja mõnikord võõdaaniol) 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. 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 androgeenisõltuv. Käesoleva lisa peatükis C.37 (38) on esitatud asjakohased fotod isaskalade ja androgeeniga mõjutatud emaskalade teisest 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. Mittemonotoonse 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 kontsentratsioonid 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 homogeensus. 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 olulisuse 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 nõuetekohasuse kriteeriumidele: koorumismäära 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 nõuetekohasuse 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, sooline jaotumine, geneetilise soo andmed; kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad muutused, mida on põhjustanud uuritav kemikaal.
62. Tulemused tuleks esitada kujul: keskväärtus ± 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) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors”, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone”, *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.

- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka”, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*”, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development*” 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*”, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.

- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations”, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C. R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)”, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations”, *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)”, *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) 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 sõelkatse 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.
-

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 – ensüümimmuunsorptsioonanalüüs (*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 niias 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

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 ² /s, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 luksi või 50–100 ft-c (labori üldvalgustus)	10–20 µE/m ² /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
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 %

3. liide

Kasutuskõlbliku 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

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.

5. liide

Juhend noore võõtdaanio, tüseda tõmpnina, hariliku ogaliku ja jaapani riisikala pea/saba homogeneadi 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 homogeneadi 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 homogeneenimiseni või homogeneenitakse kohe jää peal kahe plastikvarda abil. (Võib kasutada ka muid meetodeid, kui homogeneenimine toimub jää peal ja saadakse homogeneenne mass.) **Oluline märkus:** *Viaalid peavad olema korralikult nummerdatud, nii et kala pea ja saba on kokkuviidavad vastava kehatükiga, mida kasutatakse sugunäärmete histoloogia uurimiseks.*
5. Pärast ühtlase massi saavutamist lisatakse koemassiga võrreldes 4–10-kordne kogus jääkülma **homogeneenimispuhverit** (*) (märkige üles lahjendusaste). Töötage varrastega edasi, kuni segu on homogeneenne. **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 rasvakihhi alla ja tõmmatakse supernatanti sisse nii, et rasva- ja põhjas oleva sademe fraktsioon kaasa ei tuleks.
8. Viaale säilitatakse temperatuuril – 80 °C kuni kasutamiseni.

(*) *Homogeneenimispuhver:*

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: Signalt (imetajate kudede jaoks), tootenumber **P 8340**.

Märkus. Homogeneenimispuhver peaks olema valmistatud kasutamise päeval. Asetage kasutamise ajaks jääle.

6. liide

Juhend vitellogeniini mõõtmiseks vöötdaanio (*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 vöötdaanio lipovitelliini vastase IgG-ga kontsentratsioonis 5 µg/ml, sulatatakse ja pestakse kolm korda pesemispuhvriga (*).
2. Vöötdaanio puhastatud vitellogeniini standardit ⁽¹⁾ lahjendatakse seeriana kontsentratsioonideni 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ng 1 ml lahjenduspuhvri (**). Kohta ja proove lahjendatakse vähemalt 200 korda (maatriksiefekti vältimiseks) lahjenduspuhvris ja kantakse plaatidele. Kontrollkatse tehakse kahe paralleelkatsega. 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 pesemispuhvris; kasutatav lahjendus sõltub partiist ja vanusest. Igasse süvendisse pannakse 150 µl ja plaat 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 (**). Plaat varjatakse valguse eest fooliumiga ja jälgitakse värvuse ilmumist loksutil.
7. Kui standardkõver on täielikult ilmutatud, pidurdatakse ensüümi aktiivsus 150 µl 0,2 M H₂SO₄ 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

⁽¹⁾ 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.

(***) TMB plus on kasutusvalmis substraat, mida toodab KemEnTec (Taani). See on tundlik valguse suhtes. Säilitatakse temperatuuril 4 °C.

(****) PBS-põhilahust

NaCl	160,0 g
KH ₂ PO ₄	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26,6 g
KCl	4,0 g

pH viiakse 6,8 peale ja täidetakse 2 l-ni veega, mis on lastud läbi Millipore'i filtri. Säilitatakse toatemperatuuril.

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 katsekambri 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 käärdega 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 anumat 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 kassetitesse.
 - 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. Korv(id) kassetidega võetakse protsessorist välja ja sukeldatakse sisestamisseadme 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 märgistust võrreldakse looma kohta registreeritud andmetega, et lahendada võimalikud vastuolud enne sisestamist.
3. Valitakse sobiva suurusega sisestamisvorm.
4. Vormi hoitakse dosaatorkonsooli 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.

- c. Mikrotoomi lõikepaksuseks seatakse 3–5 mikronit. Kelkulükatakse 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 panemine 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. (Lõikamise 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 vähemalt 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 lõiketasapinnas, 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:

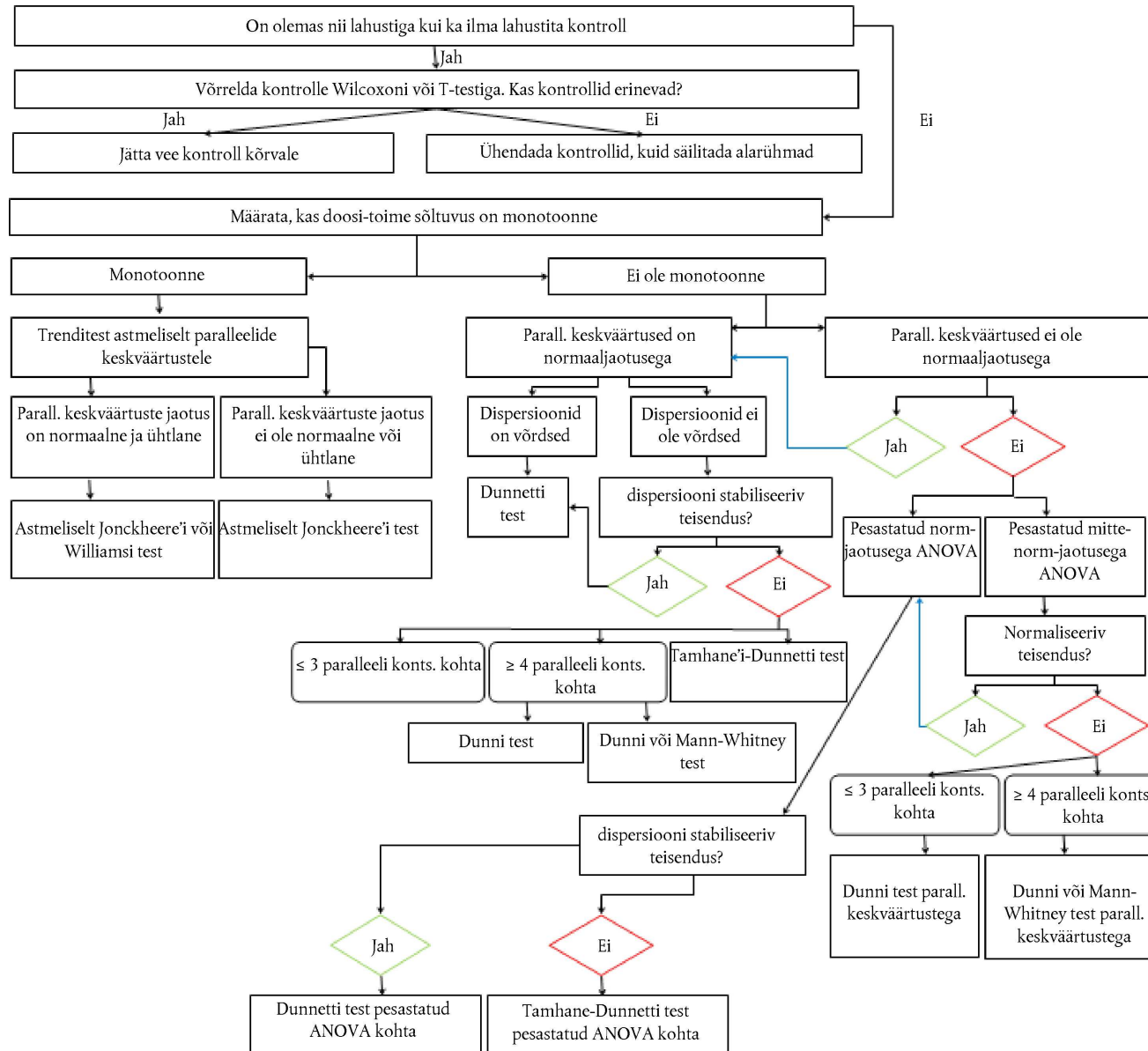
1. Värvimine
 - a. Objektiklaase kuivatatakse õhu käes enne värvimist üks öö.
 - b. Lõiked värvitakse hematoksüliini ja eosiiniga.
2. Kaanetamine
 - a. Kaaned võib peale panna käsitsi või automaadiga.
 - b. Objektiklaas kastetakse ksüleeni või TissueClear'i sisse ja liigne vedelik eemaldatakse klaasi ettevaatliku koputamiseks.
 - c. Objektiklaasi selle serva lähedale, mis on mati ääre vastasküljel, või kaanele kantakse ligikaudu 0,1 ml kinnituskeskonda.
 - d. Kaant objektiklaasi suhtes väikse nurga all hoides pannakse kaas objektiklaasi peale.

3. Märgistamine

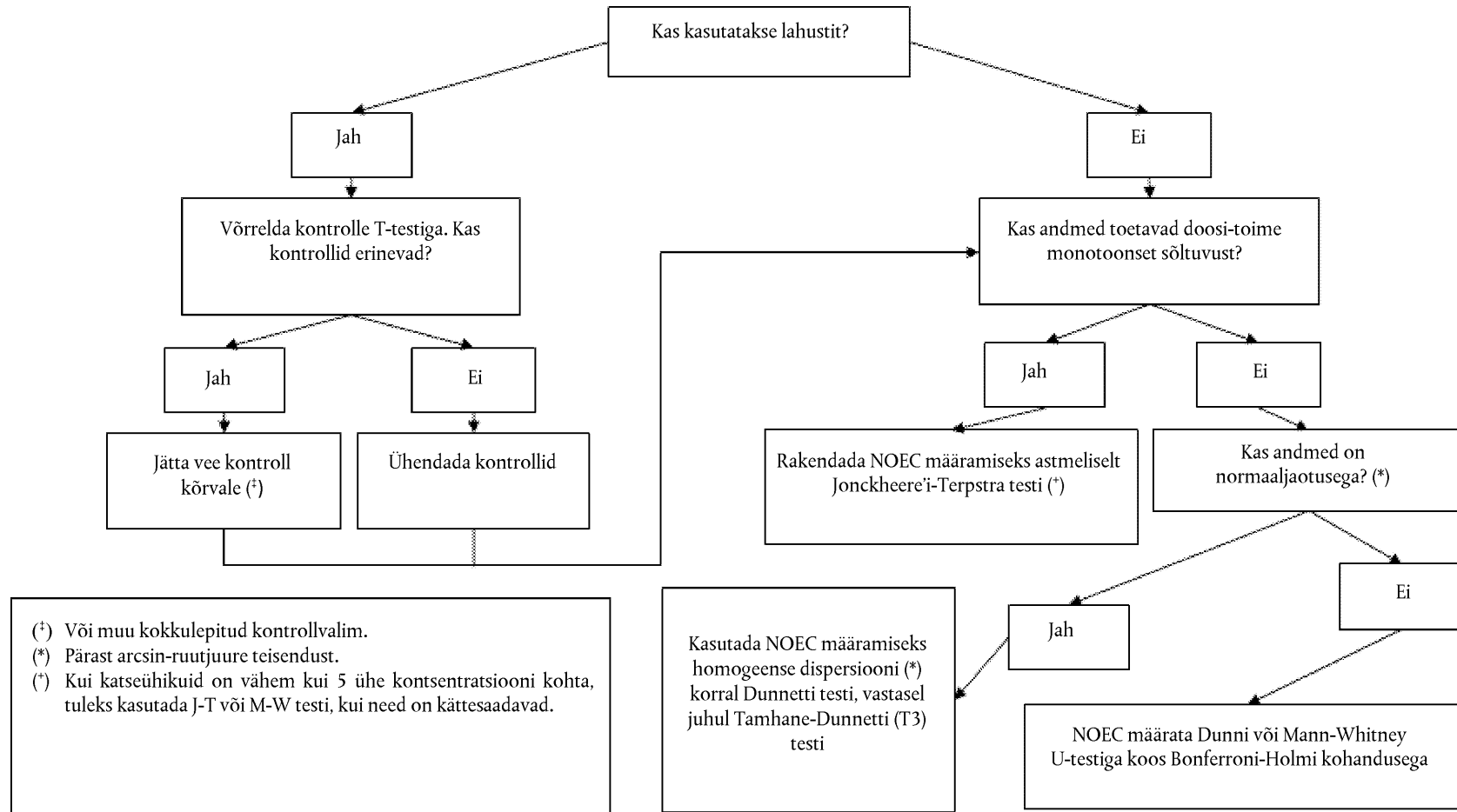
a. Igal objektiklaasil esitatakse järgmine teave:

- i. Labori nimi
 - ii. Liik
 - iii. Proovi nr / preparaadi nr
 - iv. Kemikaal / kontsentratsioonirühm
 - v. Kuupäev
-

Vitellogeniini määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustamisskeem



Soolise jaotumise määramise tulemuste statistilise analüüsi otsustuskeem



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 homogeneeritakse 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 ekstraheerimispuhvrita 1 kuival jääl ja seejärel külmpapis – 80 °C juures, et vältida DNA lagunemist. Kuid ekstraheerimine läheb paremini, kui te ekstraheerite DNA kohe samal ajal (käsitsemise vt eespool; proovid tuleks sulatada jääl pärast säilitamist – 80 °C juures, enne kui puhver viiakse torudesse).
4. Pärast homogeneerimist 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-lauroüülsarkosiini (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 tsentrifugeeritakse 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-poliümeraasi 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.

1. „Reaktsioonisegu” ettevalmistamine (25 µl ühe proovi kohta):

	Maht	Lõppkontsentratsioon
Maatriks-DNA	0,5–2 µl	
10x PCR-puhvrit MgCl ₂ -ga	2,5 µl	1 x
Nukleotiide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, igähte)	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 MgCl₂-ga: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 25 °C juures), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20

Iga PCR-reaktsiooni jaoks (vt allpool 3–5) on vaja spetsiaalset praimerit, 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. H₂O).

2. Agarosgeeli (1 %) valmistamine – PCR-programmi toimumise ajal:

- Lahustage 3 g agarosiooni 300 ml-s 1 × TAE-puhvril (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-puhvril 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

Tsüklid (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

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

Tsüklid (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

Tsüklid (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

8. *Vöötide määramine:*

- Agaroosgeel puhastatakse destilleeritud vees
 - Seejärel kantakse agaroosgeel etiidiumbromiidi sisse 15–30 minutiks
 - Seejärel pildistatakse agaroosgeeli UV-valguse all
 - Lõpuks analüüsitakse proove ja võrreldakse neid positiivse kontrolli vöödi (või vöötidega) ja redeliga
-

10. liide

Juhend koeproovide võtmiseks, et määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR-) meetodil ogaliku geneetiline 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 Qlamp'i teadlase bioroboti komplekti. DNA-d elueeritakse 50 µl veega, milles ei tohi olla DNAase ega RNAase. Kui DNA eraldamiseks kasutatakse kõvu kudesid (nt lülisammast või rinnauime), võib olla vajalik proovi homogeenimine lüüsipuhvris, kasutades FastPrep® koelagundajat või muud samaväärset kudede purustamise süsteemi.

Teised võimalused

- a) Kude lagundatakse öö läbi proteinaas K-ga 400 µl-s lüüsipuhvris 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 mikrotsentrifuugitopsis ja tsentrifuugitakse siis kiirusega 13 000 p/min 5 minutit, et eemaldada kõik tahked osakesed. Lüüsitud proov viiakse seejärel üle uude 1,5 ml mikrotsentrifuugitopsi, milles on 500 µl 100 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooli ja seejärel tsentrifuugitakse kiirusega 13 000 p/min 10 minutit, et sadestada DNA. Etanool eemaldatakse ja asendatakse 400 µl 70 % molekulaarbioloogias vajaliku puhtusastmega etanooliga, tsentrifuugitakse 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 lüüsipuhvris, 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 praimereid (nagu on kirjeldatud Peichel *et al.*, 2004. *Current Biology* 1:1416-1424):

Päripidine praimer 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Äraspidine praimer 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

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 ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotiidid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM igaihte)	250 µM igaihte
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. Agarosgeeli (2 %) ettevalmistamine:

Tavaliselt lahutatakse PCR-reaktsiooni saadusi 20 % agarosgeeliga, mis sisaldab etiidiumbromiidi.

Samuti võib kasutada kapillaaridel põhinevat elektroforeesisüsteemi.

- Kaaluge 2 g agarosi 100 ml-sse 1 × TAE-puhvrise
- Kuumutage mikrolaineahjus (ligikaudu 2–3 min), et agaros lahustuks.
- Lisage 2 tilka etiidiumbromiidi lõpliku kontsentratsiooni 0,5 µg/ml saamiseks
- Kandke kuum lahus üle geelivalamisseadmesse.
- Laske geelil tarduda

3. Geel-elektroforees:

- Viige agarosgeel 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.

4. Amplifikatsioonisaaduste nähtavastegemine

Kui kasutatakse etiidiumbromiidilisandiga agarosgeeli, nagu on kirjeldatud eespool, on DNA-saadused nähtavad UV-lambi all. Teise võimalusena võib agarosgeeli värvida: geel kaetakse etiidiumbromiidi lahja lahusega (0,5 µg/ml vees) 30 minutiks enne tulemuste vaatlemist.

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 külgioonel. 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** (*).
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.

(*) Hanki puhverdatud soolalahus (HBSS):

HBSS on vajalik seemnevedeliku säilitamiseks, kui seda valmistatakse ette viljastamiseks.

Oluline märkus: kuigi 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 ₂ HPO ₄ (veevaba)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DV	100 ml

Põhilahus 3

CaCl ₂	0,72 g
DV	50 ml

Põhilahus 4

MgSO₄ · 7H₂O 1,23 g

DV 50 ml

Põhilahus 5 (värskelt valmistatud)

NaHCO₃ 0,35 g

DV 10 ml

Märkus: Kui teil on mõni eespool nimetatud sooladest juba olemas, kuid erineva veesisaldusega (nt 2H₂O 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 värskete 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 koetatavate 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.

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.

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 sõelkatse 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 ultrafiltritid ja tsentrifuugitud 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 suhtelisel 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.
7. Juhul kui on vaja täpsemalt teada biolagunduvuse kiirust või määra merevees kusagil konkreetses 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 ^{14}C kadumist ja $^{14}\text{CO}_2$ 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
LOKSUTATAV KOLB	<ul style="list-style-type: none"> — lihtne aparatuur, välja arvatud C analüsaator — kestus 60 päeva ei ole probleem — nitrifikatsioon ei sega uuringut — võib kasutada lenduvate ainete puhul 	<ul style="list-style-type: none"> — on vaja C analüsaatorit — kasutatakse kontsentratsioone 5–40 mg lah. org. C /l, mis võib olla inhibeeriva toimega — lah. org. süsiniku määramine madalatel kontsentratsioonidel merevees on keeruline (kloriidi mõju) — lah. org. süsiniku kontsentratsioon on merevees mõnikord suur
KINNINE PUDEL	<ul style="list-style-type: none"> — lihtsad seadmed — lihtne määramine lõpus — kasutatakse madalat uuritava aine kontsentratsiooni (2 mg/l), seega on vähem inhibeerimise võimalusi — kerge on kasutada ka lenduvate ainete puhul 	<ul style="list-style-type: none"> — pudelite hermeetilisuse säilitamine võib olla keeruline — bakterite kasv nõu seintel võib põhjustada valesid tulemusi — kontrollkatses võib O₂ sidumine muutuda intensiivseks eriti pärast 28 päeva; sellest võib üle saada merevee vanandamisega — segada võib nitrifikatsiooniga seotud O₂ sidumine

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 tulemustest teha järeldust kiire biolagunduvuse kohta; meetodiga saadakse konkreetset teavet biolagunduvuse kohta merekeskkonnas.

MEETODI PÕHIMÕTE

3. 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 loksutamisega pimedas või hajutatud valguses aeroobsetes tingimustes kindlal temperatuuril (mida hoitakse täpsusega ± 2 °C), mis on tavaliselt vahemikus 15–20 °C. Kui katse eesmärk on modelleerida keskkonnaolukordi, võib katse teha väljaspool seda normaalset temperatuurivahemikku. Katse soovitav suurim kestus on 60 päeva. Lagunemist jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmisega (täielik lagunemine) ja mõnel juhul spetsiifilise analüüsiga (primaarne lagunemine).

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

4. 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 suhteliste koguste kohta on vajalik tulemuste tõlgendamiseks, eriti kui tulemus on biolagunduvuse kriteeriumi piiri lähedal.

5. 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

6. 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.
7. Euroopa Ühenduse võrdluskatses, kus merevee proovid olid võetud eri kohtadest ja eri aastaegadel (3), olid naatriumbensoadi 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.

ANALÜÜSIMETODI KORRATAVUS JA TUNDLIKKUS

8. 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 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 (± 2) °C;
 - b. kitsa kaelaga 0,5–2 liitrised Erlenmeyeri kolvid;
 - c. membraanfiltrimisseade või tsentrifuug;
 - d. membraanfiltrid 0,2–0,45 μm ;
 - 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 rannikulähedaste vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammooniumi 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 biolagundatava orgaanilise materjali sisaldus. Laboritevahelises võrdluskatses (3) ei leitud vanandatud ja värskelt võetud mereveeproovide biolagundamise võimes mingeid erinevusi. Enne kasutamist töödeldakse merevett suuremate osakeste eemaldamiseks näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri või jämeda paberfiltri (mitte kasutada membraan- või klaasmikrokiud- (GF/C-)filtrit) või settimise ja dekanteerimisega. Kasutatud menetlust tuleb kirjeldada. Kui kasutatakse eeltöötlemist, tuleb see teha pärast vanandamist.

Mineraaltoitainete põhilahused

13. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | kaaliumdivesinikortofosfaat, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | dikaaliumvesinikortofosfaat, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| | ammooniumkloriid, NH_4Cl | 0,50 g |
| | lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini. | |
| b) | kaltsiumkloriid, 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 etüleendiamiintetraäädikhappe (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 inokulumi. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamiseiga mereveeagari plaadil. See on eriti soovitatav proovide puhul, mis on võetud rannikuveest või saastatud merealalt. Heterotroofsete mikroobide aktiivsust kontrollitakse nii, et katse tehakse võrdlusainega.

Kolbide ettevalmistamine

16. Kõik klaasnõud peavad olema hoolikalt puhastatud (kuigi mitte tingimata steriilsed) näiteks soolhappe alkoholi-lahusega, 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 kavasse ka inhibeerimiskatse kahe paralleeliga. Ühte ja samasse nõusse lisatakse uuritavat ainet ja võrdlusainet, kusjuures võrdlemise võimaldamiseks on võrdlusaine kontsentratsioon tavaliselt sama kui kontrollkatses (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 kattedega (näiteks alumiiniumfooliumiga), mis võimaldab gaasivahetust kolvis oleva ja ümbritseva õhu vahel. (Puuvilvatist 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.

Füüsikalise-keemilised kontrollkatsed (soovi korral)

20. Kui kahtlustatakse abiootilist lagunemist või kadu, nt hüdrolyüüsi (mis tekitab raskusi üksnes konkreetse aine määramise puhul), lendumist või adsorptsiooni, on soovitatav teha füüsikalise-keemiline kontrollkatse. Seda võib teha elavhõbe(II)kloriidi (HgCl_2)⁽¹⁾ (50–100 mg/l) lisamisega uuritava aine lahusesse, et peatada mikroobide tegevus. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku või konkreetse aine kontsentratsioon füüsikalise-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).

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.

⁽¹⁾ Elavhõbe(II)kloriid (HgCl_2) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalikke ohutuseeskirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta kanalisatsioonisteedi.

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 tsentrifugeerimine). 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 tsentrifugeeritakse. Vajaduse korral säilitatakse filtritud või tsentrifugeeritud 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 vabaneda 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 tsentrifugeerida. Proovi tsentrifugeeritakse kiirendusega 40 000 m·s⁻² (umbes 4 000 g) 15 minutit, eelistatavalt jahutusega tsentrifugeeris.

Märkus: Orgaanilise süsiniku üldsisalduse (TOC) ja lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) lahutamine tsentrifugeerimisega 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 tsentrifugeerimise 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 analüüsides 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.
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_i) 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 füüsikalised-keemilised omadused;
- identifitseerimisandmed.

Katsetingimused:

- proovivõtu koht ja selle kirjeldus; merevee saastatus (kolooniite 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 eeltöötuseks (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_i), 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.

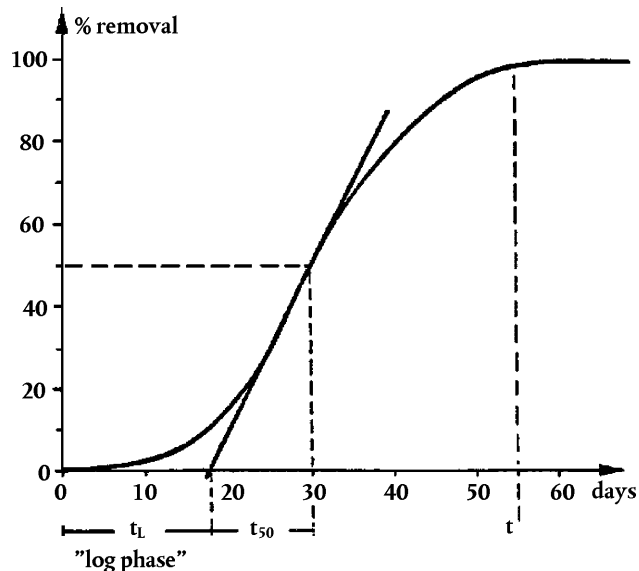
Tulemuste arutelu.

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 katset korrata muu mereveeprooviga. Kuigi inhibeermiskatsete 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 kindlakstegemiseks 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.



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 (± 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 katsemeetodit saab kasutada teatava konkreetse aine puhul, peavad aine mõned omadused olema teada. Empiiriline valem on vajalik teoreetilise hapnikutarbe (THT) arvutamiseks (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.
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 võrdluskatses, 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 pudeleid;
 - b) mitu 2-, 3- ja 4-liitrist pudelit liitrimärkidega katse ettevalmistamiseks ja BHT-pudelite täitmiseks;
 - c) vesivann või püsiva temperatuuriga ruum pudelite hoidmiseks ühtlasel temperatuuril (± 1 °C) pimedas;
 - d) seadmed lahustunud hapniku määramiseks;
 - e) membraanfiltrid 0,2–0,45 μm (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 katses kasutatavast temperatuurist.
13. Registreeritakse täpne proovivõtu koht ja kirjeldatakse merevee saasteainete ja toitainete sisaldust kõnealus kohas. Eriti rannikulähedaste või saastatud vete puhul esitatakse selles kirjelduses ka heterotroofsete mikroorganismide kolooniate arv, samuti lahustunud nitraadi, ammooniumi 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 tühikitse 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 värskelt 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 settimise ja dekanteerimisega. Katseprotokollis kirjeldatakse kasutatud meetodit. Eeltöötlemine tehakse pärast vanandamist, kui seda kasutatakse.

Mineraaltoitainete põhilahused

18. Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

a) kaaliumdivesinikortofosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
dikaaliumvesinikortofosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
dinaatriumvesinikortofosfaatdihüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
ammooniumkloriid, NH_4Cl	0,50 g
lahustatakse destilleeritud vees ja täiendatakse 1 liitrini.	
b) kaltsiumkloriid, 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 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 inokulumi. Mereveest saadud katsekeskkonnas (ja soovitatavalt ka esialgses merevee proovis) määratakse (soovi korral) kolooniat moodustavate heterotroofsete bakterite arv, näiteks kolooniate loendamisega 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). Hapnikuaanalüüside puhul on nelja määramise jaoks vaja kokku $3 \times 2 \times 4 = 24$ pudelit (tühikatsed, 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:
- hapniku lahustuvus merevees katse põhilise temperatuuri ja soolsuse juures (vt lisatud nomogramm, 4. liide);
 - mereveega tehtava tühikatse BHT; ning
 - uuritava aine eeldatav biolagundatavus.
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 (tühikatse hapnikutarve) võib olla 2 mg O₂/l või suurem, kui merevett ei ole vanandatud. Selleks et tagada märkimisväärne hapnikusisaldus 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 tühikatsed; 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 analüüsivõimaluste võimalust, võib teha füüsikalise-keemilise katse, et kontrollida uuritava aine võimalikku kõrvaldamist mõne abiootilise mehhanismi kaudu, näiteks hüdrolyüüsi või adsorptsiooniga. Füüsikalise-keemilise kontrollkatse võib teha elavhõbe(II)kloriidi (HgCl_2)⁽¹⁾ 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_2 (mangaan(II)kloriidi) ja NaOH (naatriumhüdroksiidi) abil sadestamisega.
31. Ülejäänud BHT-pudelite paralleelne inkubeeritakse katse temperatuuril (15–20 °C) pimedas ja võetakse need inkubeerimiskambri 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 membraanfiltriga (0,2–0,45 µm) või tsentrifuugitakse 15 minutit. 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).

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).

⁽¹⁾ Elavhõbe(II)kloriid (HgCl_2) on väga mürgine aine, mille käsitsemisel tuleb järgida vajalikke ohutuseeskirju. Kõnealuse kemikaali vesilahused tuleks kõrvaldada ettenähtud korras; neid ei tohi lasta otse kanalisatsioonüsteemi.

35. Bioloogiline hapnikutarve (BHT) arvutatakse tühikatses 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:

$$\text{biolagunemise \%} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg uuritavat ainet}}{\text{mg THT}/\text{mg uuritavat ainet}} \times 100$$

$$\text{biolagunemise \%} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg uuritavat ainet}}{\text{mg KHT}/\text{mg uuritavat ainet}} \times 100$$

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_1) 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 tühikatsesid arvestavate parandite tegemist).

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;
- disperseerimismeetod, 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:

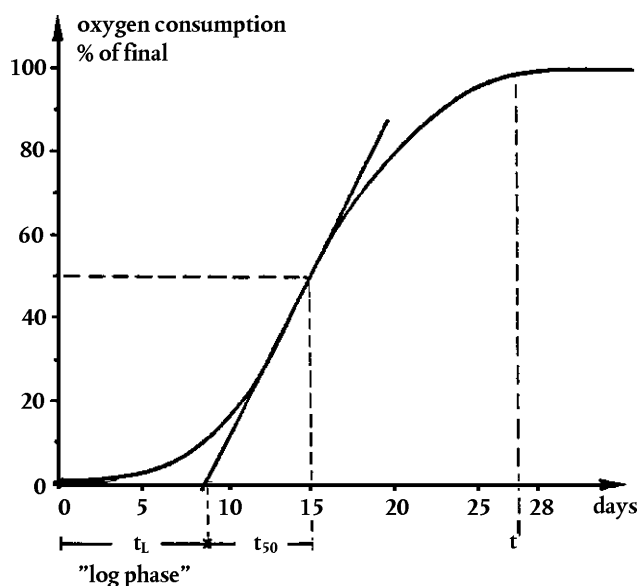
- analüüsiandmed esitatuna andmelehel (vt 5. liide);
- lagunemise käik graafikuna diagrammil, mis näitab ootefaasi (t_L), tõusu ja aega (alates ootefaasi lõpust), mis kulub uuritava aine oksüdeerumiseks kulutatud lõplikust hapnikutarbest 50 % saavutamiseks (t_{50}). Ootefaasi pikkuse võib hinnata graafiliselt, 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. Tühikats 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.
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.
-

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:

- määrgoksüdatsioon persulfaadi/UV-kiirgusega;
- määrgoksüdatsioon persulfaadi/kõrge temperatuuriga (116–130 °C);
- põletamine.

Tekkiva CO₂ kogus mõõdetakse neeldumise järgi infrapunaspektris või titrimetriliselt. Teine võimalus on taandada CO₂ metaaniks, mille kogus mõõdetakse leekionisatsioonidetektoriga.

Persulfaadi/UV-meetodit kasutatakse tavaliselt puhtama vee analüüsimiseks, milles on vähe tahkeid osakesi. Viimaseid kahte meetodit võib kasutada enamiku veeproovituüpide 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. CO₂ 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 CO₂ mõõtmisega mittelahutava infrapunaspektrometria abil.

Oksüdeerimisreagenti muudetakse vastavalt ettepanekutele (2), mida on kirjeldatud tootja käsiraamatus:

- a) 8,2 g HgCl₂ ja 9,6 g Hg(NO₃)₂·H₂O lahustatakse mitmesajas milliliitris madala süsinikusisaldusega analüütilise puhtusastmega vees;
- b) elavhõbedasoola lahuses lahustatakse 20 g K₂S₂O₈;
- c) segule lisatakse 5 ml kontsentreeritud HNO₃;
- 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 proovitüübi 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.

—

2. liide

Biologundatavus merevees

LOKSUTATAVA KOLVI MEETOD

ANDMELEHT

1 **LABOR:**2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV:**3. **UURITAV AINE:**

Nimetus:

Põhilahuse kontsentratsioon: mg/l ainenä

Algkontsentratsioon keskkonnas, t₀: mg/l ainenä

: 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

Eeltötlus 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)}					
Tühikatse: lisatud toitainetega merevesi ilma uuritava aineta	1	c ₁					
		c ₂					
		keskmine, C _{d(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		keskmine, C _{b(t)}					
	keskmine C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE:

Kolb nr	Tulemuste arvutamine	Lagunemisprotsent n päeva pärast				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D₁ ja D₂ 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. **ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)**

	Aeg (päevad)	
	0	t
Lahust. org. süsiniku konts. steriilses kontrollkatses (mg/l)	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiootilise lagunemise \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

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:

$$THT_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Selles arvutuses on eeldatud, et C mineraliseritakse CO_2 -ks, H – H_2O -ks, P – P_2O_5 -ks ja Na – Na_2O -ks. Halogeen kõrvaldatakse vesinikhaliidina ja lämmastik ammoniaagina.

Näide:

Glükoos $C_6H_{12}O_6$, 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 hüdroliüsunud.

Väävli puhul eeldatakse oksüdeerumist kuni oksüdatsiooniastmeni + 6.

Näide:

Naatrium-*n*-dodetsüülbenseensulfonaat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, 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.

$$THT_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

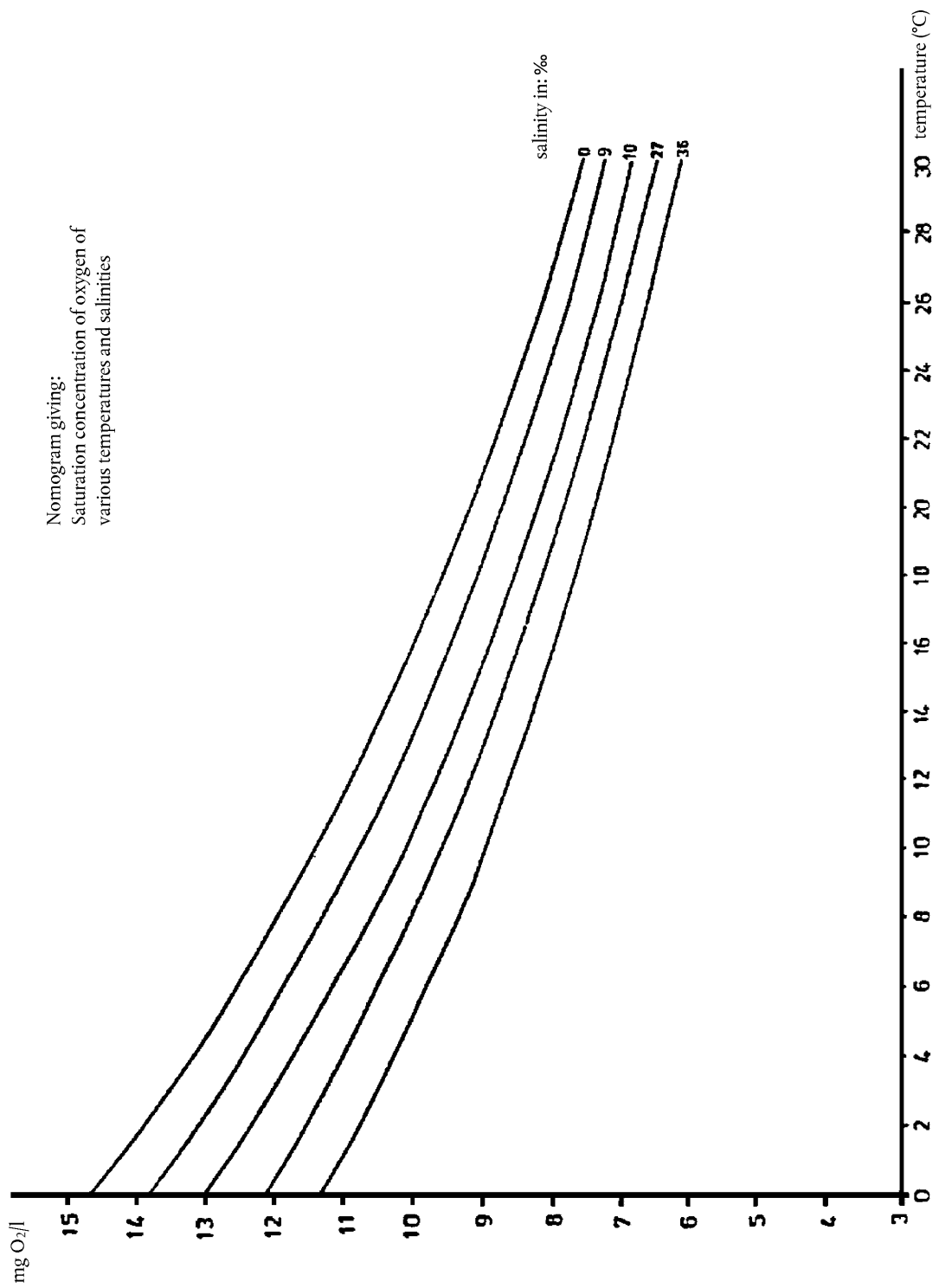
$$THT_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Oletame sekundaarse amiini puhul täielikku muundumist nitraadiks:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$THT_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg ainet}$$

4. liide



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 O₂ uuritava aine mg kohta4. **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

O₂ kontsentratsioon pärast aereerimist ja seismist enne katse algust: mg O₂/l6. **LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE:**

Meetod: Winkler/elektrood

	Kolb nr		mg O ₂ /l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Katse: uuritavat ainet sisaldav toitainevee merevesi	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Katsete keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Kolb nr		mg O ₂ /l pärast n päeva			
			0	5	15	28
Tühikatsed: ilma uuritava aineta tootainetega merevesi	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Tühikatsete keskmine	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Märkus: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollkatsete jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

7. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMISPROTSENT (%D)

	Lagunemisprotsent n päeva pärast		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (l)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) (l)}{\text{uuritav aine (mg /l)} \times THT} \times 100$			

(l) Sellega eeldatakse, et $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, kus

$m_{b(0)}$ = tühikatsede väärtus päeval 0,

$m_{t(0)}$ = uuritava aine väärtus päeval 0.

Kui $m_{b(0)}$ ei ole võrdne $m_{t(0)}$ -ga, siis kasutatakse $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, kus

$m_{b(x)}$ = tühikatsede väärtus päeval x,

$m_{t(x)}$ = uuritava aine väärtus päeval x.

**C.43. ORGAANILISTE AINETE ANAEROOBNE BIOLAGUNEVUS LÄBIKÄÄRINUD MUDAS: MÕOTMINE
GAASI ERALDUMISE JÄRGI**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 311 (2006). Orgaaniliste ainete biolagunemise hindamiseks aeroobsetes tingimustes on mitmeid söelkatsemeetodeid (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 seeditatavate reovette. Kuid suurem osa sellistest ainetest on seotud reovee esmase settinud mudaga, mis eraldatakse töötlemata reoveest settimistankides enne, kui seeditatav reovett ehk supernatanti hakatakse töötlemata aeroobsetes tingimustes. Muda, mis osakestevahelises vedelikus sisaldab mõnevõrra ka lahustuvaid aineid, suunatakse seejärel kuumutatavatesse kääritamistankidesse anaeroobsele töötlemisele. Seni ei ole veel meetodeid anaeroobse biolagunemise hindamiseks anaeroobse kääritamise nõudes ja käesoleva katse eesmärk on täita see lünk; see meetod ei tarvitse olla kasutatav muudes hapnikuvabades keskkonnaosades.
2. Anaeroobse biolagunemise hindamiseks on edukalt kasutatud respiromeetrilisi meetodeid, millega mõõdetakse vabanevate gaaside, peamiselt metaani (CH_4) ja süsinikdioksiidi (CO_2) 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 meetodid (4), mida hiljem arendasid edasi teised (8) ja mis on saanud Ameerika Ühendriikides standardmeetodiks (9, 10), ei lahendatud raskusi, mis on seotud CO_2 ja CH_4 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 söelkatsemeetodit, millega hinnatakse orgaaniliste ainete potentsiaalset anaeroobset biolagunemist konkreetsetes tingimustes (st anaeroobses sette kääritamistankis teatava aja jooksul ja mikroorganismide teatava kontsentratsiooni juures). Kuna kasutatakse lahjendatud reoveeset, 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 biolagunemist muudes erinevates keskkonningimustes. 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, modelleerimis- katsetes 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 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 analüüsimeetodeid, saab aine kadumist siiski jälgida (vt punktid 6, 30, 44 ja 53).

KATSE PÕHIMÕTE

4. Pestud läbikäärinud muda (¹⁾, 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 ± 2 °C juures

(¹) Läbikäärinud 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 metanogeensetest bakteritest, kes toodavad süsinikdioksiidi ja metaani (11).

suletud anumad uuritava aine kontsentratsiooni 20–100 mg C/l juures kuni 60 päeva. Nähakse ette muda aktiivsuse mõõtmine, milleks tehakse paralleelselt tühikatses keskkonnas, millesse on viidud muda inokulum, kuid mis ei sisalda uuritavat ainet.

5. Mõõdetakse rõhu suurenemist anuma vabaruumis, mille põhjuseks on CO₂ ja metaani tekkimine. Suur osa tekkinud CO₂-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 tühikatses vastavad näitajad. Biolagunemise määr arvutatakse tekkinud anorgaanilise süsiniku ja metaanis oleva süsiniku protsendina uuritavas aines olnud süsiniku mõõdetud või arvutatud 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 adsorptsiooniomadusi. Uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) peab olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava aine puhul aitab mõõdetud või arvutatud 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. Soovitav on moodustada katses kontrollrühm ka pärssimise kontrollimiseks, välja arvatud juhul kui on teada, et uuritav aine ei pärsi anaeroobsete mikroobide tegevust (vt punkt 21 ja ISO 13641-1 (12)).

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 (nõuetekohasest andmetest) (%)	Suhteline standardhälve (nõuetekohasest andmetest) (%)	Andmeid lagunemisprotsendiga > 60 % nõuetekohastes katsetes n_3
Palmitiinhape	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polüetüleen-glükool 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:

- sädemekindel inkubaator, mis hoiab temperatuuri 35 ± 2 °C;
- sobiva nominaalmahuga ⁽¹⁾ 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, soovatakse kasutada klaasist seerumipudeleid nominaalmahuga 125 ml ja üldmahuga ligikaudu 160 ml, mis on suletud seerumimembraaniga ⁽²⁾ ja sellele valtsitud alumiiniumrõngaga;
- rõhumõõtmisseade, ⁽³⁾ 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;

⁽¹⁾ Soovitatav suurus on 0,1–1 liiter.⁽²⁾ Soovatakse kasutada gaasikindlaid silikoonmembraane. Lisaks soovatakse 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.⁽³⁾ 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 1×10^5 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), soovatakse kasu selle mõõtmisvahemik korrapäraste ajavahemike järel kalibreerida.

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 otseks 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.

Vesi

15. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis on vabastatud hapnikust läbipuhumisega, milleks kasutatakse gaasilist lämmastikku hapnikusaldusega 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, KH_2PO_4	0,27 g
dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,12 g
ammooniumkloriid, NH_4Cl	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
resauriin (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 liitrini

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)tsitrat on väga tõhus ja vähemürge

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 leelisega $7 \pm 0,2$ 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 värskelt 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.

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, H_3BO_3	5 mg
tsinkkloriid, ZnCl_2	5 mg
vask(II)kloriid, 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, Na_2SeO_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 süsiniketrakloriid, 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)).

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 käsitlemisel 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 ± 2 °C kuni 7 päeva. On leitud, et umbes 5-päevane eelkääritamine annab tühikatsest 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 katsesuspensioonis. Muda tsentrifuugitakse suletud topsides (nt 3 000 g 5 minuti jooksul) ja supernatant visatakse ära. Sade tsentrifuugitopi põhjas suspendeeritakse hapnikuvabas keskkonnas (punktid 16 ja 17), suspensioon tsentrifuugitakse 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 suspendeeritakse tsentrifuugimisel 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).

KATSE KÄIK

26. Järgmiste ettevalmistavate tööde puhul tuleb läbikääritatud muda ja hapniku kokkupuude viia praktiliselt võimaliku miinimumini, näiteks on võib-olla vajalik töötada kindakapis lämmastiku atmosfääris ja/või puhuda pudelist 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 mineraalhapat 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).

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 ± 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 ± 2 °C, et toimuks tasakaalustumine ja liigne gaas eralduks atmosfääri; selleks loksutage järjekorras iga nõu, torgake rõhumõõtmisseadme (punkt 13-c) nõel läbi membraani ja avage kraan, kuni manomeeter näitab 0-rõhku. Kui selles staadiumis või vahepealsete mõõtmiste tegemisel on rõhk vabaruumis atmosfäärirõhust madalam, tuleks lisada gaasilist lämmastikku, et rõhk oleks võrdne atmosfäärirõhuga. 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 resauriin (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 paralleelkatses 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. Mõõtke gaasi rõhk näiteks nii, et surute rõhumõõtmiseseadmega 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. Soovitatav on gaasi rõhku mõõta vahepeal, kuna rõhu suurenemine võimaldab hinnata, millal võib katse lõpetada ja nii saab jälgida ka biolagunemise kineetikat (vt punkt 6).
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 tsentrifuugida ega filtrida, kuna sellele kaasneks lubamatu lahustunud süsinikdioksiidi kadu. Kui vedelikku ei saa analüüsida kohe proovi võtmise ajal, võite säilitada proovi ilma vabaruumita suletud vialis 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 kontsentreeritud mineraalhappe (nt H₂SO₄) 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_h);
- võrranditesse (vt punkt 44) viiakse vajaduse korral sisse parandid, millega arvestatakse V_h suurenemist võrrandis 3.

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_p , muutuvad ning seda tuleb võtta arvesse gaasi tekkimise tulemuste arvutamisel. 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. Praktistel 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 olulistes kogustes tekib muid gaase peale metaani või süsinikdioksiidi (nt N_2O), 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 (m^3);

R = universaalne gaasikonstant [$8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$]

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);

Δp = esialgse ja lõpliku gaasirõhu vahe keskmine, millest on lahutatud vastav tühikatsenõude keskmine (millibaarides);

V_h = vabaruumi maht nõus (l);

0,1 = tegur, millega teisendatakse njuuton/ m^2 millibaarideks ja m^3 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 CH₄ ja 1 mool CO₂ sisaldab kumbki 12 g süsinikku, on süsiniku mass (mg) vabaruumis (m_h) leitav võrrandiga 5:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Võrrand 5}$$

Tühikatsse 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);

ΔV = uuritava ainega katsenõude ja tühikatsenõude vabaruumis oleva gaasi ruumala erinevuste keskvärtus;

25 286 = 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 tildsüsiniku (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:

$$m_i = C_{net} \times V_i \quad \text{Võrrand 7}$$

kus:

m_i = anorgaanilise süsiniku mass (mg) vedelfaasis;

C_{net} = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon (mg/l) katseanumates, millest on lahutatud kontsentratsioon kontrollnõudes katse lõpul;

V_i = vedeliku maht nõus (l);

Gaasistatud süsiniku kogusisaldus

47. Gaasistatud süsiniku kogumass katsenõus arvutatakse võrrandi 8 järgi:

$$m_t = m_h + m_i \quad \text{Võrrand 8}$$

kus:

m_t = gaasistatud süsiniku kogumass (mg);

m_h ja m_i 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:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Võrrand 13}$$

kus:

D_p^1 = 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 ⁽¹⁾.
52. Kui pH katse lõpus oli läinud välja vahemikust 7 ± 1 ja biolagunemine oli ebapiisav, tuleb katset korrata katsekeskkonnaga, mille puhvermahtuvus on suurem.

⁽¹⁾ Seda tuleks uuesti hinnata, kui võrdlusainete hulgas on adsorbeerumisele kalduvaid või lahustumatuid aineid.

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 tühikats kontrollnõus, mis näitab, et uuritava 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 töötemperatuur, muda retentsiooniaeg, peamiselt olmereovesi jne), kontsentratsioon, igasugune teave, mis on vajalik selle põhjendamiseks ja teave inokulumi eeltöötlemise kohta (nt eelkääritsemine, eelnevasse kokkupuutesse viimine);
- inkubatsioonitemperatuur;
- paralleelkatsete arv.

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 millibaarides, 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.

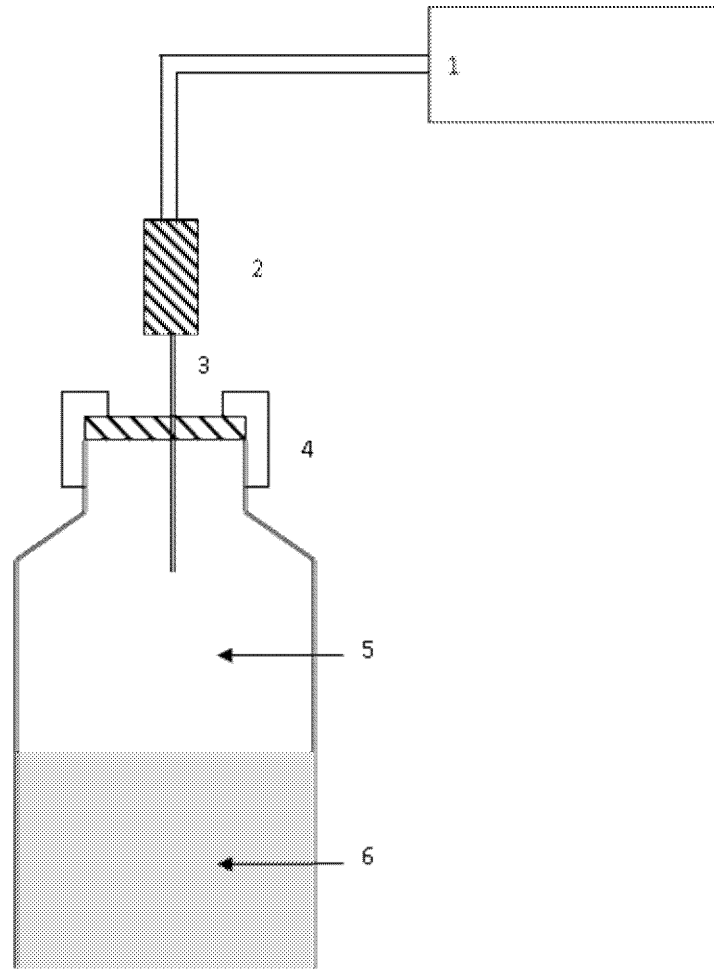
KIRJANDUS

- (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, D.C., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
 - (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
 - (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

1. 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_n)
- 6 – läbikääritatud muda inokulum (V_i)

Katsenõusid inkubeeritakse temperatuuril $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

2. liide

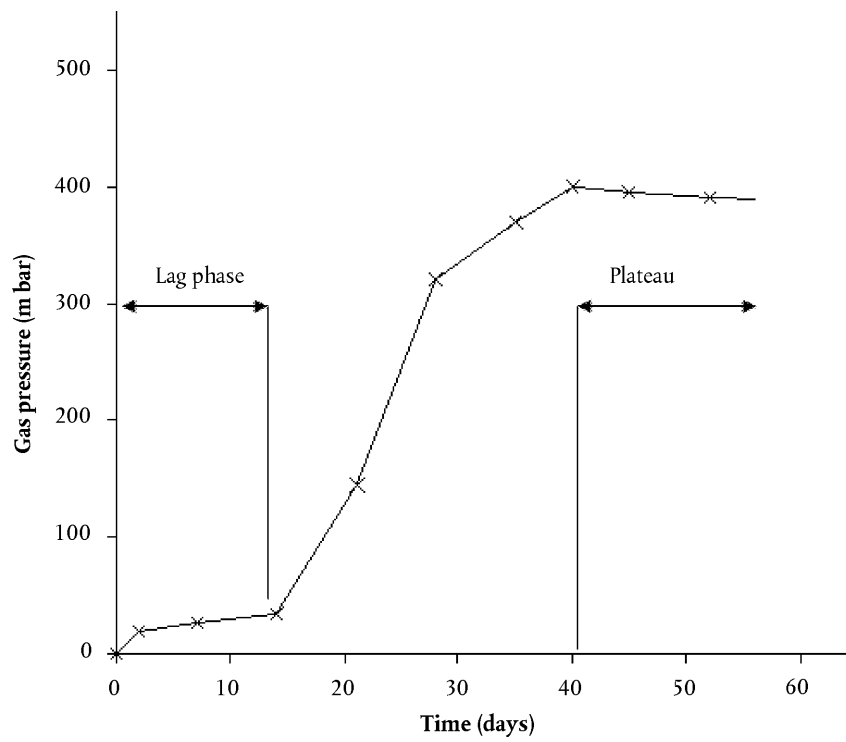
Rõhumõõtu näitude teisendamine

Rõhumõõtu näitusid võib gaasi ruumalaga siduda standardkõvera abil, mis saadakse teadaoleva ruumalaga õhukoguste süstimisega 35 ± 2 °C juures seerumipudelitesse, milles on reaktsioonisegu ruumalaga V_R võrdne kogus vett:

- viiesse seerumipudelis, mida on hoitud temperatuuril 35 ± 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 ± 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). Mõõtu näidud on lineaarsed rõhu vahemikus 0–70 000 Pa ja vabanenud gaasi ruumala vahemikus 0–50 ml.

3. liide

Lagunemiskõvera näide (kumulatiivne netorõhu suurenemine)



4. Lülde

Anaeroobse biolagunemise katse näidisandmelehed – andmeleht uuritava aine kohta

Labor: Uuritav aine: Katse nr:
 Katsetemperatuur, °C: Vabaruumi maht (V_h):(l) Vedelfaasi maht (V₁): (l)
 Süsinikku uuritavas aines C_{c,v}: (mg/l) m_v ⁽¹⁾: (mg)

Päev	p ₁ (katse) (mbar)	p ₂ (katse) (mbar)	p ₃ (katse) (mbar)	p (katse) keskmise (mbar)	p ₄ (tühi- katse) (mbar)	p ₅ (tühi- katse) (mbar)	p ₆ (tühi- katse) (mbar)	p (tühi- katse) keskmise (mbar)	p (neto) katse – tü- hikatse keskmise (mbar)	Δp (neto) kumula- tiivne (mbar)	m _h vabaruumi C ⁽²⁾ (mg)	D _h Biolagune- mine ⁽³⁾ (%)
	C _{IC, 1} katse (mg)	C _{IC, 2} katse (mg)	C _{IC, 3} katse (mg)	C _{IC} katse kesk- mine (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 – tü- hikatse keskmise (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 katsendõus, m_v (mg): m_v = C_{c,v} × V₁
 (2) Süsinikku vabaruumis, m_h (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C): m_h = 0,468 Δp × V_h
 (3) Biolagunemine, mis on arvatatud vabaruumis olevast gaasist, D_h (%): D_h = (m_h × 100)/m_v
 (4) Süsinik vedelfaasis, m₁ (mg): m₁ = C_{IC,net} × V₁
 (5) Gaasistatud süsiniku kogusisaldus, m_t (mg): m_t + m₁
 (6) Summaarne biolagunemine, D_t (%): D_t = (m_t × 100)/m_v

Labor: Võrdlusaine: Katse nr:
 Katsetemperatuur, °C: Vabaruumi maht (V_h): Vedelfaasi maht (V_l): (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)	Δp (võrd- lus) kumula- tiivne (mbar)	m_h vabaruumi C (2) (mg)	D_h Biologune- 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. kesk- mine (mg)	$C_{IC,net}$ võrdlusaine – inhib. (mg)	m_l vedelfaasis C (4) (mg)	m_t kokku C (5) (mg)	D_t Biologune- mine (6) (%)
Anorg. C (lõpp)												
pH (lõpp)												

(1) Süsinikku katsendõus, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

(2) Süsinikku vabaruumis, m_h (mg) normaalsel inkubeerimistemperatuuril (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

(3) Biologunemine, mis on arvatatud vabaruumis olevast gaasist, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

(4) Süsinikku vedelfaasis, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

(5) Gaasistatud süsiniku kogusisaldus, m_t (mg): $m_t = m_h + m_l$

(6) Summaarne biologunemine, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

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 → reoveesete → muld või õhk → määrg- või kuivisadenemine). 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*-oktanooli-vee jaotuskoefitsient (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) ⁽¹⁾. 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 tööruhmas, mis tuli kokku Itaalias Belgirates 1995. aastal (12). Samuti andis töörühm soovitusi mullaproovide kogumise, käsitsemise 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 (märgistamata või radioaktiivse märgisega, nt ¹⁴C) 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 märgistamata või radioaktiivse märgisega uuritavat kemikaali. Radioaktiivse märgisega ainet on vaja selleks, et uurida muundumissaaduste (vanandatud uuritava kemikaali jäägid) leostumist ja määrata massibilanssi. Soovitatakse kasutada ¹⁴C-märgist, kuid muud isotoobid nagu ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P 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 aiena. Taimekaitsevahendite koostises oleva toimeaine seostumise uurimiseks võib kasutada ka valmistoode, 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 erinõuetega katse korralduse suhtes võib olla kasulik pidada enne katse tegemist nõu reguleeriva asutusega. Vanandatud jääkide leostumise uuringu puhul tuleks kasutada puhast lähtekemikaali.

⁽¹⁾ Taimekaitsevahendite kolonnis leostumise uuringud võivad anda teavet uuritava kemikaali ja selle muundumissaaduste liikuvuse kohta ja võivad täiendada partiiiviisilisi sorptsiooni uuringuid.

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) jaotuskoefitsient süsteemis *n*-oktanool-vesi [katsemeetodid A.8 ja A.24] (13);
 - (5) adsorptsioonikoefitsient (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 kasutamismäärale (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 ≥ 10 % uuritava aine kogusest täheldatud muundumisteede uuringutes, kuid eelistatavalt kõik probleemset muundumissaadused) analüüsi tuvastuspiir peaks olema teada (vt punkt 17).

VÕRDLUSKEMIKAALID

12. Tuleks kasutada võrdluskemikaale nagu atrasiin või monuroon, mis on välitingimustes 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 triitium, bromiid, fluorestseiin, eosiin); see võib aidata ka kinnitada mullakolonni 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.

KVALITEEDIKRITEERIUMID

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. Mullakolonni niisutamiseks kunstliku vihmaga kasutatakse kolb- või peristaltilist pumpa, dušitsikut, Mariotte'i pudelit või lihtsat tilklehtrit.

Laboriseadmed ja kemikaalid

21. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:
- (1) analüüsiseadmed, nagu GLC-, HPLC- ja TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud detekteerimiseadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta kemikaalide määramiseks või pööratud isotooplahendusmeetodi 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) ekstraheerimiseade (nt tsentrifuugiküvetid külmekstraheerimiseks 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 CaCl₂ lahus destilleeritud või deioniseeritud vees (nn kunstlik vihm).

Uuritav kemikaal

23. Mullakolonni kandmiseks tuleks uuritav kemikaal lahustada deioniseeritud või destilleeritud vees. Kui uuritav kemikaal on vees halvasti lahustuv, võib seda kolonni kanda valmistootena (vajaduse korral pärast vees suspenderimist 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 kolonni kanda tahkel kujul ilma veeta; toodet võib enne kasutamist segada väikse koguse (nt 1 g) kvartslüvaga, et tagada selle ühtlasem jaotumine mullakolonni 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 mullakolonni pindalaga ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Koguse, mis tuleb kanda silindrilisele mullakolonni, 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 = mullakolonni kantav kogus [μg]

A = kasutamismäär [kg/ha]

d = mullakolonni diameeter [cm]

π = 3,14

Võrdluskemikaal

25. Leostumiskatse tegemisel tuleks kasutada võrdluskemikaali (vt punkt 12). See tuleks kanda mullakolonna pinnale samal viisil kui uuritav kemikaal ja 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 liikuvus 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 muutujad 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 mullatüüpe, mis esindaksid jaheda või parasvöötme kliimaga või troopilisi piirkondi. Seepärast juhul, kui eelistatakse teisi mullatüüpe, 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 tekstuuri (liiva-, tolmu- ja saviprotsent vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (14)), pH, kationivahetusvõime, orgaanilise süsiniku sisalduse, mulla lasuvustiheduse (häiritud muld) ja veemahutavuse järgi. Mikroobide biomassi mõõtmine on 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-horisonidist) kuni 20 cm sügavuselt. 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 ≤ 2 mm. Soovitatakse hoolikat homogeniseerimist, sest see suurendab tulemuste korratavust. Enne kasutamist võib mulda hoida toatemperatuuril ja õhu käes kuivatatuna (12). Säilitamisega 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 ± 2 °C. Soovitatavad temperatuurid on vahemikus 18–25 °C.
33. Kunstlikku vihma (0,01 M CaCl₂) tuleks lisada pidevalt mullasamba pinnale kiirusega 200 mm 48 tunni jooksul ⁽¹⁾; 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 leostumiskolonne 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 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 ⁽²⁾; paralleelkolonnide massid peaksid olema sarnased.

⁽¹⁾ See modelleerib väga suurt vihmasadu. Keskmine sademete hulk näiteks Kesk-Euroopas on 800–1 000 mm aastas.

⁽²⁾ Häiritud muldade näidistihedused on järgmised:

liiv 1,66 g/ml

keskmise liivsavi 1,17 g/ml

saviliiv 1,58 g/ml

tolmmuld 1,11 g/ml

35. Pärast täitmist kolonnid eelneisutatakse kunstliku vihmaveega (0,01 M CaCl₂ lahus) altpoolt ülespoole, et asendada õhk mulla poorides veega. Seejärel lastakse mullakolonnidel tasakaalustuda ja liigne vesi vajub raskusjõu toimele 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 filterpaberi-rikettaga, et jaotada kunstlikku vihma ühtlaselt üle kogu kolonni pinna ja vältida mullapinna häirimist vihmatilkadega. 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 ⁽¹⁾.
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 ≥ 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 olema piisavalt pikk, et tekiks olulisel määral muundumissaadusi; uuritava kemikaali soovitatav vanandamisaeg on selle kemikaali üks poolestusaeg, ⁽²⁾ 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 mullakolonni kogumass. Seejärel mullakolonnid eelneisutatakse, nagu on kirjeldatud punktis 35.
41. Seejärel kantakse mullakolonni pinnale 2 cm paksuse kihina vanandatud mulla jääkidena uuritav kemikaal ja selle jäägid (muundumissaadused) (vt punkt 39). Mullakolonni 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.

⁽¹⁾ 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.

⁽²⁾ 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.

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 kolonni 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.

Tulemuste tõlgendamine

47. Käesolevas meetodis kirjeldatud kolonnist 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 mõõdeta nende katsetega kvantitatiivselt uuritava kemikaali protsentuaalset kogust, mis võib jõuda põhjavette (11). Siiski võib kolonnist 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, tekstuuri 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.

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
 - 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., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- (24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris
-

1. 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 CaCl₂ 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 kemikaalst 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 biootiliste või abiootiliste muundumisreaktsioonide tulemusel, kaasa arvatud CO₂ 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).

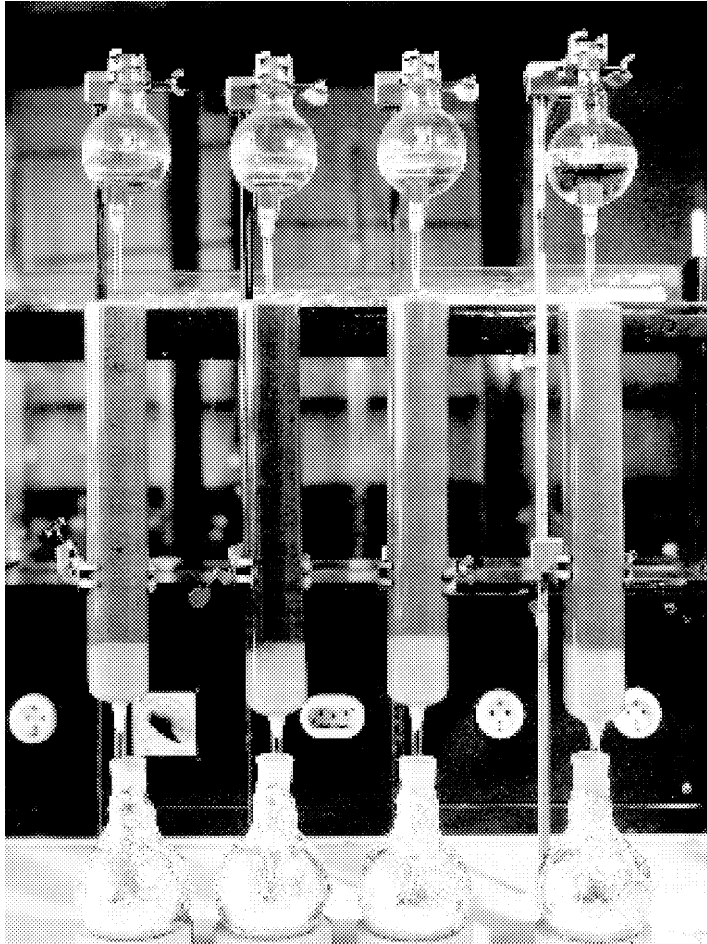
(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

2. liide

Joonis 1.

Osadeks mitte lahivõetava klaasist leostumiskolonnii 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)

← Kvartslüüa kiht

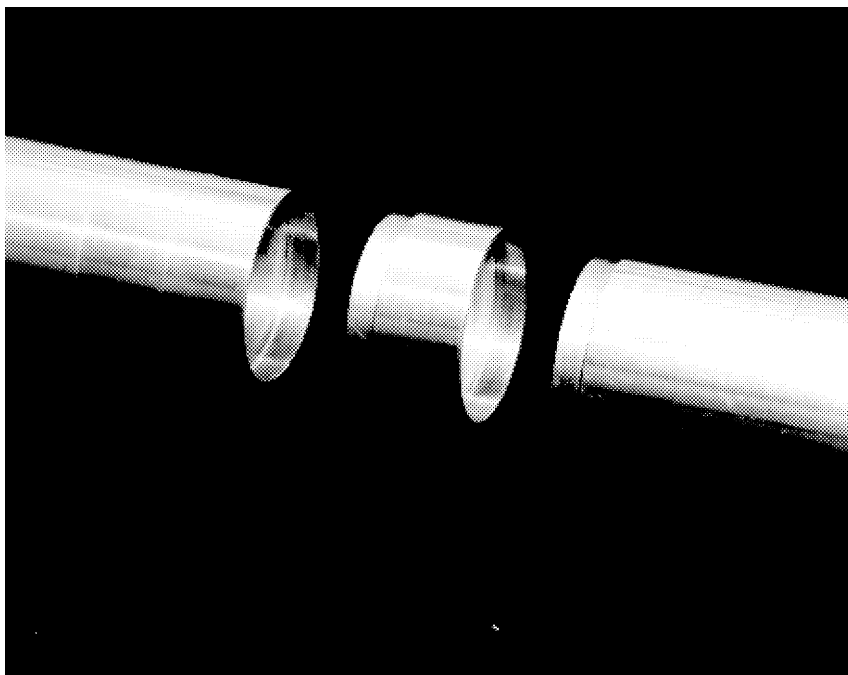
← Klaaskiudtropp, mis hoiab mulda kolonnis

← 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.

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.

—

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 (4) 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.

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 juhiste, 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).
8. Katset 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 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{päev}$. 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. Analüüsimeetodi mõõdetäpsus, kordustäpsus ja korratavus tuleks määrata enne katse tegemist.

Korratavus

14. Võetakse kolm proovi veest, analüüsitakse need ja leitakse heite väärtuse keskvaartus. 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 ± 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.
17. Merevette leostumise stsenaariumid: Puidust merevette leostumise uurimiseks soovitatakse kasutada sünteetilist merevett (nt ASTM D 1141 asendusmerevesi ilma raskmetallideta). Vee temperatuur peab olema 20 ± 2 °C ning mõõdetud pH ja temperatuur registreeritakse katseprotokollis. Veeproovidest, mis on võetud enne töödeldud puidu katsekehade viimist vette, saab määrata analüüsitavate 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 kanda 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 pikikülj 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, katsekehadest, 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.

Mahuti katsekehade sukeldamiseks

25. Mahuti on tehtud inertsest materjalist ja on piisavalt suur, et mahutada viis EN113 mõõdus puitkatsekeha 500 ml vees, mille pindala suhe mahusse on 0,4 cm²/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 mõõdud. Immutamine peab toimuma vastavalt puidu konservandiga töötlemise kirjeldusele kasutusklassi 4 või 5 puhul. Katsekeha kaalutakse uuesti pärast töötlemist ja konservandi peetumine (kg/m³) 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 (nt vaakuumsurveimmutuse 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 pintsliga. Katsekeha töötlemise meetod ja pealekandmise määr (nt l/m²) 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.

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 keskvaartusest 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 keskväärtuste arvutamiseks iga proovivõtuajavahemiku puhul.
42. Päevane heitevoog $\text{mg/m}^2/\text{päev}$ arvutatakse nii, et kolme paralleelkatse kolmest mõõtmisest võetakse keskväärtus ja jagatakse sukelduspäevade arvuga.

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 kg/m^3 või 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 (l/m^2 või 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 tüüpi, 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 kellaeg, 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.
-

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

Katse läbiviinud asutus	
Puidukonservant	
Konservandi tarnija	
Puidukonservandi konkreetne ja spetsiifiline nimi või kood	
Konservandi kaubanduslik või tavanimi	
Muud koostisained	
Asjakohane peetunud konservandi kogus veega kokkupuutesse viidud puidu kohta	
Töötlemine	
Pealekandmisviis	
Pealekandmise kuupäev	
Peetunud koguse arvutamiseks kasutatud valem:	
Konditsioneerimisviis	
Konditsioneerimise kestus	
Otste sulgemiseks kasutatud vahend ja pealekandmiskordade arv	
Edasine töötlemine	kui see on asjakohane
Katsekehad	
Puiduliik	
Puidu tihedus	(miinimum ... keskväärtus ... maksimum)
Kasvu kiirus (aastaringide arv 10 mm kohta)	(miinimum ... keskväärtus ... maksimum)
Niiskusesisaldus	

Katsekehakomplektid (*)	Peetunud kogus (nt kg/m³)
Töödeldud „x”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „y”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töödeldud „z”	5 katsekeha keskväärtus ja standardhälve või vahemik
Töötlemata	
Kõrvalekaldumised katsemeetodi näitajatest	nt vee kvaliteet, katsekehade mõõtmed jne

(*) x, y, z tähistavad kolme paralleelset proovi

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				

Palun koostage eraldi tabelid iga toimeaine kohta

Aeg	Veevahetus	Analüüsitulemused:															
		Töötlemata katsekehad			Töödeldud katsekehad												
		Toimeaine kontsentratsioon vees mg/l	Heite kogus mg/m ²	Leostumise kiirus mg/m ² /päev	Toimeaine kontsentratsioon vees				Heite kogus				Leostumise kiirus				
					x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine	x	y	z	Keskmine	
mg/l	mg/l				mg/l	mg/l	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ² /päev	mg/m ² /päev	mg/m ² /päev	mg/m ² /päev			
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 katsekehade saadud tulemused peaksid olema parandatud väärtused. Samuti võib olla vajalik kasutada esialgse vee analüüsist saadud parandit.

*2. liide***Mõisted**

Keemiline aine: aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil

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 setesse 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 setesse 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. Mõnd 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_1) ja eraldumise kiiruskonstant (k_2). 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 kasutamiseiga soovitakse 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 ruumalasisid ning arvatavasti ka koeproovi suurust.

EELTINGIMUS JA TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

7. Praeguseks on bioakumulatsiooni kohta kindlaks tehtud ainult mõned selged kvantitatiivsed struktuuriaktiivsuse sõltuvused (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) (14). Kõige laialdasemalt kasutatav sõltuvus on stabiilsete orgaaniliste ainete bioakumulatsiooni ja biokontsentratsiooni ning nende lipofiilsuse vahel (mida väljendab oktanooli-vee jaotuskoefitsiendi logaritmi ($\log K_{ow}$); mõiste vt 1. liide), mis on välja arendatud aine vee ja kala vahel jaotumise kirjeldamiseks. Ka sette kohta on kindlaks tehtud selliseid sõltuvusi (15, 16, 17, 18). Peamise kvantitatiivse struktuuriaktiivsuse sõltuvusena võib $\log K_{ow}$ - $\log BCF_i$ sõltuvus (kus BCF on biokontsentratsiooni tegur) abiks olla end setetega 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 jaotuskoefitsiendi (K_{oc}) kasutada olulise tegurina end setetega 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 füüsikalise-keemilised omadused raskendavad katse tegemist, on esitatud publikatsioonides (20) ja (21). Enne, kui hakatakse uurima aine bioakumulatsiooni põhjasetetes elavatesse väheharjasussidesse, peaks uuritava aine kohta olema olemas 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 jaotuskoefitsient K_{ow} [katsemeetodid A.8, A.24 (22)];
 - sette-vee jaotuskoefitsient, 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 märgisega 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 -märgisega 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 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 omastamisperioodiks, 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 kasulikke 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 ohutuskaardid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid vees, settes ja usside kudedes. Kui kasutatakse radioaktiivse märgisega uuritavat ainet, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o Bq mol^{-1}), märgisega 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 järgi. 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).
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 teatavaid 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_a) 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 katses 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 bioakumuleerimisvõime ja lipofiilsuse vahel, mis on kindlaks tehtud kalade kui mudelorganismide abil (14, 25, 27). Kõnealuste ainete puhul jälgitav bioakumulatsioon sõltub ka katses 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 kontrollloomi 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.

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 ajavahemike järel (nt kord kuus) võrdlusainega nagu kaaliumkloriid (KCl) või vasksulfaat (CuSO_4) (1) selleks, et saada teavet katseloomade tervises seisundi kohta (1, 6). Kui kontroll-mürgisuskatset korrapäraste ajavahemike 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 tühe-liigikultuuris. 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 materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat ainet adsorbeerida või muid kemikaale eraldada ning avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Võib kasutada tavapäraseid ristkülikukujulisi või silindrilisi kambreid, mis on valmistatud keemiliselt inertselt 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, roostevaba terast 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). Radioaktiivse märgisega uuritava aine ja lenduva aine puhul tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava aine väljapuhumist ja väljapuhutud uuritava aine kaotaminekut. Tuleb kasutada püüdüreid (nt sobiva absorbendiga klaasist gaasipesupudelit), 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 CaCO_3 liitris (7). Kõnealuse taastatud vee pH ja kareduse vahemikud on esitatud katsemeetodis C.1 (25). Kui võib kahtlustada mingit vastastikust mõju karedust tekitavate ionide 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 hägusus võimaldab vaatlusi, ning kanda vaatluste tulemused protokollis. Kontroll- ja kokkupuuterühmade ussid peaksid kaevuma settesse 24 tunni jooksul pärast nende lisamist katsenõudesse. 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 uuritava 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 katteveekiht 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.

Säilitamine

32. Loodusliku sette säilitamisaeg laboris peaks olema võimalikult lühike. Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseagentuur soovib (6) seda säilitada kuni 8 nädalat 4 ± 2 °C juures pimedas. Säilitamisnõus 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 kvartslüiva või osa sellest (nt 10 g kvartslüiva katsenõu kohta) võib immutada sobivas lahustis lahustatud uuritava ainega; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Ainega kaetud komponendi saab seejärel segada niiske sette sisse. Sette valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja liiva segust pärit liiva, s. o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega (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 keskkonnatingimuste 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 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.

Kokku puutetingimused

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 saavunud 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 ajavahemikuga, 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 veekeskonna 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* 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.
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 aklimatiseerumisaast. 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 katsenõudesse, nt pehmete teraspintsetide abil. Katsenõusid inkubeeritakse seejärel katse tingimustes.

Söötmine

45. Arvestades tehissete vähest toitainesisaldust tuleks settele lisada söödaallikas. 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. Soovitatav sette/vee suhtarv on 1:4 (45). Sellist suhtarvu peetakse sobivaks, et hoida hapniku kontsentratsioon vajalikul tasemel ja vältida ammoniaagi teket katvas veekihis. Hapnikusisaldus katvas veekihis 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.

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 $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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_{01} , mis on saadud asjakohasest kroonilise mürgisuse katsest). Madalam uuritav 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 taustanalüüsides 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 paralleelkatse (vähemalt 3 võetakse proovideks alguses, 3 omastamisfaasi lõpus ja 3 eraldumisfaasi lõpus). Sel juhul tuleks ette näha negatiivne (ilma lahustita) kontrollrühm nelja täiendava paralleelkatsega proovide võtmiseks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelkatseid võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Üksikasjad on esitatud 3. liites.

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 ₃ milligrammidena liitris;
ammoniaagi üldsisaldus	vähemalt ühes uuritava ainega nõus ja ühes kontrollnõus omastamisfaasi ja eraldumisfaasi alguses ja lõpus; väljendatakse NH ₄ ⁺ , NH ₃ 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 dekanterimise või sifooni abil. Sette proovid tuleks võtta ettevaatlikult, et usse võimalikult vähe häirida.
59. Eemaldage proovivõtmise ajaks paralleelkatsenõust kõik ussid, näiteks nii, et suspendeerite sette katvas veekihi ja kallate iga paralleelkatse laia madalasse nõusse, millelt saab ussid ära korjata pehmete teraspintsettidega. Loputage neid kiiresti veega madalas klaas- või terasnõus. Eemaldage liigne vesi. Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad. Surmake ussid külmutamise teel ($t \leq -18$ °C). Registreerida tuleks kookonite 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 mõõtmistel 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 arvutada juba katse vältel ligikaudsed omastamis- ja eraldumiskiirused. Kohene analüüs hoiab ära ka viivituse platoon 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 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 ussides, 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 kavatakse 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 statistilisi 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 skaalas graafikule uuritava aine kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis 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_d/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 füüsikalised-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 eeltötlused, 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, veeikihi maht, setteikihi 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);
- 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 analüüsimismeetodite (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 määrgkaalu kg / usside määrgkaalu kg), sette omastamise kiiruskonstant k_s (sette määrgkaalu g / usside määrgkaalu kg / päev), ja eraldumise kiiruskonstant k_e (1/päev); lisaks võib teatada ka elustiku-sette akumulatsiooniteguri BSAF (sette orgaanilise süsiniku kg / usside lipiidisisalduse kg);
- 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.
-

1. liide

Mõisted ja ühikud

Tehisete, 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_k).

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 veekiht 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).

Tasakaalustamisaega 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 veorganismidesse 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 järjestikuse 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 settefaasis; 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.

—

2. liide

Omastamise ja eraldumise parameetrite arvutamine

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsiooniteguri saab mõõtmistulemustest arvutada, kui jagada statsionaarse 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.

Tavapärase meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri (BAF_k), settest omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja eraldumise kiiruskonstandi (k_e) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelinearseid 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 lähenemisviisi uuritava aine kontsentratsiooni leidmiseks usside kudedes statsionaarses olekus ($C_{a,ss}$).

Elustiku-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 mittelinearse hindamise programmi abil.

Vaikimisi soovitatakse lähtepunktiks võtta mõõdetud keskmine jääkide kontsentratsioon usside kehas omastamisfaasi lõpus. Omastamisfaasist modelleeritud/hinnatud 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.

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: eraldumisfaasi 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 statsionaarses 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):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times \text{BAF}}{A + B} \quad [\text{võrrand 5}]$$

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 eraldumisfaasi andmetele. Omastamise ja eraldumise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arvutamise meetodi kirjeldus on esitatud publikatsioonides (55, 56 ja 57).

Eraldumata jäänud jäägid (*Non-Eliminated Residues*, *NER*) tuleks arvutada teise olulise näitajana; selleks korrutatakse keskmine kontsentratsioon ussides (C_a) eraldumisfaasi 10. päeval, mis on jagatud keskmise kontsentratsiooniga ussides statsionaarses olekus (omastamisfaasi 28. päeval) (C_a), 100-ga:

$$\mathbf{NER}_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination (average)} \times 100}{C_a \text{ at steady state (average)}}$$

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 püüdurahustest, kui neid kasutatakse.
	Kokkupuute-eelsete tegevuste (tasakaalustamisfaasi) ajakava tuleks määrata aine omaduste põhjal. Vajaduse korral tuleb ettevalmistatud setet konditsioneerida katva veekihi all temperatuuril 20 ± 2 °C juures 7 päeva; sellisel juhul tuleb sette tegemist alustada varem.
	Päeva 2 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

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; 4-6 tundi 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).

4. liide

Mõned lahjendamiseks sobiva vee füüsikalise-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 liitrini.

b. Magneesiumsulfaadi lahus

Lahustage 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

c. Naatriumvesinikkarbonaadi lahus

Lahustage 2,59 g NaHCO_3 deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

d. Kaaliumkloriidi lahus

Lahustage 0,23 g KCl deioniseeritud vees; täiendage sama veega 1 liitrini.

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsipuhtad.

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 liitrini. Selles lahuses on kaltsium- ja magneesiumioonide kontsentratsioonide summa 2,5 mmol/l.

Ioonide suhtarv Ca:Mg on 4: 1 ning Na:K on 10:1. Selle lahuse puhvermahtuvus happe neutraliseerimisel $K_{\text{S4.3}}$ on 0,8 mmol/l.

Lahjendusvett aereeritakse, kuni on saavutatud vee küllastumine hapnikuga, seejärel hoitakse seda enne kasutamist umbes kaks päeva ilma edasise aereerimiseta.

Sobiva lahjendusvee pH peaks olema vahemikus 6–9.

5. liide

Tehisete – soovitused 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: ≤ 2 mm, kuid > 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μm	76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisisaldus ≥ 30 %	22 ± 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 α -tselluloosiga (1: 1); vastavalt farmaatsia nõuetele ja inimtervishoiu ettenähtud kvaliteediga; lisaks kuivale settele	0,4–0,5 %
Kaltsiumkarbonaat	CaCO_3 , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas, lisaks kuivale settele	0,05–1
Deioniseeritud vesi	Juhtivus ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, lisaks kuivale settele	30–50

Kui võib eeldada suurenevat ammoniaagisisaldust, näiteks kui uuritav aine on teadaolevalt nitrifikatsiooni inhibiitor, võib olla otstarbekas asendada 50 % lämmastikurikast nõgesepulbrit tselluloosiga (nt α -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 CaCO_3 abil vahemikku $5,5 \pm 0,5$. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks ööpäeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent. Segu pH mõõdetakse uuesti ja reguleeritakse vajaduse korral 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 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.

Seejärel segatakse iga kontsentratsioonitaseme settesse rikastatud kvartslüiv, sete jaotatakse paralleelkatsenõudesse ja lisatakse kattev veekiht (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 veekihti 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 ± 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.

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 soovitatakse (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 peeneksjahvatatud 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 homogeneenitud söödasuspensiooni 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 tulel poleeritud otsaga pipeti abil.

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 kasvatusingimuste 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 ökotoksikoloogiakatsetes. Teavet tema bioloogia, kasvatustingimuste ja tundlikkuse kohta võib saada publikatsioonidest (1, 6, 9, 36). Rabeliimukat võib samuti kasvatada mudatupe jaoks soovitatud tehises (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 tükid. Seda substraati saab otse kasutada rabeliimuka kasvatamise akvaariumis, kui laotada see nõu põhjale, või seda võib säilitada külmutatult deioniseeritud vees hilisemaks kasutamiseks. Uus substraat peab kasvatamishetkel 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 kasvatamishetkel välja võtta näiteks substraadi eemaldamisega, kasutades peenesilmalist võrku, või usside väljavõtmisega, kasutades tulel poleeritud laiasuulist (läbimõõt umbes 5 mm) klaasipipetti, 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 minema ja ussid jäävad nõu põhjale. Seejärel saab ussid üle viia värskelt ettevalmistatud kasvatusnõusse või kasutada neid katse alustamiseks, nagu on kirjeldatud publikatsioonides (1) ja (6). Usside vigastamist või enesekõndimist tuleks vältida, selleks tuleb nende usside käsitsemiseks kasutada tulel poleeritud otsaga pipette või roostevabast terasest pintsette.

Küsimus, mida tuleb kriitiliselt hinnata rabeliimuka kasutamisel sette bioakumulatsiooni katsetes, on tema paljunemisviis (arhitoomia (jagunemine kaheks fragmendiks), millele järgneb morfallaksis (puuduvate fragmentide moodustamine)). Sellisel mitesugulisel paljunemisel saadakse kaks fragmenti, kes teatava aja jooksul ei toitunud, 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 substraadis (regenereerinud pea olemasolu võib tõendada sellega, kui esindavat usside osaproovi vaadeldakse binokulaarmikroskoobiga). Katseorganismid peaksid seejärel olema sarnases füsioloogiaseisundis. 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 substraadis 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 ± 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 tül 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 settetiübiga 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 tagaosas on tavaliselt sisse kaevunud. Kõnealune liik on hästi 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 söötmingimustes (Aston *et al.*, 1982, (65)). *B. sowerbyi* 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 ≤ 63 μm), 375 ml puhast liiva (M32) ja 750 ml taastatud või deklooritud 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 ülessulatatud aedsalatiga *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.

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 läbivoolukatse.
- (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 kasutamiseiga.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log 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., Böhling, 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. Adsorptsioonitegur (K_{oc}) kindlaksmääramine mullas ja reoveesetesse kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil.
- Käesoleva lisa peatükk C.29. Kiire biolagundatavus – CO₂ 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.
- (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.1. 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.
- (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) Hoofman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenberg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

-
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274"
-

ISSN 1977-0650 (elektroniline väljaanne)
ISSN 1725-5082 (paberväljaanne)



Euroopa Liidu Väljaannete Talitus
2985 Luxembourg
LUKSEMBURG

ET