

Az Európai Unió Hivatalos Lapja

L 54



Magyar nyelvű kiadás

Jogszabályok

59. évfolyam

2016. március 1.

Tartalom

II *Nem jogalkotási aktusok*

RENDELETEK

- ★ A Bizottság (EU) 2016/266 rendelete (2015. december 7.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról⁽¹⁾ 1

⁽¹⁾ EGT-vonatkozású szöveg

HU

Azok a jogi aktusok, amelyek címe normál szedéssel jelenik meg, a mezőgazdasági ügyek napi intézésére vonatkoznak, és rendszerint csak korlátozott ideig maradnak hatályban.

Valamennyi más jogszabály címét vastagon szedik, és előtte csillag szerepel.

II

(Nem jogalkotási aktusok)

RENDELETEK

A BIZOTTSÁG (EU) 2016/266 RENDELETE

(2015. december 7.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre ⁽¹⁾ és különösen annak 13. cikke ⁽²⁾ bekezdésére,

mivel:

- (1) A 440/2008/EK bizottsági rendelet ⁽²⁾ az 1907/2006/EK rendelettel összefüggésben történő alkalmazás céljából vizsgálati módszereket határoz meg a vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására.
- (2) A 440/2008/EK rendeletet az OECD által a közelmúltban a műszaki fejlődésre való tekintettel elfogadott új és átdolgozott vizsgálati módszerek beépítése, valamint – a 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvnek ⁽³⁾ megfelelően – a kísérleti célokra felhasznált állatok számának csökkentése érdekében módosítani kell. A Bizottság e rendelet tervezetéről konzultált az érdekeltekkel.
- (3) A módosítás húsz vizsgálati módszert tartalmaz: egy új módszer egy fizikai-kémiai jellemző mérésére szolgál, tizenegy új és három átdolgozott módszer az ökotoxicitás értékelését támogatja, míg öt új módszer a vegyi anyagok környezeti sorsának és viselkedésének meghatározását segíti.
- (4) A 440/2008/EK rendeletet ezért megfelelően módosítani kell.
- (5) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikke alapján létrehozott bizottság véleményével,

⁽¹⁾ HLL 396., 2006.12.30., 1. o.

⁽²⁾ A Bizottság 2008. május 30-i 440/2008/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról (HLL 142., 2008.5.31., 1. o.).

⁽³⁾ Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HLL 276., 2010.10.20., 33. o.).

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 440/2008/EK rendelet melléklete e rendelet mellékletének megfelelően módosul.

2. cikk

Ez a rendelet Az Európai Unió Hivatalos Lapjában való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2015. december 7-én.

a Bizottság részéről
az elnök
Jean-Claude JUNCKER

MELLÉKLET

A 440/2008/EK rendelet melléklete a következőképpen módosul:

1. A melléklet az A. rész előtt a következő szöveggel egészül ki:

„Megjegyzés:

Ha egy vizsgálati módszer leírása nem utal egyértelműen a módszernek a több összetevőből álló anyagok, az ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok (UVCB), illetőleg a keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságára, akkor azt megelőzően, hogy a vizsgálati módszert egy több összetevőből álló anyag, UVCB vagy keverék vizsgálatára alkalmazzuk, meg kell fontolni, hogy a módszer a tervezett szabályozási cél szempontjából megfelelő-e.

Ha a vizsgálati módszert több összetevőből álló anyag, UVCB vagy keverék vizsgálatára alkalmazzuk, akkor – például az összetevők kémiai azonosító adatainak, mennyiségi előfordulásának és releváns jellemzőinek megadásával – a lehetőségekhez mérten elegendő információt kell szolgáltatni az összetételről.”

2. A melléklet a következő A.24. fejezettel egészül ki:

„A.24. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (N-OKTANOL/VÍZ), NAGY TELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRAFÍÁS (HPLC) MÓDSZER

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 117. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel.

1. A megoszlási hányados (P) egy két, egymással nem elegyedő oldószerből álló, kétfázisú rendszerben feloldott anyag egyensúlyi koncentrációinak aránya. N-oktanol és víz esetében:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{víz}}}$$

Mivel a megoszlási hányados két koncentráció hányadosa, dimenziótlan, és rendszerint 10-es alapú logaritmusával adják meg.

2. A P_{ow} az egyik legfontosabb paraméter a vegyi anyagok környezetben bekövetkező sorsának tanulmányozása során. Erősen szignifikáns kapcsolatot mutattak ki az anyagok nem ionizált formájának P_{ow} értéke és a halakban való biológiai felhalmozódása között. Azt is kimutatták, hogy a P_{ow} hasznos paraméter a talajon és az üledékeken végbemenő adszorpció előrejelzésére, valamint kvantitatív szerkezet-hatás összefüggések megállapítására a biológiai hatások széles köre esetében.
3. Az erre a vizsgálati módszerre vonatkozó eredeti javaslat C.V. Eadsforth és P. Moser cikkén (1) alapult. A vizsgálati módszer kidolgozását és az OECD laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatát a Németországi Szövetségi Köztársaság Umweltbundesamt nevű intézménye koordinálta 1986 folyamán (2).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

4. A – 2 és + 4 közötti (esetenként akár 5 és afeletti) tartományban található $\log P_{ow}$ értékeket (1) a lombikrázásos módszerrel (e melléklet A.8. fejezete, OECD 107. vizsgálati iránymutatás) lehet kísérleti úton meghatározni. A HPLC-módszer a 0–6 közötti tartományban található $\log P_{ow}$ értékeket fedi le (1)(2)(3)(4)(5). E módszer esetében a P_{ow} becslésére lehet szükség a megfelelő referenciaanyagok hozzárendelése, illetve a vizsgálat által generált adatokból levont következtetések alátámasztása érdekében. A számítási módszereket a vizsgálati módszer függelékében röviden bemutatjuk. A HPLC-üzemmód izokratikus.
5. A P_{ow} értékek a környezeti feltételektől függenek, például a hőmérséklettől, a pH-értéktől, az ionerősségtől stb. Ezeket a P_{ow} adatok helyes értelmezése érdekében a kísérlet során meg kell határozni. Ionizálható anyagok esetében más módszerek (pl. az ionizált anyagoknál alkalmazható pH metrikus módszerről szóló OECD-iránymutatás-tervezet (6)) is elérhetővé válhatnak, amelyeket alternatív módszerként lehet használni. Bár az említett OECD-iránymutatás-tervezet alkalmas lehet a P_{ow} meghatározására ionizálható anyagok esetében, egyes esetekben célszerűbb egy bizonyos, környezetvédelmi szempontból releváns pH-értéken (lásd a 9. pontot) a HPLC-módszert használni.

(1) Felső határt adunk meg, mert teljes szeparációs fázist szükséges elérni a megoszlási egyensúly kiigazítása után és mielőtt mintákat veszünk ki analitikai meghatározás céljából. Ha a megfelelő gondossággal járunk el, a felső határt magasabb P_{ow} értékekre is ki lehet terjeszteni.

A MÓDSZER ELVE

- A fordított fázisú HPLC-t olyan, kereskedelmi forgalomban kapható szilárd fázissal megtöltött analitikai oszlopokon végezzük, amely kémiai kovasavhoz kötött hosszú szénhidrogénláncokat (például C8, C18) tartalmaz.
- Az ilyen oszlopra injektált vegyi anyag elválasztja a mozgó oldószer fázist a szénhidrogén álló fázistól, miközben azt a mozgó fázis végigszállítja az oszlopon keresztül. Az anyagok a szénhidrogén-víz megoszlási hányadosuk arányában maradnak vissza: a hidrofil anyagok eluálódnak először, a lipofil anyagok pedig utoljára. A retenció időt a k kapacitástényező fejezi ki, amely a következő egyenletből adódik:

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

ahol t_R a vizsgált anyag retenció ideje, t_0 pedig a holtidő, azaz az egy oldószer-molekulának az oszlopon történő áthaladásához átlagosan szükséges idő. Kvantitatív analitikai módszerek nem szükségesek, csak a retenció időket kell meghatározni.

- Egy vizsgált anyag oktanol/víz megoszlási hányadosát úgy lehet kiszámítani, hogy kísérleti úton meghatározzuk a k kapacitástényezőjét, majd a kapacitástényezőt beillesztjük a következő egyenletbe:

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

ahol

a, b = lineáris regressziós együtthatók.

A fenti egyenletet úgy kapjuk, hogy lineáris regressziót alkalmazunk a referenciaanyagok oktanol/víz megoszlási hányadosainak logaritmusára a referenciaanyagok kapacitástényezői logaritmusának függvényében

- A fordított fázisú HPLC-módszer lehetővé teszi a 0 és 6 közötti $\log P_{ow}$ tartományban található megoszlási hányadosok becslését, de kivételes esetekben ki lehet terjeszteni, hogy lefedje a 6 és 10 közötti $\log P_{ow}$ tartományt is. Ehhez a mozgó fázis módosítására lehet szükség (3). A módszer nem alkalmazható erős savak és lúgok, komplex fémvegyületek, az eluenssel reakcióba lépő anyagok és felületaktív anyagok esetében. Ionizálható anyagokon nemionos formájukban (szabad sav vagy szabad bázis) csak megfelelő puffer használata mellett lehet méréseket végezni, amelynek pH-értéke szabad sav esetében a pK_a alatt, szabad bázis esetében a pK_a felett van. Emellett az ionizálható anyagok tesztelésére szolgáló pH-metrikus módszer (6) is elérhetővé válhat, és alternatív módszerként lehet majd használható (6). Ha a $\log P_{ow}$ érték környezeti veszélyességi besorolás vagy környezeti kockázatértékelés céljából kerül meghatározására, a vizsgálatot a természeti környezet szempontjából releváns, azaz az 5,0 és 9 közötti pH-tartományban kell elvégezni.
- Egyes esetekben a szennyeződések megnehezíthetik az eredmények értelmezését a csúcsok hozzárendelésének bizonytalansága miatt. Az olyan keverékek esetében, amelyek egy feloldatlan sávot adnak, a $\log P_{ow}$ felső és alsó határát, valamint az egyes $\log P_{ow}$ csúcsok terület %-át kell meghatározni. A homológokból álló keverékek esetében a súlyozott átlagos $\log P_{ow}$ értéket is meg kell állapítani (7), amelyet az egyes P_{ow} értékek és a megfelelő terület %-értékek alapján kell kiszámítani (8). A számításban minden olyan csúcsot figyelembe kell venni, amelynek területe 5 % vagy annál nagyobb mértékben járul hozzá az összes csúcs alatti területhez (9):

$$\log P_{ow} \text{ súlyozott átlaga} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{terület } \%)}{\text{összes csúcs terület } \% - a} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{terület } \%_i)}{\sum_i \text{ terület } \%}$$

A $\log P_{ow}$ súlyozott átlaga csak homológokból (pl. alkánsorozat) álló anyagok vagy keverékek (pl. tallolajok) esetében érvényes. A keverékek esetében érdemi mérési eredményeket lehet kapni, feltéve, hogy a használt analitikai detektor a keverékben található összes anyaggal szemben azonos érzékenységet mutat, és megfelelően fel lehet őket oldani.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

- Az anyag disszociációs állandóját, szerkezeti képletét és a mozgó fázisban való oldhatóságát a módszer alkalmazása előtt meg kell ismerni. Ezenkívül a hidrolízisre vonatkozó információk is hasznosak lehetnek.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

12. A mérés megbízhatóságának növelésére két meghatározást kell végezni.
- Megismételhetőség: Az azonos körülmények között elvégzett és ugyanazokat a referenciaanyagokat használó megismételt mérésekből származó $\log P_{ow}$ értékeknek a $\pm 0,1$ log egység tartományba kell esniük.
 - Reprodukálhatóság: Ha a méréseket különböző referenciaanyagokkal ismétlik meg, az eredmények eltérhetnek. A $\log k$ és $\log P_{ow}$ közötti összefüggés R korrelációs együtthatója egy adott sorozat vizsgálati anyag esetében jellemzően 0,9 körül van, amely $\log P_{ow} \pm 0,5$ log egység oktanol/víz megoszlási együtthatónak felel meg.
13. A laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat kimutatta, hogy a HPLC-módszerrel a lombikrázásos értékekhez képest $\pm 0,5$ egységen belüli $\log P_{ow}$ értékek nyerhetők (2). A szakirodalomban további összehasonlítások találhatóak (4)(5)(10)(11)(12). A szerkezetileg rokon referenciaanyagokon alapuló korrelációs diagramok adják a legpontosabb eredményeket (13).

REFERENCIAANYAGOK

14. Annak érdekében, hogy egy anyag mért k kapacitástényezőjét a saját P_{ow} értékével korrelációba lehessen hozni, egy legalább 6 pontot felhasználó kalibrációs görbét kell kialakítani (lásd a 24. pontot). A felhasználó feladata a megfelelő referenciaanyagok kiválasztása. A referenciaanyagoknak általában olyan $\log P_{ow}$ értékekkel kell rendelkezniük, amelyek magukban foglalják a vizsgálati anyag $\log P_{ow}$ értékét, azaz legalább egy referenciaanyagnak a vizsgált anyagénál magasabb, egy másiknak pedig a vizsgált anyagénál alacsonyabb P_{ow} értékkel kell rendelkeznie. Extrapoláció csak kivételes esetekben alkalmazható. Célszerű, hogy ezek a referenciaanyagok a vizsgált anyaggal szerkezetileg rokon anyagok legyenek. A kalibráció során használt referenciaanyagok $\log P_{ow}$ értékeinek megbízható kísérleti adatokon kell alapulniuk. A magas (általában több mint 4) $\log P_{ow}$ értékű anyagoknál azonban számított értékek is használhatók, kivéve, ha megbízható kísérleti adatok állnak rendelkezésre. Extrapolált értékek használata esetén határértéket kell megadni.
15. Számos vegyi anyag-csoport esetében a $\log P_{ow}$ értékekről terjedelmes jegyzékek állnak rendelkezésre (14)(15). Amennyiben a szerkezetileg rokon anyagok megoszlási hányadosairól nem állnak rendelkezésre adatok, más referenciaanyagokkal végzett, általánosabb kalibrálás is használható. Az ajánlott referenciaanyagok és azok P_{ow} értékei az 1. táblázatban találhatóak. Ionizálható anyagok esetében a megadott értékek a nem ionizált formára vonatkoznak. Az értékek elfogadhatóságát és minőségét a laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat során ellenőrizték.

1. táblázat

Ajánlott referenciaanyagok

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-butanon (metil-etil-keton)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetil-piridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzil-alkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoxi-fenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoxi-ecetsav	1,4	pKa = 3,12

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenil-acetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzil-alkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitro-benzol	1,9	
18	104-54-1	Fahéjalkohol (Fahéjsav-alkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoesav	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (transz)	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (transz)
22	100-66-3	Anizol	2,1	
23	93-58-3	Metil-benzoát	2,1	
24	71-43-2	Benzol	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzoesav	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Triklór-etilén	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Etil-benzoát	2,6	
30	1194-65-6	2,6-diklórbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-klórbenzoesav	2,7	pKa = 3,82

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluol	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-diklóranilin	2,8	
35	108-90-7	Klórbenzol	2,8	
36	1746-13-0	Allil-fenil-éter	2,9	
37	108-86-1	Brómbenzol	3,0	
38	100-41-4	Etil-benzol	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklór-benzol	3,4	
43	122-39-4	Difenil-amin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalin	3,6	
45	93-99-2	Fenil-benzoát	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzol	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklórfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benzil-benzoát	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-szek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklór-benzol	4,2	
52	143-07-7	Dodekánsav	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenil-éter	4,2	
54	85-01-8	Fenantrén	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzol	4,6	

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridin	4,9	
58	206-44-0	Fluorantén	5,1	
59	603-34-9	Trifenil-amin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A megoszlási hányados előzetes becslése

16. Ha szükséges, a vizsgált anyag megoszlási hányadosát meg is lehet becsülni, lehetőleg egy számítási módszer használatával (lásd a függelék), vagy adott esetben a vizsgált anyag tiszta oldószerekben való oldhatósági aránya segítségével.

Készülékek

17. Egy alacsony pulzálású szivattyúval és alkalmas detektáló rendszerrel felszerelt folyékony fázisú kromatográfia van szükség. A 210 nm hullámhosszot használó UV-detektor vagy az RI detektor a legkülönbözőbb kémiai csoportok esetében alkalmazható. A poláros csoportok jelenléte az álló fázisban nagymértékben ronthatja a HPLC-oszlop teljesítményét. Ezért az álló fázisnak minimális százalékban szabad csak poláros csoportokat tartalmaznia (16). Kereskedelmi forgalomban kapható mikroszemcsés, fordított fázisú töltetek vagy előre töltött oszlopok is használhatók. Az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé védőoszlop helyezhető el.

Mozgó fázis

18. Használjunk HPLC-minőségű metanolt és desztillált vagy ionmentesített vizet az eluáló oldószer készítésére, amelyet használat előtt gáztalanítsunk. Izokratikus elúciót célszerű alkalmazni. A metanol/víz arányt úgy állítsuk be, hogy az eluáló oldószer legalább 25 % vizet tartalmazzon. Általában a 3:1 (térfogat/térfogat) arányú metanol-víz keverék alkalmas log P = 6 anyagok 1 órán belüli eluálásához 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Ha az anyag log P-je 6-nál magasabb, szükségessé válhat az elúciós idő lerövidítése (a referenciaanyagoknál is) a mobil fázis polaritásának vagy az oszlop hosszúságának csökkentésével.
19. A vizsgálati anyagnak és a referenciaanyagoknak a kimutathatósághoz elegendő koncentrációban oldhatónak kell lenniük a mozgó fázisban. Adalékok csak kivételes esetekben adhatók a metanol-víz elegyhez, mivel megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Ezekben az esetekben igazolni kell, hogy az adalékok nem befolyásolják a vizsgált anyag és a referenciaanyagok retenciós idejét. Ha a metanol-víz keverék nem megfelelő, más szerves oldószer-víz keverékek is használhatók, pl. etanol-víz, acetonitril-víz vagy izopropil-alkohol (2-propanol)-víz.
20. Az eluáló folyadék pH-ja döntő fontosságú ionizálható anyagok esetében. Ennek az oszlop üzemi pH-tartományán belül kell elhelyezkednie, amely rendszerint 2 és 8 között van. Ajánlatos a pufferolás. El kell kerülni a só kicsapódását és az oszlop minőségromlását, amely bizonyos szerves fázis/puffer keverékek esetében következhet be. Általában nem ajánlatos kovasav alapú álló fázisú HPLC-berendezéssel 8-as pH-érték felett méréseket végezni, mivel a lúgos mobil fázis használata gyors romlást okozhat az oszlop teljesítményében.

Oldott anyagok

21. A vizsgált anyagnak és referenciaanyagoknak kellően tisztának kell lenniük ahhoz, hogy a kromatogramon megjelenő csúcsokat hozzá lehessen rendelni a megfelelő anyagokhoz. A vizsgálatra vagy kalibrálásra szánt anyagokat, amennyiben lehetséges, a mozgó fázisban kell feloldani. A vizsgált anyag és a referenciaanyagok feloldásához a mozgó fázistól eltérő oldószer alkalmazása esetén az injektálás előtti végső hígításhoz a mozgó fázist kell használni.

Vizsgálati körülmények

22. A mérések során a hőmérsékletnek nem szabad ± 1 °C-nál nagyobb értékkel változnia.

A t_0 holtidő meghatározása

23. A t_0 holtidőt kromatográffal nem készletetett szerves anyagok (például tiokarbamid vagy formamid) alkalmazásával mérhetjük. Pontosabb holtidőt származtathatunk a mért retenciós időkből vagy egy körülbelül héttagú homológ sorból (például n-alkil-metil-keetonok) (17). A $t_R(n_C + 1)$ retenciós időket a $t_R(n_C)$ függvényében ábrázoljuk, ahol n_C a szénatomok száma. Egy egyenes vonalat kapunk, $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A)t_0$, ahol A, amely a $k(n_C + 1)/k(n_C)$ függvényt képviseli, állandó. A t_0 holtidőt az $(1 - A)t_0$ és az A meredekségének metszéspontjából kapjuk meg.

Regressziós egyenlet

24. A következő lépés a log k és a log P korrelációjának ábrázolása olyan megfelelő referenciaanyagok esetében, amelyek log P értékei a vizsgált anyag esetében várható log P érték közelében helyezkednek el. A gyakorlatban 6–10 referenciaanyagot injektálunk be egyidejűleg. A retenciós időket lehetőleg a detektáló rendszerhez kapcsolt regisztráló integrátoron határozzuk meg. A kapacitástényezők megfelelő logaritmusait (log k) a log P függvényében ábrázoljuk. A regressziós egyenletet rendszeres időközönként, naponta legalább egyszer határozzuk meg, azért, hogy felismerjük az esetleges változásokat az oszlop viselkedésében.

A VIZSGÁLT ANYAG P_{ow} ÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA

25. A vizsgálandó anyagot a legkisebb kimutatható mennyiségben fecskendezzük be. A retenciós időt kétszer határozzuk meg. A vizsgálandó anyag megoszlási hányadosa a számított kapacitástényezőnek a kalibrációs görbén történő interpolációjával kapható meg. Nagyon kicsi és nagyon nagy megoszlási hányadosok esetében extrapoláció szükséges. Ilyen esetekben különös figyelmet kell fordítani a regressziós egyenes konfidenciahatáira. Ha a minta retenciós ideje a standardok esetében kapott retenciós idők tartományán kívül található, határértéket kell megadni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS**Vizsgálati jegyzőkönyv**

26. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:
- ha történt ilyen, a megoszlási hányados előzetes becslését, a becsült értékeket és az alkalmazott módszert; ha számítási módszert alkalmaztunk, annak teljes leírását, beleértve az adatbázis megnevezését és a fragmentumok kiválasztására vonatkozó részletes információkat is,
 - a vizsgált és a referenciaanyagokat: tisztaságukat, szerkezeti képletüket és CAS-számukat,
 - a berendezések és a működési körülmények ismertetését: az analitikai oszlop, valamint a védőoszlop leírását,
 - a mozgó fázist, a detektálásra szolgáló eszközöket, a hőmérsékletet, a pH-t,
 - az elúciós profilokat (kromatogramok),
 - a holtidőt és mérésének módját,
 - a kalibrálás során használt referenciaanyagok regressziós adatait és a szakirodalomban közölt log P_{ow} értékeit,
 - az illesztett regressziós egyenesre vonatkozó részleteket (a log k a log P_{ow} függvényében) és az egyenes korrelációs együtthatóját, beleértve a megbízhatósági intervallumokat is,
 - a vizsgált anyag átlagos retenciós adatait és interpolált log P_{ow} értékét,
 - keverékek esetén: az elúciós profil kromatogramot a jelzett határértékekkel,

- a $\log P_{ow}$ csúcs terület %-ához viszonyított $\log P_{ow}$ értékeket,
- a regressziós egyenes felhasználásával készített számítást,
- a számított súlyozott átlagos $\log P_{ow}$ értékeket, ha szükséges.

IRODALOM

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

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

Függelék

A P_{ow} számítási módszerei

BEVEZETÉS

1. Ez a függelék rövid bevezetést nyújt a P_{ow} számításába. További információk a tankönyvekben található (1) (2).
2. A P_{ow} számított értékei használhatók:
 - annak eldöntésére, hogy a kísérleti módszerek közül melyik a megfelelő: a lombikrázásos módszer – 2-től 4-ig terjedő $\log P_{ow}$ értékek esetén, illetve a HPLC-módszer 0-tól 6-ig terjedő $\log P_{ow}$ értékek esetén;
 - a HPLC-eljárásokhoz megfelelő vizsgálati körülmények kiválasztásához (például referenciaanyagok, metanol/víz arány);
 - a kísérleti módszerekkel kapott értékek megbízhatóságának ellenőrzésére;
 - becslült érték meghatározásához, azokban az esetekben, amikor a kísérleti módszerek nem alkalmazhatók.

A számítási módszerek alapelve

3. Az itt javasolt számítási módszerek a molekulának olyan elemekre való elméleti lebomlásán alapulnak, amelyekről megbízható $\log P_{ow}$ értékek állnak rendelkezésre. A $\log P_{ow}$ a fragmentumértékek és az intramolekuláris kölcsönhatásokra vonatkozó korrekciós kifejezések összegzésével számítható ki. A fragmentumkonstansok és korrekciós kifejezések jegyzékei rendelkezésre állnak (1) (2) (3) (4) (5) (6). Néhányat közülük rendszeresen frissítenek (3).

A számított értékek megbízhatósága

4. Általánosságban elmondható, hogy a számítási módszerek megbízhatósága a vizsgált anyag összetettségének növekedésével csökken. Kis molekulású és egy vagy két funkciós csoportú, egyszerű molekulák esetében a különböző fragmentálási módszerek eredményei és a mért érték között 0,1–0,3 $\log P_{ow}$ eltérés várható. A hibahatár a használt fragmentumkonstansok megbízhatóságától, az intramolekuláris kölcsönhatások (például hidrogénkötések) felismerhetőségétől és a korrekciós kifejezések helyes használatától függ. Ionizálható vegyületek esetében figyelembe kell venni a töltést és az ionizáció mértékét (10).

A Fujita–Hansch-féle π -módszer

5. Az eredetileg Fujita és munkatársai (7) által bevezetett π hidrofób helyettesítő konstanst a következőképpen definiálták:

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

ahol PhX egy aromás származék, PhH pedig a kiindulási anyag.

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

A π -módszer elsősorban aromás anyagokra alkalmazható. Nagy számú szubsztituens π értéke áll rendelkezésre (4) (5).

A Rekker-féle módszer

6. Rekker-féle módszer szerint (8) a $\log P_{ow}$ érték kiszámítása a következőképpen történik:

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

ahol a_i egy adott fragmentum molekulában való előfordulásának száma és f_i a fragmentum $\log P_{ow}$ értékének növekménye. Az interakciós tényezők egyetlen C_m konstans (egy úgynevezett »mágikus konstans«) egész számú többszöröseként fejezhetők ki. Az f_i és a C_m fragmentumkonstansokat egy 825 anyag 1 054 kísérleti P_{ow} értékét tartalmazó jegyzékből határozták meg többszörös regresszióanalízis segítségével (6) (8). A interakciós tényezők meghatározását a megadott szabályoknak megfelelően kell végezni (6) (8) (9).

A Hansch–Leo-féle módszer

7. A Hansch–Leo-féle módszer (4) szerint a $\log P_{ow}$ érték a következő összefüggésből számítható ki:

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

ahol f_i egy fragmentumkonstans, F_j egy korrekciós kifejezés (faktor), a_i és b_j pedig az ezeknek megfelelő előfordulási gyakoriság. Az atomos és csoportfragmentálási értékek jegyzékét és az F_j korrekciós kifejezések jegyzékét kísérleti P_{ow} értékekből határozták meg a fokozatos megközelítés módszerével. A korrekciós kifejezéseket több különböző osztályba sorolták be (1) (4). Olyan speciális szoftvercsomagokat fejlesztettek ki, amelyek az összes szabályt és korrekciós kifejezést figyelembe veszik (3).

ÖSSZETETT MÓDSZER

8. Az összetett molekulák $\log P_{ow}$ értékének számítása lényegesen javítható, ha a molekula olyan nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyek tekintetében rendelkezésre állnak megbízható $\log P_{ow}$ értékek táblázatokból (3) (4) vagy korábban elvégzett mérésekből. Ezek a fragmentumok (például heterociklusok, antrakinon, azobenzol) ezután kombinálhatók a Hansch-féle π értékekkel, vagy a Rekker- vagy Leo-féle fragmentumkonstansokkal.

Megjegyzések

- A számítási módszerek csak a szükséges korrekciós tényezők figyelembevételével alkalmazhatók részben vagy teljesen ionizált anyagok esetében.
- Amennyiben intramolekuláris hidrogénkötések létezése feltételezhető, az eredményhez hozzá kell adni a megfelelő korrekciós kifejezéseket (körülbelül +0,6 és +1,0 közötti $\log P_{ow}$ egység) (1). Az ilyen kötések jelenlétét a molekula sztereomodelljei vagy spektroszkópikus adatai jelezhetik.
- Amennyiben több tautomer alak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell használni számítási alapként.
- A fragmentumkonstansok jegyzékeinek módosításait gondosan figyelemmel kell kísérni.

A SZÁMÍTÁSI ÓDSZEREKKEL KAPCSOLATOS IRODALOM

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

- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
 - (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, *Pharmacochemistry Library*, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
 - (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
 - (10) R.A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).”
3. A C.3. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„C.3. SZAPORODÁSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT, ÉDESvíZI ALGÁK ÉS CIANOBAKTÉRIUMOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában (2006, a melléklet 2011-ben korrigálva) leírt módszerrel. Megállapították, hogy a vizsgálati módszert további fajokra is ki kell terjeszteni és frissíteni kell, hogy eleget tegyen a vegyületekkel szemben támasztott kockázatértékelési és besorolási követelményeknek. A módszer átdolgozása a kiterjedt gyakorlati tapasztalatok, az algákra ható toxicitás vizsgálatának területén végbement tudományos fejlődés és a módszer eredeti elfogadása óta folyamatban lévő széles körű hatósági alkalmazás tapasztalatai alapján történt.
2. Az alkalmazott fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

3. A vizsgálat célja egy adott vegyi anyag által az édesvízi mikroalgákra és/vagy cianobaktériumokra gyakorolt hatás meghatározása. A vizsgált vegyi anyagnak exponenciálisan szaporodó organizmusokat teszünk ki egyszeres (batch) tenyészetekben, szokásosan 72 órán keresztül. A viszonylag rövid vizsgálati időtartam ellenére több generációra kiterjedő hatások vizsgálhatók.
4. A rendszerben fellépő válasz a szaporodás visszaesése a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak kitett algatenyészetekben (kísérleti egységek). A választ a koncentráció függvényében értékeljük, összehasonlítva a szaporodást az párhuzamos, nem kezelt kontrolltenyészetekben észlelt szaporodással. A toxikus hatásra adott válasz teljes kibontához szükséges (optimális érzékenység) a tenyészetek számára – megfelelő tápkörülmények és folyamatos világítás mellett – lehetővé kell tenni a korlátlan exponenciális szaporodást elegendően hosszú ideig ahhoz, hogy mérni lehessen a fajlagos szaporodási sebesség csökkenését.
5. A szaporodás és a szaporodásgátlás mennyiségi meghatározásához az alga élőanyagtömegét mérjük az idő függvényében. Az élőanyag mennyisége definíció szerint száraz tömeg/térfogat, pl. mg alga/liter tápoldat. A száraz tömeg mérése azonban bonyolult, ezért helyettesítő paraméterek használatosak. Ezek közül a sejtszám a leggyakrabban használt paraméter. További helyettesítő paraméterek lehetnek a sejttérfogat, a fluoreszcencia, az optikai sűrűség stb. A mért helyettesítő paraméterek és az élőanyagtömeg közötti átszámítási tényezőt ismerni kell.
6. A kísérlet végpontja a szaporodás gátlása, az élőanyagtömeg expozíciós idő alatti növekedésének logaritmikusaként kifejezve (átlagos fajlagos szaporodási sebesség). A kísérleti oldatsorozattal mért átlagos fajlagos szaporodási sebességekből meg kell határozni azt a koncentrációt, amely a szaporodási sebességet adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt $E_r C_x$ -ként (pl. $E_r C_{50}$) kell kifejezni.
7. Az eljárás másik hatásváltozója a szaporulat, amelyre bizonyos országok esetében a jogszabályi követelmények teljesítéséhez lehet szükség. A szaporulat definíció szerint az expozíciós idő végén és az expozíciós idő kezdetén meglévő élőanyag tömegének különbsége. A vizsgálati oldatok tekintetében egyenként kiszámított szaporulatok alapján meghatározzuk azt az $E_y C_x$ (például $E_y C_{50}$) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

8. Statisztikai eljárással meghatározható továbbá az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. A kísérleti körülmények kialakításához hasznosak lehetnek egyes információk a vizsgált vegyi anyagról, mint pl. szerkezeti képlet, tisztaság, fényérzékenység, stabilitás a kísérleti körülmények között, fényabszorpciós tulajdonságok, pKa és az átalakulási vizsgálatok eredményei, beleértve a biológiai lebonthatóságot vízben.
10. A vízben való oldhatóságot, az oktanol-víz megoszlási hányadost (P_{ow}) és a vizsgált vegyi anyag gőznyomását ismerni kell, valamint rendelkezésre kell állnia egy, a kísérleti oldatban jelen lévő vegyi anyag mennyiségi meghatározására alkalmas validált módszernek, dokumentált visszanyerési hatékonysággal és kimutatási határral.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSEGE

11. A vizsgálat érvényességéhez a következő kritériumoknak kell teljesülniük:
- A kontrolltenyészetekben a élőanyag mennyiségének exponenciálisan kell növekednie, legalább 16-szorosára a 72-órás kísérleti idő alatt. Ez $0,92 \text{ nap}^{-1}$ -es fajlagos szaporodási sebességnek felel meg. A leggyakrabban használt fajoknál a szaporodási sebesség rendszerint jelentősen nagyobb ennél (lásd a 2. függelék). Ez a kritérium az 2. függelékben felsoroltaknál lassabban szaporodó fajok alkalmazása esetében nem feltétlenül teljesül. Ebben az esetben a kísérleti időt meg kell hosszabbítani, hogy legalább 16-szoros szaporodást kapjunk a kontrolltenyészetekben úgy, hogy a szaporodás mindvégig exponenciális maradjon a kísérlet ideje alatt. A kísérlet ideje lerövidíthető (de legalább 48 órának kell lennie), hogy a korlátlan exponenciális szaporodás a kísérlet alatt végig fennálljon, feltéve hogy megmarad a legalább 16-szoros szaporodás.
 - A szakaszonkénti (0–1., 1–2. és 2–3. nap a 72 órás kísérletnél) fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatója a kontrolltenyészeteknél (lásd a »variációs együttható«-t az 1. függelékben) nem haladhatja meg a 35 %-ot. A szakaszonkénti fajlagos szaporodási sebesség kiszámítására vonatkozóan lásd a 49. pontot. Ez a kritérium a kontroll ismétlésekre számított variációs együttható átlagértékére vonatkozik.
 - Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség variációs együtthatója a kísérleti idő alatt a kontroll ismétlésekben semmikor sem haladhatja meg a 7 %-ot a *Pseudokirchneriella subcapitata* fajjal és *Desmodesmus subspicatus* fajjal folytatott vizsgálatokban. A többi, kevésbé gyakran vizsgált faj esetében ez az érték nem lehet nagyobb 10 %-nál.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. A vizsgálati eljárás referencia-vegyianyag(ok), mint például a nemzetközi körvizsgálatban (1) alkalmazott 3,5-diklór-fenol segítségével ellenőrizhető. A kálium-dikromát szintén használható referencia-vegyianyagként, zöldalgák esetében. Tanácsos legalább kétszer egy évben tesztelni a referencia-vegyianyagot.

A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

13. Ez a vizsgálati módszer legegyszerűbben olyan vízdoldható vegyi anyagokra használható, amelyek a vizsgálati körülmények között valószínűleg a vízben maradnak. Az illékony, erősen adszorbeálódó, színes, vízben rosszul oldódó, esetleg a tápoldatban lévő tápanyagok vagy ásványi anyagok felvételére hatással lévő vegyi anyagok esetében szükség lehet a leírt módszer bizonyos módosítására (pl. zárt rendszer, a vizsgálatához használt edények kondicionálása). Néhány megfelelő módosításhoz útmutatás található a (2), (3) és (4) szakirodalmi hivatkozásban.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

14. A vizsgálatához használt edények és minden más, a vizsgálati oldatokkal közvetlenül érintkező más felszerelések üvegből vagy más, kémiaiilag közömbös anyagból készüljenek. Alaposan át kell mosni őket, biztosítandó, hogy szerves vagy szervetlen szennyezések ne befolyásolhassák az algák szaporodását, vagy a tápoldat összetételét.

15. A vizsgálathoz használt edények általában olyan méretű üveglombikok legyenek, amelyek a vizsgálat során végzett mérésekhez képesek megfelelő térfogatú tenyészetet befogadni, és biztosítják a kívánt mértékű CO₂-átadást a környezeti levegőből (lásd a 30. pontot). Figyelni kell arra, hogy a folyadéktérfogat elegendő legyen az analitikai meghatározások elvégzéséhez (lásd a 37. pontot).
16. Szükséges lehet továbbá néhány vagy az összes az alábbi eszközök közül:
- Tenyésztőberendezés: tenyésztőszekrény vagy -fülke ajánlott, amelyekben a választott inkubációs hőmérsékletet ± 2 °C pontossággal tartható.
 - Fénymérő berendezés: fontos megjegyezni, hogy a fényerő mérési módszere, és főleg az érzékelő (kollektor) típusa hatással lehet a mért értékre. A mérésekhez gömb alakú (4 π) érzékelő (amely a mérési sík alatti és feletti bármely szögből érkező közvetlen és visszavert fényre reagál), vagy félgömb alakú (2 π) érzékelő (amely a mérési sík feletti bármely szögből érkező fényre reagál) használata preferált.
 - Az alga élőanyag-tömegének meghatározására alkalmas berendezés. Az sejtszámlálás, amely az alga élőanyag-tömeg mérésére leggyakrabban használt helyettesítő módszer, elvégezhető elektronikus részecske-számláló, számlálókamrával ellátott mikroszkóp, vagy áramlásos citométer segítségével. Más helyettesítő paraméterek mérhetők áramlásos citométerrel, fluoriméterrel, spektrofotométerrel vagy koloriméterrel. Célszerű kiszámítani a sejtszám és a száraz tömeg közötti átszámítási tényezőt. Spektrofotométer használata esetén szükséges lehet legalább 4 cm fényúttal rendelkező küveták használatára, hogy a módszer kis élőanyag-koncentrációknál is használható méréseket szolgáltasson.

A vizsgálathoz használt organizmusok

17. A nem kitapadó mikroalgák és cianobaktériumok több faja használható. A 2. függelékben felsorolt törzsekről már bizonyították, hogy megfelelően használhatók ennek a vizsgálati módszernek az eljárásai során.
18. Más faj használata esetén a törzset és/vagy az eredetet dokumentálni kell. Igazolni kell, hogy a vizsgálathoz kiválasztott alga exponenciális szaporodása a kísérlet ideje alatt mindvégig fennmarad az adott körülmények között.

Táplódat

19. Két választható táplódat, az OECD-táplódat és az AAP-táplódat ajánlott. Ezeknek a táplódatoknak az összetétele a 3. függelékben látható. Figyelembe kell venni, hogy a két táplódat kiindulási pH-értéke és pufferkapacitása (a pH-növekedés szabályozása) eltérő. Ennek megfelelően az alkalmazott táplódatától függően a vizsgálati eredmények különbözőek lehetnek, kiváltképp ionizáló vegyi anyagok vizsgálata során.
20. Bizonyos célokhoz (pl. fémek és kelátképző szerek vizsgálatakor, vagy ha a kísérlet különböző pH-értékeken történik) a táplódat módosítására lehet szükség. A módosított táplódat használatát részletesen ismertetni és indokolni kell (3)(4).

Kiindulási élőanyag-koncentráció

21. A kiindulási élőanyagnak minden vizsgált tenyészetben ugyanannyinak és megfelelően kevésnek kell lennie, hogy exponenciálisan növekedhessen végig az expozíciós idő alatt, a tápanyagok elfogyásának veszélye nélkül. A kiindulási élőanyag mennyisége nem lépheti túl a 0,5 mg száraz tömeg/l értéket. Az alábbi kiindulási sejtkoncentrációk ajánlottak:

Pseudokirchneriella subcapitata: 5 x 10³ – 10⁴ sejt/ml

Desmodesmus subspicatus 2–5 x 10³ sejt/ml

Navicula pelliculosa 10⁴ sejt/ml

Anabaena flos-aquae 10⁴ sejt/ml

Synechococcus leopoliensis 5 x 10⁴ – 10⁵ sejt/ml

A vizsgált vegyi anyag koncentrációi

22. Az a koncentrációtartomány, amelyben a hatások valószínűleg fellépnek, koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatok eredményei alapján állapítható meg. A végleges meghatározó vizsgálatához legalább öt, egy 3,2-nél nem nagyobb kvóciensű mértani sorozat szerinti koncentrációt kell kiválasztani. Olyan vegyi anyagok esetében, ahol a koncentráció-válasz görbe lapos, nagyobb kvóciens használata lehet indokolt. A koncentrációsorozatnak lehetőleg az algaszaporodási sebesség 5–75 %-os gátlását okozó tartományt kell lefednie.

Ismétlések és kontrolltenyészetek

23. A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy minden vizsgált koncentrációra három ismétlést tartalmazzon. Ha az NOEC meghatározása nem követelmény, a vizsgálat ettől eltérő lehet úgy, hogy a koncentrációk száma nagyobb lesz, az egy koncentrációhoz tartozó ismétlések száma pedig kisebb. A kontroll ismétlések számának legalább háromnak kell lennie, és ideálisan kétszer annyinak, mint az egyes vizsgált koncentrációkhoz tartozó ismétlések száma.
24. Külön oldatsorozatot lehet készíteni a vizsgált vegyi anyag koncentrációinak analitikai meghatározásához (lásd a 36. és 38. pontot).
25. Ha a vizsgált vegyi anyag oldhatóvá tételéhez oldószert kell használni, akkor a vizsgálatnak további kontrolltenyészeteket is tartalmaznia kell, amelyekben az oldószerek ugyanabban a koncentrációban kell jelen lennie, mint a vizsgált tenyészetekben.

Az oltótenyészet elkészítése

26. A tápoldattal 2–4 nappal a kísérlet kezdete előtt oltótenyészetet kell készíteni, hogy a vizsgált algák hozzászokjanak a kísérleti körülményekhez, és hogy exponenciális szaporodási fázisban legyenek a kísérleti oldatok beoltásakor. Az alga élőanyag-mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a kísérlet kezdetéig az exponenciális szaporodás érvényesüljön az oltótenyészetben. Az oltótenyészetet a kísérleti tenyészetekkel megegyező körülmények között kell inkubálni. Mélni kell az élőanyag mennyiségének növekedését az oltótenyészetben, ellenőrizendő, hogy a vizsgált törzsnek az adott tenyésztési körülmények közötti szaporodása a megfelelő tartományon belül marad-e. Az algatenyésztési eljárás egy példája a 4. függelékben található. Elkerülendő a kísérlet alatt az egyidejű sejtosztódást, szükség lehet esetleg az oltótenyészet egy második szaporítási lépésére is.

A kísérleti oldatok elkészítése

27. Minden kísérleti oldatnak azonos koncentrációban kell tartalmaznia a tápoldatot és a vizsgált algák kiindulási élőanyag-tömegét. A kiválasztott koncentrációjú kísérleti oldatokat rendszerint a vizsgált vegyi anyag törzsoldatának, a tápoldatnak és az oltótenyészetnek az összekeverésével kell előállítani. A törzsoldatokat általában a vizsgált vegyi anyagnak a kísérleti oldattal való feloldásával kell elkészíteni.
28. Oldószerek (pl. acetone, tercier butilalkohol és dimetil-formamid) használhatók hordozóanyagként a vízben rosszul oldódó vegyi anyagoknak a kísérleti oldatba juttatásához (2)(3). Az oldószerek-koncentráció nem haladhatja meg a 100 µl/l-t, és az oldószert a kísérletsorozatban használt minden tenyészethez (beleértve a kontrolltenyészeteket is) azonos koncentrációban hozzá kell adni.

Inkubáció

29. A kísérleti lombikokat légáteresztő dugóval kell lezárni. A lombikokat rázás után a tenyésztőberendezésbe kell helyezni. A kísérlet folyamán az algáknak lebegniük kell, és elő kell segíteni a CO₂-átadást. Ebből a célból folyamatos rázást vagy keverést kell alkalmazni. A tenyészeteket 21 és 24 °C közötti hőmérséklet-tartományban kell tartani ± 2 °C eltérésen belül szabályozva. Az 2. függelékben nem szereplő fajok, pl. a trópusi fajok esetében magasabb hőmérséklet lehet megfelelő, feltéve hogy az érvényességi kritériumok teljesülnek. Ajánlott a lombikok véletlenszerű elrendezése majd naponkénti áthelyezése az inkubátorban.
30. A vizsgálat során a kontrolltenyészet tápoldatának pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Fémek, és a kísérlet pH-ja körüli értéken részlegesen disszociáló vegyi anyagok esetében szükséges lehet a pH-eltolódás korlátozása a reprodukálható és jól definiált eredmények érdekében. A 0,5 pH-egységnél kisebb eltolódás biztosítása technikailag kivitelezhető és a környezeti levegőből az oldatba történő CO₂-bevitel megfelelő sebességének biztosításával, például a rázás intenzitásának növelésével lehet megvalósítani. Másik lehetőség a CO₂-igény csökkentése a kiindulási élőanyag mennyiségének vagy a kísérlet időtartamának csökkentésével.

31. A felületnek, ahol a tenyészetek inkubálása történik, folytonos egyenletes fluoreszcens megvilágítást (pl. »hideg-fehér« vagy »nappali« fény) kell kapnia. Az alga- és cianobaktériumtörzsek fényigénye eltérő. A fényerőt úgy kell megválasztani, hogy az megfeleljen a vizsgált organizmusnak. A javasolt zöldalga-fajokra a kísérleti oldatok szintjén a fényerőt a $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ tartományból kell kiválasztani, a megfelelő érzékelővel a fotoszintetikusan hatékony, $400\text{--}700 \text{ nm}$ -es hullámhossz-tartományban mérve. Néhány faj, főként az *Anabaena flos-aquae* jól növekszik kisebb fényerő mellett, és a nagyobb fényerő károsíthatja. Ezekre a fajokra a $40\text{--}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ tartományba eső átlagos fényerőt kell választani. (A luxban kalibrált fénymérő berendezéseknél a hideg fehér fényre megadott $4\ 440\text{--}8\ 880 \text{ lux}$ tartomány felel meg az ajánlott $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ -es fényerőnek). Az inkubációs területen az átlagos fényerő $\pm 15\%$ -ának megfelelő fényerőt kell fenntartani.

A vizsgálat időtartama

32. A kísérlet hossza szokásos esetben 72 óra. Használható azonban rövidebb vagy hosszabb kísérleti időtartam is, feltéve, hogy a 11. pontban előírt összes érvényességi kritérium teljesül.

Mérések és analitikai vizsgálatok

33. Az alga élőanyag-mennyiségét a kísérlet ideje alatt minden lombikban legalább naponta meg kell határozni. Ha a mérések a kísérleti oldatból pipettával vett kis térfogatú mintákkal történnek, ezeket a mintákat nem kell visszajuttatni a lombikba.
34. Az élőanyag mennyiségének mérése mikroszkópos manuális sejtszámlálással vagy elektronikus részecskeszámlálással (sejtszámlálás és/vagy élőanyag térfogata) történik. Alternatív eljárások, pl. áramlásos citometria, *in vitro* vagy *in vivo* klorofillfluoreszcencia (5)(6), vagy az optikai sűrűség mérése is használható, ha igazolni lehet az élőanyag-tömeggel fennálló kielégítő korrelációt az élőanyag-tömegnek a kísérletben előforduló tartományában.
35. Az oldatok pH-ját a kísérlet kezdetén és végén meg kell mérni.
36. Amennyiben az alkalmazott koncentrációtartományban a vizsgált vegyi anyag meghatározásához rendelkezésre áll analitikai módszer, akkor a kísérleti oldatokat elemezni kell a kiindulási koncentrációk ellenőrzése, illetve annak ellenőrzése céljából, hogy a kísérletben használandó koncentrációk mindvégig fennállnak-e a kísérlet során.
37. Elegendő lehet a vizsgált vegyi anyag egy alsó és felső koncentráció-határértékének, valamint a várható EC_{50} érték körüli koncentrációjának a mérése a kísérlet kezdetén és végén, ha valószínű, hogy a kísérlet során a koncentráció kevesebb mint 20% -kal tér el a névleges értéktől. Ha nem valószínű, hogy a koncentrációk a névleges érték $80\text{--}120\%$ -án belül maradnak, ajánlott az összes kísérleti koncentráció mérése a kísérlet kezdetén és végén. Illékony, instabil és erősen adszorbeálódó vegyi anyagoknál további mintavétel ajánlott 24 óránként végzendő elemzéshez a kísérlet folyamán mindvégig, hogy az anyagvesztés még jobban meghatározható legyen. Ilyen vegyi anyagoknál további ismétlésekre lehet szükség. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározását minden esetben elegendő csak egyetlen ismétlés lombikjából elvégezni az egyes kísérleti koncentrációkra (vagy a lombikok ismétlésenként egyesített tartalmán).
38. A kifejezetten a vizsgálat folyamán előálló kísérleti koncentrációk méréséhez készített oldatokat a kísérlethez használtakkal megegyező módon kell kezelni, azaz ezeket is be kell oltatni algával és a kísérleti körülményekkel azonos körülmények között inkubálni kell. Ha az oldott vegyi anyag koncentrációját kell mérni, szükséges lehet az algák eltávolítása az oldatból. Az elválasztást lehetőleg az algák kiülepedéséhez elegendő, de kis fordulatszámú centrifugálással kell végezni.
39. Ha kimutatható, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálat időtartama alatt sikerült a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció $\pm 20\%$ -os környezetében tartani, akkor az eredmények a névleges vagy mért kezdeti értékek alapján elemezhetők. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés nem maradt belül a $\pm 20\%$ tartományon, akkor az eredményeket a kísérlet alatti koncentrációk mértani átlaga, vagy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (3)(7).
40. Az algaszaporodás gátlásának vizsgálata dinamikusabb vizsgálati rendszer, mint a legtöbb hasonló, a vízi toxicitást mérő rövid időtartamú vizsgálat. Ennek következtében a tényleges kísérleti koncentrációkat esetleg

nehezen lehet meghatározni, főleg kis koncentrációk esetén, és ha a vizsgált vegyi anyag abszorbeálódik. Ilyen esetekben az, ha a vizsgált vegyi anyag a növekvő élőanyagban való adszorpciója miatti eltűnik az oldatból, nem jelenti azt, hogy eltávozott a vizsgált rendszerből. A kísérlet eredményeinek elemzése során ellenőrizni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a vizsgálat során történő csökkenése együtt jár-e a szaporodás-gátlás csökkenésével. Ha ez a helyzet áll fenn, mérlegelni lehet egy olyan megfelelő modell alkalmazását, amely leírja a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését (7). Ha ez nem áll fenn, akkor az eredmények elemzését megfelelő lehet a kiindulási (névleges vagy mért) koncentrációkra alapozni.

Egyéb észrevételek

41. Az oltótenyészet normális és egészséges fenotípusának ellenőrzésére, illetve a kísérlet végén az algák esetleges abnormalis fenotípusának (ami lehet a vizsgált vegyi anyag hatása) megállapítására mikroszkópos vizsgálatokat célszerű végezni.

Határérték-vizsgálat

42. Bizonyos körülmények között, például amikor egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs toxikus hatása 100 mg/l koncentrációig, vagy a kísérleti oldatban való oldhatósága határáig (amelyik a kettő közül kisebb), határérték-vizsgálat végezhető, amely egy kontrollcsoport és egy kezelt csoport (100 mg/l-es vagy az oldhatósági határral megegyező koncentrációval) szaporodási viselkedésének összehasonlítását jelenti. A vizsgálat során fokozottan ajánlatos elemezni az expozíció koncentrációját. A határérték-vizsgálatra érvényes az összes korábban leírt kísérleti körülmény és érvényességi kritérium, kivéve, hogy a kezelt ismétlések számának legalább hatnak kell lennie. A kontroll- és a kezelt csoport hatásváltozóit az átlagok összevetésére használható statisztikai analízissel (pl. Student-féle t-próba) lehet elemezni. Ha a két csoport szórásnégyzetei nem egyenlők, akkor egyenlőtlen szórásnégyzetekre korrigált t-próbát kell végezni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

A szaporodási görbék szerkesztése

43. A kísérleti lombikokban lévő élőanyag mennyiségét ki lehet fejezni a mérésre használt helyettesítő paraméter (pl. sejtszám, fluoreszcencia) mértékegységében is.
44. Táblázatba kell foglalni a vizsgált tenyészetekben és a kontrolltenyészetekben a becsült élőanyag-koncentrációkat, a vizsgált anyag koncentrációival és a legalább egész órákra kerekített mérési időpontokkal együtt, és ezek alapján kell megszerkeszteni a szaporodási görbéket. Ebben az első szakaszban használható akár logaritmikus, akár lineáris skála, a logaritmikus skála azonban kötelező, és általában jobban megjeleníti a kísérleti időszak alatt a szaporodási viselkedésben bekövetkező eltéréseket. Megjegyzendő, hogy logaritmikus ábrázolás esetén az exponenciális szaporodás egyenes vonalat ad, és a vonal meredeksége adja meg a fajlagos szaporodási sebességet.
45. A görbék segítségével meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészetek a vizsgálat során mindvégig exponenciálisan szaporodtak-e, a várt sebességgel. Kritikusan meg kell vizsgálni minden adatpontot és a görbék lefutását, valamint ellenőrizni kell az adatsorokat és eljárásokat a lehetséges hibák tekintetében. Főleg azokat az adatok igényelnek ellenőrzést, melyeknél az eltérés valószínűleg szisztematikus hibából ered. Ha nyilvánvaló, hogy eljárási hiba történt, illetve ennek nagy a valószínűsége, akkor az adott adatpontot érvénytelenként meg kell jelölni, és ki kell zárni a további statisztikai elemzésből. (Ha a két vagy három ismétlésből az egyik lombik algakonzentrációja nulla, az azt jelezheti, hogy a lombik nem megfelelően lett beoltva, vagy megtisztítva). Az érvénytelenként elvetett adatpontoknál az elvetést egyértelműen indokolni kell a mérési jegyzőkönyvben. Csak eljárási hiba (ritka) lehet elfogadható indok, egyszerű pontatlanság nem. Az érvénytelen adatpontok azonosítására szolgáló statisztikai módszerek csak korlátozottan használhatóak az ilyen típusú problémákra, és nem helyettesítik a szakértői megítélést. Az érvénytelen adatpontokat (ilyenként megjelölve) célszerű megtartani az adatpontok között, feltüntetve azokat a későbbi grafikus vagy táblázatos megjelenítések során.

Hatásváltozók

46. A vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag által az alga szaporodására gyakorolt hatás meghatározása. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót tartalmaz, mert a különböző jogrendszerek preferenciái és szabályozási igényei eltérőek. Hogy a vizsgálati eredmények valamennyi jogrendszerben elfogadhatók legyenek, a hatást mindkét alábbi hatásváltozó alapján meg kell határozni.
 - a) Átlagos fajlagos szaporodási sebesség: ez a hatásváltozó az élőanyag tömegének a kísérlet alatt bekövetkező logaritmikus növekedése alapján számítható, egy napra vetítve.
 - b) Szaporulat: ez a hatásváltozó a kísérlet végén mérhető élőanyag-tömeg mínusz a kiindulási élőanyag-tömeg.

47. Megjegyzendő, hogy a két hatásváltozó alapján számított toxicitásértékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. A jelen vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_xC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a szaporulaton alapuló EC_x értékek (E_xC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent. Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség koncepciója az algák korlátozás nélküli tenyészetekben történő általános exponenciális szaporodási sémáján alapszik, ahol a toxicitás mértéke a szaporodási sebességre gyakorolt hatások alapján becsülhető, függetlenül a kontrolltenyészet fajlagos szaporodási sebességének abszolút értékétől, a koncentráció-válasz görbe meredekségétől, vagy a kísérlet időtartamától. A szaporulatból származtatott eredmények ezzel szemben mindezeketől a változóktól is függenek. Az E_xC_x függ az egyes vizsgálatokban használt algafajok fajlagos szaporodási sebességétől és a legnagyobb fajlagos szaporodási sebességétől, ami a fajok, sőt még különböző algatörzsek között is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem használható az algafajok, de még a különböző törzsek mérgező anyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlítására sem. Bár tudományos szempontból a toxikus hatást indokoltabb az átlagos fajlagos növekedési sebességből meghatározni, ez a vizsgálati módszer a szaporulaton alapuló toxicitásszámítást is tartalmazza, mert egyes országok hatályos jogszabályi követelményei ezt is szükségessé teszik.

Átlagos szaporodási sebesség

48. Az adott időszakra vonatkozó átlagos fajlagos szaporodási sebesség az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre az élőanyag mennyiségének logaritmikus növekedéseként számítható ki a következő egyenletből [1]:

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

ahol:

μ_{i-j} az átlagos fajlagos szaporodási sebesség i-től j időpontig;

X_i az élőanyag mennyisége i időpontban;

X_j az élőanyag mennyisége j időpontban.

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a szaporodási sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

49. Az átlagos fajlagos szaporodási sebességet ki kell számolni a teljes kísérleti időszakra (általában 0–3. nap), kezdeti értéként a névlegesen beoltott élőanyagot, nem pedig a mért kezdeti értéket használva, mert ilyen módon általában nagyobb pontosság érhető el. Ha az élőanyag mérésére használt mérőeszköz lehetővé teszi az oltó élőanyag kis mennyiségének megfelelően pontos meghatározását (pl. áramlásos citométer), akkor használható a mért kezdeti élőanyag-koncentráció. A szakaszonkénti szaporodási sebességet is meg kell állapítani a vizsgálat minden egyes napjára vonatkozóan (0–1., 1–2. és 2–3. nap), ugyanúgy számítva, mint a fajlagos szaporodási sebességet, és meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészet szaporodási sebessége állandó marad-e (lásd az érvényességi kritériumokat a 11. pontban). Az első napon kapott, a teljes átlagos fajlagos szaporodási sebességnél szignifikánsan kisebb fajlagos szaporodási sebesség késési (lag) fázist jelez. Míg a késési (lag) fázis az előtenyészet megfelelő adagolásával minimalizálható és gyakorlatilag kiküszöbölhető a kontrolltenyészetekben, addig a vizsgált anyagnak kitett tenyészetekben a késési (lag) fázis a kezdeti toxicitás-stressz utáni helyreállást, vagy pedig a vizsgált vegyi anyagnak az expozíció elején történő elveszése (beleértve az élőanyagba történő szorpciót) miatti kisebb gátló hatást jelezhet. Ebből következően a szakaszonkénti szaporodási sebesség használható a vizsgált vegyi anyagnak a kísérlet során mutatott hatásainak az értékeléséhez. Ha a szakaszonkénti növekedési sebesség és az átlagos növekedési sebesség között nagy különbséget tapasztalunk, az azt jelenti, hogy a növekedés mintája erősen eltér az állandó kitevőjű exponenciális növekedéstől és különösen ajánlott a növekedési görbék részletes vizsgálata.

50. A szaporodási sebesség százalékos gátlása az egyes kezelt ismétlésekre vonatkozóan az alábbi egyenletből számítható ki [2]:

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

ahol:

$\%I_r$ = az átlagos szaporodási sebesség százalékos gátlása;

μ_c = az átlagos szaporodási sebesség átlaga (μ) a kontrollcsoportban;

μ_T = az átlagos szaporodási sebesség a kezelt ismétlésben.

51. Ha a kísérleti oldatok oldószer felhasználásával készülnek, oldószer nélküli kontrolltenyészetek helyett oldószeres kontrolltenyészeteket kell használni a százalékos gátlás számításakor.

Szaporulat

52. A szaporulatot az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre úgy kell kiszámítani, hogy a kísérlet végén mért élőanyagtömegeből kivonjuk a kiindulási élőanyagtömeget. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén kiszámítjuk a szaporulat középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Az egyes kezelt ismétlések vonatkozásában a szaporulatra vonatkozó százalékos gátlás ($\% I_y$) az alábbiak szerint számítható ki:

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

ahol:

$\% I_y$ = a százalékos szaporulatgátlás;

Y_c = a szaporulat átlaga a kontrollcsoportban;

Y_T = a szaporulat értéke a kezelt ismétlésekben.

A koncentráció-válasz görbe szerkesztése

53. A százalékos szaporodás-gátlást ábrázolni kell a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának (logaritmus) függvényében, és alaposan meg kell vizsgálni a görbét, figyelmen kívül hagyva azokat az adatpontokat, amelyek az első szakaszban érvénytelenként lettek megjelölve. Egy egyenest kell illeszteni az adatpontokra kézzel vagy számítógépes interpolációval, ami első benyomást ad a koncentráció és a válasz összefüggéseiről, majd ezután kifinomultabb módszert, lehetőleg számítógépes statisztikai módszert kell használni. Az adatok tervezett felhasználásának, minőségének (pontosságának) és mennyiségének, valamint a rendelkezésre álló adatelemző eszközök függvényében lehet úgy dönteni (és néha jól meg lehet indokolni), hogy ezen a szinten befejeződik az adatelemzés és a meghatározó értékek, azaz az EC_{50} és az EC_{10} (és/vagy EC_{20}) egyszerűen leolvashatók a kézzel illesztett görbéről (lásd még alább a stimulációs hatásokról szóló pontot). A következők indokolhatják a statisztikai módszer mellőzését:

- Az adatok nem megfelelőek ahhoz, hogy számítógépes módszerrel további, még megbízhatóbb eredmény szülessen, mint a szakértői megítéléssel – ilyen esetekben néhány számítógépes program nem is képes megbízható megoldást adni (az iteráció nem konvergál stb.).
- A stimulációs szaporodási viselkedés nem kezelhető pontosan a rendelkezésre álló számítógépes programokkal (lásd alább).

Statisztikai eljárások

54. A statisztikai számítások célja, hogy regressziószámítással kvantitatív koncentráció-válasz összefüggést állítsunk elő. Lehetőség van arra, hogy a hatástartatok – például probit-, logit- vagy Weibull-modell (8) szerinti – lineáris transzformálását követően súlyozott lineáris regressziót végezzünk, de előnyösebb inkább nemlineáris regressziót alkalmazni, mert ez jobban kezeli az adatok elkerülhetetlen irregularitását és a sima eloszlástól való eltérést. A nulla és a teljes gátlás környezetében az irregularitást a transzformáció felnagyíthatja, ami a számítás szempontjából előnytelen (8). Meg kell jegyezni, hogy a transzformációval kapott probit, logit vagy Weibull egységeket használó szabványos elemzési módszerek kvantált adatok (pl. halálozás vagy túlélés) használatára vannak tervezve, és a szaporodási adatokkal vagy az élőnyagra vonatkozó adatokkal való alkalmazásukhoz módosítani kell őket. Az EC_x -értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszereket a (9), (10) és (11) irodalom ismerteti. A nem lineáris regresszió használatáról a 5. függelékben található részletesebb információ.

55. Az EC_x értékek pontbecsléseinek kiszámításához a koncentráció-válasz összefüggést kell használni minden elemzendő hatásváltozóra. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásadatok regressziós modellhez illeszkedésének jószágát grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regressziószámítást az egyes vizsgálati edényeken nyert értékekkel, nem pedig a vizsgálati csoportok középértékével kell elvégezni. Ha azonban a nem lineáris görbeillesztés bonyolult vagy nem sikerül az adatok túl nagy szórása miatt, a problémát meg lehet kerülni a csoportátlagok regresszióanalízisével, ami egy gyakorlati mód a feltehető érvénytelen adatpontok hatásának csökkentésére. Ennek a lehetőségnek a használatát a szokásos eljárástól való eltérésként fel kell tüntetni a mérési jegyzőkönyvben, hivatkozva arra, hogy a görbeillesztések az egyedi ismétléseknél kapott adatokkal nem adtak jó eredményt.
56. Ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem alkalmasak a konkrét adatok elemzésére, az EC_{50} -re vonatkozó becsléseket és a konfidenciahatárokat »bootstrap« technikával együtt alkalmazott lineáris interpolációval (13) is előállíthatjuk.
57. Az LOEC és ennél fogva az NOEC becsléséhez is, illetve a vizsgált vegyi anyag által a szaporodási sebességre gyakorolt hatásnak a becsléséhez szórásnégyzet-elemzési (ANOVA) eljárások segítségével össze kell hasonlítani a kezelt csoport átlagait. Az egyes koncentrációkhoz tartozó középértékeket ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbával a kontrollcsoporton nyert középértékhez hasonlítjuk. A Dunnett- vagy a Williams-féle módszer használható lehet erre a célra (12)(14)(15)(16)(17). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ezt az ellenőrzést grafikusan vagy formális próbával (17) végezhetjük. A Levene- és Bartlett-féle próbák megfelelőek ehhez. Ha a szórásnégyzet homogenitásának követelménye nem teljesül, az néha az adatok logaritmikus transzformációjával korrigálható. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lépésenkénti Jonkheere-trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatást ad a (11) irodalom.
58. Az újabb keletű tudományos eredmények az NOEC-koncepció elhagyásának ajánlásához és az EC_x regresszió alapuló pontbecsléssel történő meghatározásával való helyettesítéséhez vezettek. Ehhez az algavizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10} -et, mind az EC_{20} -at megadni a mérési jegyzőkönyvben.

Szaporodásstimuláció

59. Kis koncentrációk mellett néha szaporodásstimuláció (negatív gátlás) figyelhető meg. Ezt vagy a hormesis (kétfázisú reakció) jelensége (»toxikus anyag által kiváltott stimuláció«), vagy a vizsgált anyaggal együtt az alkalmazott ásványi sókat tartalmazó tápoldatba került szaporodáserkentő tényezők okozhatják. Megjegyzendő, hogy a szerves tápanyagok hozzáadásának nem lehet semmilyen közvetlen hatása, mert a kísérleti oldatnak a kísérlet folyamán végig feleslegben kell tartalmaznia a tápanyagot. Kis dózisu stimuláció gyakran figyelmen kívül hagyható az EC_{50} kiszámítása során, hacsak mértéke nem rendkívül nagy. Ha azonban rendkívül nagy mértékű, vagy pedig kis x értékre kell EC_x -et számítani, akkor speciális eljárásokra lehet szükség. Lehetőség szerint kerülni kell a stimulációs hatások törlését az adatelemzésből, és ha a rendelkezésre álló görbeillesztő szoftver nem képes kezelni a kisebb mértékű stimulációkat, akkor visszatevéses mintavétellel (»bootstrap« módszer) együtt alkalmazott lineáris interpoláció használható. Ha a stimuláció rendkívül nagy, akkor mérlegelni lehet hormesis-modell alkalmazását (18).

Nem toxikus növekedésgátlás

60. A fényt abszorbeáló anyagok a szaporodási sebesség csökkenését okozhatják, hiszen az árnyékolás csökkenti a kapott fény mennyiségét. Az ilyen jellegű fizikai hatásokat a kísérleti körülmények módosításával el kell választani a toxikus hatásoktól, és az előbbi külön kell dokumentálni. Útmutatás a (2) és (3) szakirodalmi hivatkozásban található.

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

61. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- fizikai jelleg és a vonatkozó fizikai és kémiai tulajdonságok, beleértve a vízzoldhatósági határértéket is,
- kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság (szennyeződések).

A vizsgálathoz felhasznált faj:

- a törzs, a szállító vagy az eredet, és az alkalmazott tenyésztési körülmények.

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama;
- a kísérlet kivitelezésének leírása: kísérleti eszközök, a tenyészetek mennyisége, az élőanyag sűrűsége a vizsgálat kezdetén;
- a tápoldat összetétele;
- kísérleti koncentrációk és ismétlések (pl. ismétlések száma, kísérleti koncentrációk száma és az alkalmazott mértani sor);
- a kísérleti oldatok készítésének leírása, beleértve az oldószerek használatát stb.
- tenyésztőkészülék;
- fényerő és -minőség (fényforrás, homogenitás);
- hőmérséklet;
- kísérleti koncentrációk: a névleges kísérleti koncentrációk és a lombikokban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására szolgáló analízisek eredménye. A vizsgálati mátrixra vonatkozóan a mérési jegyzőkönyvben fel kell tüntetni a módszer visszanyerési hatékonyságát és a mennyiségi meghatározás határértékét;
- minden eltérés ettől a vizsgálati módszertől;
- az élőanyag tömegének meghatározási módszere, valamint a mért paraméter és a száraz tömeg közötti korreláció bizonyítéka;

Eredmények:

- pH-értékek minden kezelés kezdetén és végén;
- az élőanyag tömege minden lombikban és minden mérési pontban, valamint az élőanyag mérésének módszere;
- szaporodási görbék (az élőanyag mennyiségének ábrázolása az idő függvényében);
- hatásváltozók számított értéke minden kezelt ismétlésre, továbbá az ismétlések középértéke és szórásnégyzete;
- a koncentráció-válasz összefüggés grafikus ábrázolása;
- toxicitásbecslés a hatásváltozókra, pl. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} és a kapcsolódó konfidenciaintervallumok. Az LOEC és az NOEC, ha ezek kiszámítása megtörtént, és a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;
- ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség);
- a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés;
- bármilyen más észlelt hatás, például az algák morfológiai változása;
- az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

IRODALOM

- (1) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.
- (2) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1998). ISO/DIS 14442 Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (4) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
 - (6) Slovencey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
 - (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
 - (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
 - (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
 - (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
 - (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
 - (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
 - (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
 - (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
 - (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.
 - (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben az alábbi definíciók és rövidítések használatosak:

Élőanyag: egy populációban jelen lévő élő anyag száraz tömege egy adott mennyiségben kifejezve; pl. mg alga/liter vizsgálati oldat. Általában az »élőanyag« tömegként van definiálva, de ebben a vizsgálatban a szó »tömeg/térfogat«-ot jelent. Szintén ebben a vizsgálatban az élőanyag tömege helyett jellemzően sejtszám, fluoreszcencia stb. mérése történik, és az »élőanyag« kifejezés használata így ezekre a helyettesítő mérőszámokra is utal.

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Variációs együttható (CV): egy paraméter változékonyságának dimenzió nélküli mérőszáma; definíció szerint a szórás és az átlag aránya. Ezt százalékos formában is ki lehet fejezni. A kontroll ismétlésekben az átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját az alábbiak szerint lehet kiszámítani:

1. Ki kell számítani az átlagos fajlagos szaporodási sebesség %-os variációs együtthatóját a naponkénti/szakaszonkénti szaporodási sebességekből a megfelelő ismétlésekre;
2. Ki kell számítani az 1. pontban kiszámított összes érték átlagát, ami megadja a kontroll ismétlésekben a naponkénti/szakaszonkénti átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját.

EC_x: a vizsgálati oldatban oldott vizsgált vegyi anyag olyan koncentrációja, ami meghatározott expozíciós idő alatt (ha eltér a teljes vagy szokásos kísérleti időtartamtól, akkor pontosan meg kell adni) a vizsgált organizmus x %-os (pl. 50 %) szaporodásgátlását eredményezi. Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a szaporulatból nyertük-e, növekedési sebesség esetén »E_C«-t, szaporulat esetén pedig »E_C«-t írunk.

Táporlat: az a teljes mesterséges tenyésztő közeg, amelyben a vizsgált algák a vizsgált vegyi anyag jelenlétében szaporodnak. A vizsgált vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyagtömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontroll-tenyészethez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Hatásváltozó: a toxikus hatás becslésére használt változó, amely különböző számítási módokkal az élőanyag leírására szolgáló bármelyik mért paraméterből levezethető. Ebben a vizsgálati módszerben a hatásváltozók a szaporodási sebesség, illetve a szaporulat, amelyek közvetlenül az élőanyag mérésével, vagy pedig az említett helyettesítő mérőszámok valamelyikének mérésével kaphatók meg.

Fajlagos szaporodási sebesség: egy mérési paraméter (ebben a vizsgálati módszerben az élőanyag mennyiségének változása) természetes alapú logaritmusainak különbségéből és a változáshoz tartozó időtartamból képzett hányadosként definiált hatásváltozó.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Szaporulat: az élőanyag vizsgálat alatti mennyiségi növekedésének a kifejezésére használt mérési változó értéke; az expozíciós idő végén mért változóérték mínusz az expozíciós idő kezdetén mért változóérték.

2. függelék

A vizsgálathoz bizonyítottan alkalmas törzsek**Zöldalgák**

Pseudokirchneriella subcapitata, (régebbi elnevezéssel *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (régebbi elnevezéssel *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kovamoszatok

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cianobaktériumok

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

A törzsek eredete

Az ajánlott törzsek egyfajú algatenyészetként beszerezhetőek az alábbi törzsgyűjteményekből (ábécésrendben):

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

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Egyesült Királyság

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NÉMETORSZÁG

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

A javasolt fajok fenotípusa és jellemzői

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Jellemzők	Hajlott, csavart egyedi sejtek	Ovális, főként egyedi sejtek	Pálcák	Ovális sejtekből álló fonalak	Pálcák
Méret (hossz x szélesség) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Sejttérfogat (µm ³ /sejt)	40 – 60 ⁽¹⁾	60 – 80 ⁽¹⁾	40 – 50 ⁽¹⁾	30 – 40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Sejt száraz tömege (mg/sejt)	2 – 3 × 10 ⁻⁸	3 – 4 × 10 ⁻⁸	3 – 4 × 10 ⁻⁸	1 – 2 × 10 ⁻⁸	2 – 3 × 10 ⁻⁹
Szaporodási sebesség ⁽³⁾ (nap ⁻¹)	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	= 2,0 – 2,4

⁽¹⁾ Elektronikus részecskeszámlálóval mérve

⁽²⁾ A méretből számítva

⁽³⁾ Leggyakrabban tapasztalt szaporodási sebesség OECD-tápadatban kb. 70 µE m⁻² s⁻¹ fényerőnél és 21 °C-on

Egyedi ajánlások a vizsgálathoz ajánlott fajok tenyésztésére és kezelésére***Pseudokirchneriella subcapitata* és *Desmodesmus subspicatus***

Ezeket a zöldalgákat általában könnyű fenntartani különféle tápoldatokban. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. A sejtek általában különállóak, és a sejtsűrűség könnyen mérhető elektronikus részecskeszámlálóval vagy mikroszkóppal.

Anabaena flos-aquae

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. Különösen fontos, hogy megújításkor elkerüljük az egyszeres (batch) tenyészet túlfutását az exponenciális fázison, mert azután már nehéz helyreállítani a tenyészetet.

Az *Anabaena flos-aquae* fonaltepeken fejlődik. Ezek mérete a tenyésztési körülményekkel változik. Mikroszkópos vagy elektronikus részecskeszámlálóval végzett élőanyag-meghatározáshoz fontos lehet ezeknek a telepeknek a szétosztása.

Részminták ultrahangos kezelése használható a láncok szétosztására, hogy csökkenjen a sejtszámlálás változékonysága. A fonalak rövidebb szakaszokra töréséhez szükségesnél hosszabb ultrahangos kezelés roncsolhatja a sejteket. Az ultrahangos kezelés intenzitásának és hosszának minden kezelésnél azonosnak kell lennie.

A változékonyság kompenzálásának elősegítése céljából elegendően nagy számú mezőben kell a számlálást végezni a hemocitóméterben (legalább 400 sejt). Ez növeli a mikroszkópos sűrűségmeghatározás megbízhatóságát.

Elektronikus részecskeszámláló használható az *Anabaena* teljes sejttérfogatának meghatározásához, a sejtfonalak óvatos ultrahangos széttörése után. Az ultrahang energiáját úgy kell beállítani, hogy elkerüljük a sejtek roncsolását.

Örvénykeverő (vortex) segítségével vagy hasonló alkalmas módszerrel biztosítani kell, hogy a lombikok beoltására alkalmazott algaszuszpenzió megfelelően el legyen keverve és homogén legyen.

A lombikokat kb. 150/perc fordulatszámú körpályás, vagy lengőmozgású rázóasztalra kell helyezni. Más megoldásként szakaszosan keverés is használható az *Anabaena* összetapadási hajlamának csökkentésére. Ha összetapadás történik, ügyelni kell arra, hogy az élőanyag-mérésekhez szükséges minták reprezentatívak legyenek. Az összetapadt algák szétválasztásához erőteljes keverés lehet szükséges a mintavétel előtt.

Synechococcus leopoliensis

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ.

A *Synechococcus leopoliensis* különálló pálca alakú sejtek formájában szaporodik. A sejtek nagyon kicsik, ami megnehezíti az élőanyag-meghatározáshoz szükséges mikroszkópos sejt számlálást. Jól használhatók a kb. 1 µm méretű részecskék számlására alkalmas elektronikus részecskeszámlálók. *In vitro* fluorometriai mérések szintén alkalmazhatóak.

Navicula pelliculosa

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. Figyelni kell arra, hogy a tápoldatban lennie kell szilikátnak.

A *Navicula pelliculosa* bizonyos körülmények között telepeket hozhat létre. A lipidtermelés következtében az algasejtek néha hajlamosak rétegekben összegyűlni a felszínen. Ilyen körülmények között az élőanyag mennyiségének meghatározásához leveendő minták esetében speciális intézkedések szükségesek ahhoz, hogy a minták reprezentatívak legyenek. Erőteljes rázás, pl. örvénykeverő használata lehet szükséges.

3. függelék

Tápanyagok

A következő két tápanyag egyike használható:

- OECD-tápanyag: Az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában használt eredeti tápanyag, megfelel az ISO 8692-nek is.
- Az USA Környezetvédelmi Hatóságának (EPA) AAP-tápanyagdata, megfelel az ASTM-nek is.

Ezeknek a tápanyagoknak az elkészítése során laboratóriumi reagenseket vagy analitikai tisztaságú vegyszereket, és ionmentesített vizet kell használni.

Az AAP-tápanyag (USA EPA) és az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában használt tápanyag összetétele.

Összetevő	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 ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Az EDTA-vas mólarány kissé nagyobb 1-nél. Ez megakadályozza a vas kicsapódását, és ugyanakkor a kelátképződés a nehézfém-ionokkal a lehető legkisebb lesz.

A *Navicula pelliculosa* kovamoszattal végzett vizsgálat során mindkét tápoldathoz $\text{Na}_3\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ -t kell adni úgy, hogy a koncentráció 1,4 mg Si/l legyen.

A tápoldat pH-ját akkor kell mérni, amikor egyensúly van az oldat karbonáttartalma és a környezeti levegőben lévő CO_2 parciális nyomása között. Közelítő összefüggés a 25 °C-on mért pH és a moláris bikarbonátkoncentráció között:

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

15 mg NaHCO_3 /l-rel $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (EPA-tápoldat), és 50 mg NaHCO_3 /l-rel $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (OECD-tápoldat).

A kísérleti oldatok elemi összetétele

Elemek	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

Az OECD-tápoldat elkészítése

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban
1. törzsoldat: makrotápanyagok	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
2. törzsoldat: vas	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban
3. törzsoldat: nyomelemek	
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
4. törzsoldat: bikarbonát	
NaHCO ₃	50 g/l
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	

A törzsoldatokat membránszűréssel (átlagos pórusátmérő 0,2 µm) vagy autoklávban (120 °C, 15 perc) sterilizálni kell. Az oldatokat 4 °C-on, sötét helyen kell tárolni.

A 2. és 4. törzsoldatokat nem szabad autoklávban kezelni, hanem membránszűréssel kell őket sterilizálni.

Készítsük el a tápoldatot az 1–4. törzsoldatokból vett megfelelő térfogatok és víz összekeverésével:

Adjunk kb. 500 ml sterilizált vízhez:

10 ml-t az 1. törzsoldatból

1 ml-t az 2. törzsoldatból

1 ml-t az 3. törzsoldatból

1 ml-t az 4. törzsoldatból

Töltsük fel az oldatot 1 000 ml-re sterilizált vízzel.

Várjuk meg, hogy a tápoldat egyensúlyba kerüljön a környezetben lévő CO₂-vel, szükség esetén buborékkoltassunk át az oldaton steril, szűrt levegőt néhány órán keresztül.

Az EPA-tápoldat elkészítése

- Adjunk a 2.1–2.7. pontban felsorolt törzsoldatok mindegyikéből 1-1 ml-t kb. 900 ml ionmentesített vagy desztillált vízhez, majd hígítsuk fel 1 literre.
- A makrotápanyagok törzsoldatainak készítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben. A 2.1., a 2.2., a 2.3. és a 2.4. pontban szereplő reagensek egyesíthetők egy törzsoldatba.

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	Mikrotápanyagok törzsoldata (lásd a 3. pontot).	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	NaHCO_3	7,500 g.
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Lásd az 1. megjegyzést.

1. *megjegyzés:* Csak kovamoszatfajokhoz alkalmazandó. Beadható közvetlenül (202,4 mg) vagy törzsoldat formájában úgy, hogy 20 mg/l Si legyen a tápoldatban a végkoncentráció.

3. A mikrotápanyagok törzsoldatának elkészítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.
3.2	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,690 mg.
3.3	ZnCl_2	1,635 mg.
3.4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,880 mg.
3.5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg.
3.6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,630 mg.
3.7	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg.
3.8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000 mg. [Dinátrium-(etiléndinitrilo)tetraacetát].
3.9	$\text{Na}_2\text{SiO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg Lásd a 2. megjegyzést.

2. *megjegyzés:* Csak kovamoszatfajok törzstenyészetének tápoldatában alkalmazandó.

4. Állítsa be a pH-t $7,5 \pm 0,1$ értékre 0,1 N vagy 1,0 N NaOH-dal vagy HCl-dal.

5. Szűrje a tápközeget steril edénybe, vagy 0,22 μm -os membránszűrőn, ha részecskeszámlálót használ, vagy 0,45 μm -os szűrőn, ha nem részecskeszámlálót használ.

6. Felhasználásig tárolja a tápoldatot sötét helyen, kb. 4 °C-on.

4. függelék

Példa algatenyésztési eljárására

Általános megjegyzések

Az alábbiakban ismertetett eljárások alapján végzett tenyésztés célja a toxicitásvizsgálatokhoz használható algatenyészetek létrehozása.

Az algatenyészetek bakteriális fertőződésének elkerülése érdekében megfelelő módszereket kell használni. Tiszta (axenikus) tenyészetek kívánatosak lehetnek, de egyfajú algatenyészeteket kell létrehozni és felhasználni.

Minden beavatkozást steril körülmények között kell végezni, elkerülendő a baktériumokkal, vagy más algákkal történő szennyeződést.

Eszközök és anyagok

Lásd a vizsgálati módszer alatt: Eszközök.

Eljárások algatenyészetek előállításához

Tápanyagok készítése:

A tápanyag minden tápsóját tömény törzsoldatként készítik, és sötét hideg helyen tárolják. Ezeket az oldatokat szűrővel vagy autoklávban sterilizálni kell.

A tápanyag a megfelelő mennyiségű törzsoldat desztillált vízhez való hozzáadásával készül, ügyelve arra, hogy ne történjen befertőződés. Szilárd tápanyaghoz 0,8 % agart kell adni.

Törzstenyészet:

A törzstenyészetek kis algatenyészetek, amelyeket rendszeresen friss tápanyagba kell oltani azért, hogy kezdeti vizsgált anyagként szolgáljanak. Ha nem használják rendszeresen tenyészeteket, akkor azokat ferde agarra kell szélesíteni. E tenyészeteket minden két hónapban legalább egyszer friss médiumba kell oltani.

A törzstenyészeteket a megfelelő tápanyagot tartalmazó kúpos lombikokban (körülbelül 100 ml-es úrtartalommal) kell szaporítani. Amikor az algákat 20 °C hőmérsékleten inkubálják folyamatos megvilágítás mellett, hetenkénti átoltás szükséges.

Az átoltás során bizonyos mennyiségű »régiből« tenyészetet kell átvinni steril pipettákkal egy friss tápanyagoldatot tartalmazó lombikba úgy, hogy a gyorsan növekvő fajták esetében a kezdeti koncentráció körülbelül a régi tenyészetnek a századrésze legyen.

Valamely fajta növekedési rátája a növekedési görbe segítségével határozható meg. Ha ez ismert, meghatározható az a sűrűség, amelynek elérésekor a tenyészetet át kell oltani. Ezt azelőtt kell végrehajtani, mielőtt a tenyészet eléri az elpusztulási fázist.

Előtenyészet:

Az előtenyészetnek megfelelő mennyiségű algát kell termelnie, amiket a vizsgált kultúráknál oltóanyagként lehet alkalmazni. Az előtenyészetet a kísérleti körülmények között inkubáljuk és akkor használjuk fel, amikor még exponenciálisan szaporodó fázisban van, szokásosan 2–4 napos inkubációs időszakot követően. Azon algatenyészeteket, amelyek deformálódtak vagy abnormális sejteket tartalmaznak, ki kell dobni.

5. függelék

Adatelemzés nemlineáris regresszióval

Általános szempontok

Az algaszaporodási és más mikrobiológiai szaporodási vizsgálatokban a válasz – az élőanyag növekedése – természeténél fogva folyamatos, azaz metrikus változó. Folyamatsebesség, ha a szaporodási sebességet használjuk, illetve annak idő szerinti integrálja, ha az élőanyag tömegét választjuk. Mindkettő olyan nem kezelt, kontrollismétlésekben fellépő, megfelelő válasz átlagához van viszonyítva, amelyek maximálisan reagáltak az adott körülményekre – az algás vizsgálatoknál ezek közül meghatározó tényező a fény és a hőmérséklet. A rendszer statisztikai eloszlású, azaz homogén, és az élőanyag kontinuumnak tekinthető, nem pedig önálló sejteknek. Ilyen rendszereknél a jellemző válasz szórásnégyzet-eloszlása kizárólag a kísérleti tényezőktől (amelyeket jellemzően a log/normál vagy a normál hibaeloszlás ír le) függ. Ezzel szemben, a jellemző biológiai kísérletek kvantált adatokkal szolgálnak, amelyeknél az önálló organizmusok túréséről (ami jellemzően binomiális eloszlású) gyakran feltételezik, hogy az a meghatározó komponens a szórásnégyzetben. A kontrollmintában fellépő hatások ekkor nullával, vagy a háttérrel egyenlők.

Egyszerű esetben a normált vagy relatív válasz, r , monoton csökken 1-től (nulla gátlás) 0-ig (100 százalékos gátlás). Megjegyzendő, hogy minden hatással együtt jár egy belső hiba, és hogy a megjelenő negatív gátlások csak véletlen hiba eredményeként számolhatók.

Regressziószámítás

Minták

A regresszióanalízis célja, hogy egy matematikai regressziós függvény – $Y=f(C)$, vagy még gyakrabban $F(Z)$, ahol $Z = \log C$ – formájában mennyiségileg leírja a koncentráció-válasz görbét. A függvény inverze, a $C = f^{-1}(Y)$, segítségével kiszámíthatók az EC^x értékek, köztük az EC_{50} , EC_{10} és EC_{20} , valamint ezekre a 95 %-os megbízhatósághoz tartozó határok. Több egyszerű matematikai függvény bizonyítottan jól leírja az algákkal végzett szaporodásgátlási vizsgálatokban kapott koncentráció-válasz összefüggéseket. Ilyen függvény például a logisztikai egyenlet, az aszimmetrikus Weibull-egyenlet, és a log/normál eloszlási függvény, amelyek mind szigmoid görbék, melyek aszimptotikusan közelítenek 0-hoz, ha $C \rightarrow 0$ -hoz, illetve 1-hez, ha $C \rightarrow$ a végtelenhez.

Újabb ajánlott a folytonos küszöbérték-függvényre alapuló modellek (mint pl. a Kooijman-modell a »populációnövekedés gátlására«, Kooijman és mtsai, 1996) használata, akár az aszimptotikus modellek alternatívájaként. Ez a modell feltételezi, hogy egy adott küszöbérték, EC_0+ , alatt a koncentrációknak nincs hatása, és ennek a küszöbértéknek a meghatározása a koncentráció-válasz görbe egy, a kezdőpontban nem differenciálható egyszerű folyamatos függvény segítségével történő extrapolációjával és a koncentrációtengely metszésével történik.

Megjegyzendő, hogy az analízis lehet a legkisebb négyzetek összegének módszere (állandó szórásnégyzetet feltételezve), vagy a súlyozott legkisebb négyzetek módszere, ha a szórásnégyzet heterogenitása kompenzálva van.

Eljárás

Az eljárás vázlatosan a következő: Választani kell egy megfelelő függvényt, az $Y = f(C) - t$, és nem lineáris regresszióval rá kell illeszteni az adatpontokra. Lehetőség szerint az egyes lombikokból származó méréseket használjuk, ne pedig az ismétlések átlagait, hogy a lehető legtöbb információt nyerjük ki az adatokból. Ha viszont a szórásnégyzet értéke nagy, akkor a gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy az ismétlések átlagai szilárdabb matematikai becslést eredményezhetnek, amelyet csak kevésbé befolyásolnak az adatokban meglévő véletlen hibák, mint a minden egyes megtartott adatpont használata.

Az illesztett görbe és a mért adatok megszerkesztése után meg kell vizsgálni, hogy a görbe illeszkedése megfelelő-e. A különbségek elemzése különösen hasznos eszköz lehet erre a célra. Ha a koncentráció-válasz pontokra való illesztéshez választott függvény nem írja le jól a teljes görbét, vagy annak egy adott, alapvetően fontos részét – mint például a kis koncentrációknál jelentkező hatásokat –, akkor egy másik illesztési megoldást kell választani, a szimmetrikus helyett például aszimmetrikus görbét, mint pl. a Weibull-függvényt. Negatív gátlás esetén probléma lehet például a logaritmus/normál eloszlási függvénnyel, ekkor szintén egy másik regressziófüggvényt kell használni.

Az ilyen negatív értékek nullával vagy kis pozitív számmal történő helyettesítése nem ajánlott, mert torzítja a hibaeloszlást. Célravezetőbb lehet másik illesztést használni az érintett szakaszokra – például arra, ahol a szaporodás-gátlás kismértékű –, egy adott EC_{lowx} érték meghatározása céljából. Az illesztési egyenletből ki kell számítani (inverz számítással, $C = f^{-1}(Y)$) az EC_x jellemző pontértékeit, és a mérési jegyzőkönyvben meg kell adni legalább az EC_{50} -re és egy vagy két EC_{lowx} -re kapott értékeket. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy az algás vizsgálatok pontossága általában elfogadhatóan pontos becslést tesz lehetővé 10 %-os gátlási szinten, ha van elég adatpont – kivéve, ha zavaró tényezőként stimuláció fordul elő kis koncentrációknál. Az EC_{20} -becslés pontossága gyakran lényegesen jobb, mint az EC_{10} -é, mert az EC_{20} rendszerint a koncentráció-válasz görbe középső, közelítőleg lineáris szakaszára esik. A szaporodásstimuláció miatt néha nehéz az EC_{10} -et értelmezni. Összefoglalva, noha az EC_{10} általában kielégítő pontossággal meghatározható, mindig ajánlott az EC_{20} feltüntetése is a mérési jegyzőkönyvben.

Súlyozó tényezők

A tapasztalati szórásnégyzet általában nem állandó, és rendszerint tartalmaz egy proporcionális tagot, ezért előnyös rutinszerűen súlyozott regressziót végezni. Az ilyen analízishez használt súlyozó tényezők általában fordítottan arányosak a szórásnégyzettel:

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

Sok regresszióelemző programban lehetőség van a súlyozott regresszióanalízisre úgy, hogy a súlyozó tényezők egy táblázatban vannak felsorolva. Kényelmi szempontból a súlyozó tényezőket célszerű normálni, megszorozva őket $n/\sum w_i$ -vel (ahol n az adatpontok száma), hogy az összegük egyenlő legyen 1-gyel.

A hatásváltozók normálása

A kontrollmintával kapott hatások átlagával történő normálás elvi problémákat vet fel és meglehetősen bonyolult szórásnégyzet-szerkezethez vezethet. Ha a szaporodás-gátlás százalékos meghatározásához a kapott hatásértékeket elosztjuk a kontrollmintával kapott hatások átlagával, további hibát viszünk be, amit a kontrollminta átlagának hibája okoz. Ha ez a hiba nem elhanyagolhatóan kicsi, akkor a regresszióhoz és a megbízhatósági határokhoz használt súlyozó tényezőket korrigálni kell a kontrollminták kovarianciájával (Draper és Smith, 1981). Megjegyzendő, hogy nagyon fontos a kontrollmintákkal kapott hatásértékek becslt átlagának a pontossága, hogy a lehető legkisebb legyen a relatív válasz általános szórásnégyzete. Ez a szórásnégyzet a következő:

(az i alsó index az i -dik koncentrációkat, a 0 alsó index pedig a kontrollmintákat jelöli)

$$Y_i = \text{Relatív hatás} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C)$$

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

$$\text{és mivel } (\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ and } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

$$\text{normál eloszlású adatoknál és } m_i \text{ és } m_0 \text{ ismétlésekkel: } \text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

a relatív hatás, Y_i , teljes szórásnégyzete így a következő:

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

A kontrollminták átlagának hibája fordítottan arányos az átlagolt kontroll ismétlések számának négyzetgyökével, és néha indokolt lehet régebbi adatok is felhasználni és így nagymértékben csökkenteni a hibát. Más megoldásként mellőzhető az adatok normálása és az illesztést az abszolút hatásértékekre kell elvégezni, beleértve a kontrollminta hatásadatait is, de ekkor újabb paraméterként be kell vezetni a kontrollminta hatásértékét, amelyre nem lineáris regresszióval el kell végezni az illesztést. A szokásos 2-paraméteres regresszióegyenlet esetén ehhez a módszerhez 3 paraméter illesztése szükséges, és így több adatpontot igényel, mint az előre beállított kontrollminta-válasz segítségével normált adatokon végzett nem lineáris regresszió.

Inverz konfidenciaintervallumok

A nem lineáris regresszió konfidenciaintervallumainak inverz becsléssel történő kiszámítása meglehetősen bonyolult és a szokásos statisztikai számítógépes programcsomagokban ez a lehetőség nem is áll rendelkezésre. A körülbelüli megbízhatósági határok megkaphatók szokásos nem lineáris regressziós programmal, a paraméterek megváltoztatásával (Bruce és Versteeg, 1992), ami a matematikai egyenletnek az átírását jelenti a kívánt pontbecslésekkel, pl. az EC_{10} -zel és az EC_{50} -nel mint megbecsülendő paraméterekkel. (Legyen a függvény $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentráció})$ és a definiáló egyenletek, $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ és $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ felhasználásával helyettesítsük be az $f(\alpha, \beta, \text{koncentráció})$ függvényt egy ekvivalens $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentráció})$ függvénnyel.

Közvetlenebb számítás (Andersen és mtsai, 1998) végezhető az eredeti egyenlet megtartásával és az r_i és r_0 átlagok körüli Taylor-sorfejtés felhasználásával.

Újabban a visszatevéses mintavételes (bootstrap) módszerek váltak népszerűvé. Ezek a módszerek mért adatokat, és véletlenszám-generátor által irányított gyakori mintavételt használnak a tapasztalati szórásnégyzet eloszlásának becslésére.

HIVATKOZÁSOK

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

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

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

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

4. A C.11. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„C.11. ELEVENISZAP LÉGZÉSGÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA (SZÉN ÉS AMMÓNIUM OXIDÁCIÓJA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 209. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. Ez a vizsgálati módszer egy olyan módszert ír le, amellyel úgy mutatható ki valamely vegyi anyag hatása az eleveniszapból származó mikroorganizmusok (főként baktériumok) működésére, hogy meghatározott körülmények között a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak jelenlétében méri a légzés sebességét (szén és ammónium oxidációja). A vizsgálati módszer az ETAD (a festékanyag gyártóipar ökológiai és toxikológiai egyesülete) vizsgálatán (1) (2), az OECD korábbi 209. vizsgálati iránymutatásán (3) és a módosított ISO 8192 szabványon (4) alapul. A vizsgálat célja, hogy gyors szűrést tegyen lehetővé a vegyi anyagok azon hatásának értékelésére, amelyet a szennyvízkezelő telepek eleveniszapos biológiai (aerob) szakaszában közreműködő mikroorganizmusokra gyakorolnak. A vizsgálati eredmények a vizsgált vegyi anyagok biológiai lebonthatósági vizsgálatok során használandó megfelelő, nem gátló koncentrációinak indikátoraként is szolgálhatnak (például e melléklet C.4. A–F, C.9., C.10., C.12. és C.29. fejezetei, az OECD 302C. vizsgálati iránymutatása). Ebben az esetben a vizsgálatot – a koncentrációtartomány-meghatározási vagy határérték-vizsgálathoz hasonlóan (lásd a 39. pontot) – szűrővizsgálatként is lehet végezni, kizárólag a teljes légzést figyelembe véve. Ezt az információt azonban óvatosan kell kezelni a gyors biológiai lebonthatósági tesztek esetében (e melléklet C.4. A–F és C.29. fejezetei), amelyeknél az oltóanyag koncentrációja lényegesen alacsonyabb, mint az e vizsgálati módszerben használt koncentráció. Sőt, a gátlásnak az ebben a légzési vizsgálatban megfigyelt hiánya nem jelent automatikusan nem gátló feltételeket az e melléklet C.4. A–F és C.29. fejezetében tárgyalt gyors biológiai lebonthatósági vizsgálatban.

2. Összességében úgy tűnik, hogy a légzésgátlási vizsgálatot első megjelenése óta sikerrel alkalmazzák, de néhány alkalommal hamis eredményeket jelentettek, pl. (2) (4) (5). A koncentrációval összefüggő légzési görbék néha kétfázisúak, a dózis-válasz görbék eltorzultak és az EC_{50} -értékek váratlanul alacsonyak voltak (5). A vizsgálatok azt mutatták, hogy ilyen eredmények akkor adódnak, ha a vizsgálatban használt eleveniszap jelentős mértékben nitrifikál, és a vizsgált vegyi anyag nagyobb hatást gyakorol az ammónium oxidációjára, mint az általános heterotróf oxidációra. Ezért ezeket a hamis eredményeket úgy lehet leküzdeni, ha a nitrifikáció egy specifikus inhibitora segítségével további vizsgálatokat végeznek. Ha az oxigénfelvételi arányokat egy ilyen inhibitor, pl. N-allil-tiokarbamid (ATU) jelenlétében és anélkül mérik, külön kiszámítható a teljes, a heterotróf és a nitrifikációs oxigénfelvételi arány (4) (7) (8). Így meg lehet határozni a vizsgált vegyi anyagok a két folyamatra gyakorolt gátló hatásait, és a szerves szén oxidáció (heterotróf) és az ammónium-oxidáció (nitrifikáció) EC_{50} -értéke a szokásos módon számítható. Meg kell jegyezni, hogy bizonyos ritka esetekben az N-allil-tiokarbamid gátló hatása részlegesen vagy teljesen semlegesíthető a vizsgált vegyi anyagokkal vagy a tápoldat-kiegészítőkkel, pl. Cu^{++} -ionokkal történő komplexképződés eredményeként (6). A Cu^{++} -ionok elengedhetetlenek a *Nitrosomonas* baktériumok esetében, de nagyobb koncentrációban toxikusak.
3. A szennyvíz aerob kezelése során történő nitrifikáció, amely a nitrogénvegyületek szennyvizekből – a gáz halmazállapotú termékek denitrifikációja által – történő eltávolításának egy szükséges lépése, egyre sürgetőbbé vált, különösen az európai országokban; az EU most alacsonyabb határértéket határozott meg a befogadó vizekbe kibocsátott kezelt szennyvizek nitrogénkoncentrációja tekintetében (¹).
4. A legtöbb esetben a szerves szén oxidációs folyamataira gyakorolt hatás értékelésére szolgáló módszer önmagában elegendő. Ugyanakkor bizonyos esetekben kizárólag a nitrifikációra gyakorolt hatás vizsgálatára, vagy külön-külön a nitrifikációra és a szerves szén oxidációjára gyakorolt hatás vizsgálatára van szükség az eredmények értelmezése és a hatások megértése érdekében.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

5. Szintetikus szennyvízzel táplált eleveniszap-minták légzési sebességét mérik egy oxigén-elektrodot tartalmazó zárt cellában, háromórás érintkezési időt követően. A reális expozíciós forgatókönyv mérlegelése alapján hosszabb érintkezési időre lehet szükség. Ha a vizsgált vegyi anyag gyorsan lebomlik, pl. abiotikusan hidrolízis útján, vagy illékony, és a koncentrációját nem lehet megfelelően fenntartani, rövidebb expozíciós időt (pl. 30 perc) lehet használni. Az egyes eleveniszap-sorozatok érzékenységet az expozíció napján megfelelő referenciavegyianyaggal ellenőrizni kell. A vizsgálatot általában a vizsgált vegyi anyag EC_x -értékének (pl. EC_{50}) és/vagy az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációnak (NOEC) a meghatározásához használják.
6. Az oxigénfelvétel mértékének N-allil-tiokarbamid – az ammónium első szintű nitrifikáló baktériumok által nitríté történő oxidációjának specifikus inhibitora – távollétében és jelenlétében történő mérésével a szerves szén oxidáló mikroorganizmusok oxigénfelvételének gátlását az ammóniumot oxidáló mikroorganizmusok oxigénfelvételének gátlásától elkülönítve is ki lehet jelezni. Ebben az esetben az oxigénfelvétel sebességének százalékos gátlását úgy számítják ki, hogy az oxigénfelvételnek a vizsgált vegyi anyag jelenlétében mutatott sebességét a specifikus inhibitor, az N-allil-tiokarbamid jelenlétében és távollétében egyaránt összehasonlítják a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó megfelelő kontrollok átlagos oxigénfelvételi sebességével.
7. Az abiotikus folyamatokból származó oxigénfelvételt úgy lehet kimutatni, hogy a vizsgált vegyi anyagból, szintetikus szennyvíz tápoldatból és vízből álló, eleveniszapot nem tartalmazó keverékben meghatározzák az oxigénfelvételi sebességet.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. A vizsgált vegyi anyag azonosítóját (lehetőleg CAS-számát), nevét (IUPAC), tisztaságát, vízben való oldhatóságát, gőznyomását, illékonyágát és adszorpciós jellemzőit ismerni kell ahhoz, hogy az eredményeket megfelelően értelmezni lehessen. Normális esetben az illékony vegyi anyagokat nem lehet megfelelően vizsgálni, kivéve, ha külön óvintézkedések tesznek (lásd a 21. pontot).

(¹) A Tanács 1991. május 21-i 91/271/EGK irányelve a települési szennyvíz kezeléséről. HL L 135., 1991.5.30., 40–52. o.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

9. A vizsgálati módszer vízben oldható, gyengén oldható és illékony vegyi anyagok esetében alkalmazható. Korlátozott oldhatóságú vegyi anyagok esetében azonban előfordulhat, hogy nem mindig lehet megkapni az EC_{50} -értéket, illékony vegyi anyagok esetében pedig érvényes eredményeket csak akkor lehet kapni, ha a vizsgált vegyi anyag nagyobbik része (mondjuk $> 80\%$) a reakcióelegyben marad az expozíciós periódus(ok) végén. További alátámasztó analitikai adatokat kell benyújtani az EC_x koncentráció pontosítása céljából, ha a vizsgált anyag stabilitását vagy volatilitását bizonytalanság övezi.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

10. A referencia-vegyianyagokat rendszeres időközönként meg kell vizsgálni a vizsgálati módszer és vizsgálati feltételek megbízhatóságának ellenőrzése érdekében, illetve az expozíció napján ellenőrizni kell a mikrobiális oltóanyagként használt eleveniszap egyes tételeinek érzékenységét. A 3,5-diklór-fenol (3,5-DCP) ajánlott referencia gátló vegyi anyagként, mivel a légzés ismert inhibitora és számos gátlási/toxicitási vizsgálatban használják (4). A réz(II)-szulfát-pentahidrát szintén használható a teljes légzés referencia gátló vegyi anyagként (9). Az N-metil-anilin a nitrifikáció specifikus referencia-inhibitoraként használható (4).

ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMOK ÉS REPRODUKÁLHATÓSÁG

11. A vak (vizsgált vegyi anyag vagy referencia-vegyianyag nélküli) kontrollok oxigénfelvételének sebessége nem lehet kevesebb, mint 20 mg oxigén per egy gramm eleveniszap (lebegő szilárd anyagok száraz tömege) óránként. Amennyiben a sebesség alacsonyabb, a vizsgálatot mosott eleveniszappal vagy más forrásból származó iszappal meg kell ismételni. A kontroll ismétlések oxigénfelvételi sebességének variációs együtthatója nem haladhatja meg a 30 %-ot a meghatározó vizsgálat végén.
12. Az ISO által 2004-ben szervezett és háztartási szennyvízből származó eleveniszap felhasználásával végzett nemzetközi körvizsgálatban (4) a 3,5-DCP EC_{50} -értékét a 2–25 mg/l közötti tartományban találták a teljes légzés szempontjából, az 5–40 mg/l tartományban a heterotróf légzés szempontjából, és a 0,1–10 mg/l tartományban a nitrifikációs légzés szempontjából. Ha a 3,5-DCP EC_{50} -értéke nem a várt tartományban helyezkedik el, a vizsgálatot más forrásból származó eleveniszappal meg kell ismételni. A réz(II)-szulfát-pentahidrát EC_{50} -értékének az 53–155 mg/l tartományban kell elhelyezkednie a teljes légzés szempontjából (9).

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és készülékek

13. A szokásos laboratóriumi berendezéseket, illetve a következő eszközöket kell használni:
- Vizsgálati edények – például 1 000 ml-es főzőpoharak az 500 ml reakcióelegy részére (lásd az 5. eszközt az 1. ábrán);
 - Az oldott oxigén koncentrációjának mérésére szolgáló cella és mellékletei; egy megfelelő oxigén-elektrod; egy zárt cella, amely felső üres tér nélkül tartalmazza a mintát, illetve egy érzékelő (pl. a 7., 8. és 9. eszköz a 2. függelék 1. ábráján); alternatív megoldásként egy BOD-palack is használható, amely esetében az oxigén-elektrodot egy alkalmas hüvely adapter rögzíti a palack nyakában (lásd a 3. függelék 2. ábráját). Az oxigén-elektrod beillesztésekor bekövetkező folyadékvesztés elkerülése érdekében célszerű először egy tölcsért vagy üvegcsövet behelyezni a hüvelybe, vagy kifelé hajló peremű edényt használni. Mindkét esetben mágneses keverőt vagy alternatív keverési módszert, pl. önkeverő szondát kell használni;
 - Semleges anyaggal bevont mágneses keverők és követők, amelyek a mérőkamrában és/vagy a vizsgálati edényekben használhatók;
 - Levegőztető berendezés: ha szükséges, sűrített levegőt kell megfelelő szűrőn a por és az olaj eltávolítása, illetve vizet tartalmazó mosó palackokon a levegő nedvesítése érdekében keresztülvezetni. Az edények tartalmát Pasteur-pipettával vagy más, vegyi anyagokat nem adszorbeáló levegőztető eszközzel levegőztetni kell. 150–250 rpm sebességgel üzemeltetett körpályás rázógépet lehet használni például 2 000 ml kapacitású lombikokkal, hogy kielégítsék az iszap oxigénigényét és leküzdjék az olyan vegyi anyagokkal kapcsolatos nehézségeket, amelyek túlzott mennyiségű habot termelnek, illékonyak és ezért elvesznek, vagy nehezen diszpergálhatók, ha levegőöblítéssel levegőztetik őket. A vizsgálati rendszer jellemzően több folyamatosan levegőztetett és egymást követően (pl. kb. 10–15 perces időközönként) létrehozott, majd szekvenciális módon analizált főzőpohárból áll. A levegőztetést és a keverékek oxigénfogyasztási sebességének mérését egyidejűleg lehetővé tevő validált műszerek is használhatók;

- e) pH-mérő;
- f) Centrifuga, általános asztali centrifuga iszap részére, amely 10 000 m/s² centrifugális gyorsulásra képes.

Reagensek

14. Az egész eljárás során analitikai tisztaságú reagenseket kell használni.

Víz

15. Kevesebb, mint 1 mg/l DOC-t tartalmazó desztillált vagy ionmentesített vizet kell használni, kivéve, ha klórmentes csapvíz van megadva.

Mesterséges szennyvíz tápszer

16. A közeget úgy kell elkészíteni, hogy az alábbi összetevőket tartalmazza a megadott mennyiségben:

— pepton	16 g
— húskivonat (vagy hasonló növényi kivonat)	11 g
— karbamid	3 g
— nátrium-klorid (NaCl)	0,7 g
— kalcium-klorid-dihidrát (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— magnézium-szulfát-heptahidrát (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— vízmentes kálium-monohidrogén-foszfát (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— desztillált vagy ionmentesített vízzel 1 literre feltöltve	

17. 7,5 (± 0,5) pH-jú oldatot kell kapnunk. Ha az elkészített közeget nem használjuk fel azonnal, sötét helyen 0–4 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb egy hétig, vagy olyan körülmények között lehet tárolni, amelyek nem okoznak változást a közeg összetételében. Meg kell jegyezni, hogy ez a szintetikus szennyvíz »A szintetikus detergensekben használt felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának meghatározásához javasolt módszer« című OECD technikai jelentésben (1976. június 11.) megadott recept százszoros koncentrátuma, dikálium-hidrogén-foszfáttal kiegészítve.
18. Alternatív megoldásként a közeg komponenseit a tárolás előtt egyedileg is sterilizálni lehet, vagy a peptont és a húskivonatot röviddel a vizsgálat elvégzése előtt is hozzá lehet adni. Használat előtt a közeget alaposan meg kell keverni, és ha szükséges, a pH-t 7,5 ± 0,5 értékre kell beállítani.

Vizsgált vegyi anyag

19. A vízben könnyen oldódó vizsgált anyagok esetében törzsoldatot kell készíteni, de csak a maximális vízoldhatóság mértékéig (csapadék nem fogadható el). A vízben rosszul oldódó anyagokat, a különböző vízoldhatóságú összetevőkből álló keverékeket és az adszorbens anyagokat közvetlenül a vizsgálati edényekbe kell mérni. Ezekben az esetekben törzsoldatok használata is alternatíva lehet, ha a vizsgált vegyi anyagok oldott koncentrációit analitikailag meghatározzák a vizsgálati edényekben (az eleveniszap hozzáadása előtt). Ha vízben oldódó frakciókat (WAF) készítenek, a vizsgált vegyi anyagok oldott koncentrációinak a vizsgálati edényekben történő analitikai meghatározása is elengedhetetlen. A szerves oldószerek vagy diszpergálószerke/emulgeálószerke oldhatóság javítása céljából történő használata kerülendő. A törzsoldatok ultrahangos keverése és a szuszpenziók előkeverése – pl. az éjszaka folyamán – akkor lehetséges, ha elegendő információ áll rendelkezésre a vizsgált vegyi anyag ilyen körülmények között mutatott stabilitása vonatkozásában.
20. A vizsgált vegyi anyag káros hatással lehet a vizsgálati rendszer pH-jára. A vizsgált vegyi anyaggal kezelt keverékek pH-ját a vizsgálat felállítása előtt – egy előzetes vizsgálat keretében – meg kell határozni annak megállapítása céljából, hogy a fő vizsgálat előtt szükség lesz-e a pH kiigazítására, illetve ismét meg kell határozni a fő vizsgálat napján. A vizsgált vegyi anyag vizes oldatait/suszpenzióit az oltóanyag hozzáadása előtt semlegesíteni kell, ha szükséges. Mivel azonban a semlegesítés megváltoztathatja a vegyi anyag kémiai tulajdonságait, a vizsgálat céljaitól függően további vizsgálatokat is lehet végezni annak értékelése érdekében, hogy a vizsgált vegyi anyag milyen hatást gyakorol az iszapra a pH beállítása nélkül.

21. Az illékony vegyi anyagok toxikus hatásai – különösen az olyan vizsgálatokban, amelyben a levegőt buborékoltatnak át a rendszeren – változó hatásszinteket eredményezhetnek az expozíciós idő alatt bekövetkező anyagvesztés miatt. Az ilyen anyagokkal óvatosan kell eljárni, és el kell végezni az anyagot tartalmazó kontrollkeverékek anyagspecifikus elemzését, módosítva a levegőztetést.

Referencia-vegyianyag

22. Ha 3,5-diklór-fenolt használnak referencia-vegyianyagként, akkor 1,00 g 3,5-diklór-fenolt 1 000 ml vízben feloldva törzsoldatot kell készíteni (15). Meleg vizet és/vagy ultrahangos keverést kell használni az oldódás gyorsítása érdekében, és az oldatot akkor kell feltölteni a megfelelő térfogatra, ha szobahőmérsékletre hűlt. Ugyanakkor azonban biztosítani kell, hogy a referencia-vegyianyag szerkezetileg ne módosuljon. Az oldat pH-ját ellenőrizni kell és szükség esetén NaOH-dal vagy H₂SO₄-val pH 7-8 értékre ki kell igazítani.
23. Ha réz(II)-szulfát-pentahidrátot használnak referencia-vegyianyagként, akkor 58 mg/l, 100 mg/l és 180 mg/l (1,8-szeres) koncentrációt használnak. Az anyagot közvetlenül a vizsgálati edényekbe mérlegelik (29–50–90 mg 500 ml teljes térfogathoz). Ezt azután 234 ml autoklávozott csapvízzel feloldják. A réz(II)-szulfát-pentahidrát könnyen oldódik. A vizsgálat kezdetekor 16 ml szintetikus szennyvizet és 250 ml eleveniszapot adnak hozzá.

A nitrifikáció specifikus inhibitora

24. 2,32 g/l koncentrációjú N-allil-tiokarbamid (ATU) törzsoldatot kell készíteni. Ebből a törzsoldatból 2,5 ml hozzáadása az 500 ml végső térfogatú inkubációs elegyhez 11,6 mg ATU/l (10⁻⁴ mol/l) végső koncentrációt eredményez, amely köztudottan elegendő ahhoz (4), hogy 100 %-ban gátolja a nitrifikációt az 1,5 g/l lebegő szilárd anyagot tartalmazó nitrifikáló eleveniszapban.

Abiotikus kontroll

25. Bizonyos ritkán előforduló helyzetekben egy erős redukáló tulajdonságú vizsgált vegyi anyag mérhető abiotikus oxigénfogyasztást okozhat. Ilyen esetekben abiotikus kontrollokra van szükség, hogy meg lehessen különböztetni a vizsgált vegyi anyag abiotikus oxigénfelvételét és a mikrobiális légzést. Abiotikus kontrollokat az oltóanyag vizsgálati keverékekből való kihagyásával lehet előállítani. Oltóanyag nélküli abiotikus kontrollokat lehet akkor is bevonni, ha alátámasztó analitikai méréseket végeznek a vizsgálat expozíciós szakaszában elért koncentráció meghatározására, pl. amikor vízben rosszul oldódó vegyi anyagok törzsoldatait különböző vízdoldhatóságú összetevőkkel használják. Meghatározott esetekben sterilizált oltóanyagmal készített abiotikus kontrollokra lehet szükség (pl. autoklávban vagy sterilizáló toxikus anyagok hozzáadásával). Néhány vegyi anyag csak akkor termel vagy fogyaszt oxigént, ha a felület elég nagy a reakcióhoz, akkor is, ha általában sokkal magasabb hőmérsékletre vagy nyomásra van szükség ehhez. E tekintetben különös figyelmet kell fordítani a peroxi-vegyületekre. A sterilizált oltóanyag nagy felületet biztosít.

Oltóanyag

26. Általános használatra az eleveniszapot a levegőztető medence kilépési pontján kell gyűjteni, vagy a kifolyó közelében a tartályból, egy túlnyomórészt háztartási szennyvizet fogadó jól működő szennyvíztisztító telepről. A vizsgálat céljától függően egyéb megfelelő típusú vagy forrásból származó eleveniszap is használható (pl. a laboratóriumban termesztett iszap), ha a szuszpendált szilárd anyag koncentrációja 2–4 g/l. A különböző szennyvízkezelő telepekről származó iszapok azonban más jellegzetességeket és érzékenységet mutathatnak.
27. Az iszapot begyűjtött állapotában is lehet használni, de a durva részecskéket el kell távolítani, vagy rövid (pl. 5–15 perces) ülepitéssel és a finomabb szilárd anyagokat tartalmazó felső réteg dekantálásával vagy szitálással (pl. 1 mm² lyukmérettel). Alternatív megoldásként az iszapot turmixgépben kb. 15 másodpercig vagy hosszabb ideig homogenizálni lehet, de óvatosságra van szükség az nyírási erők és a hőmérsékletváltozás miatt, amelyek a hosszú ideig tartó keverés során előfordulhatnak.

28. Az iszap mosására gyakran szükség van, például ha az endogén légzés alacsony. Az iszapot először egy ideig centrifugálni kell, pl. 10 percen át kb. 10 000 m/s² centrifugális gyorsuláson, hogy tiszta felülúszót és a szennyvíz szilárd anyagaiból álló üledéket kapjunk. A felülúszó folyadékot el kell távolítani és az iszapot rázatás közben újra kell szuszpendálni klórmentes csapvízben, majd a mosóvizet újbóli centrifugálás és leöntés útján el kell távolítani. A mosási és centrifugálási folyamatot szükség esetén meg kell ismételni. Az ismert térfogatú újrászuszpendált iszap száraz tömegét meg kell határozni, és az iszapot a folyadék eltávolításával be kell töményíteni vagy további kell hígítani klórmentes csapvízzel az iszap kívánt szilárdanyag-koncentrációjának (3 g/l) eléréséig. Az eleveniszapot folyamatosan levegőztetni kell (pl. 2 l/perc) a vizsgálati hőmérsékleten, és lehetőség szerint a gyújtás napján fel kell használni. Ha ez nem lehetséges, az iszapot naponta táplálni kell szintetikus szennyvíz tápszerrel (50 ml szintetikus szennyvíz tápszer/l eleveniszap) további két napig. Az iszapot ezután fel kell használni a vizsgálathoz és az eredményeket érvényesnek kell tekinteni, feltéve, hogy nem történt jelentős változás az aktivitásában, amelyet az endogén heterotróf és nitrifikációs légzési sebesség alapján kell értékelni.
29. Nehézségek merülhetnek fel, ha olyan mértékű habképződés lép fel az inkubáció alatt, amelynek következtében a hab és a rajta található szilárd iszaprészek eltávoznak a levegőztető edényekből. Esetenként a habzás egyszerűen a szintetikus szennyvíz jelenlétéből ered, de a habzással számolni kell, ha a vizsgált vegyi anyag felületaktív vagy felületaktív anyagot tartalmaz. Az iszap szilárd anyagainak a vizsgálati keverékből való elvesztése mesterségesen lecsökkentett légzési sebességet eredményez, amely tévesen gátlás eredményeként is értelmezhető. Ezen túlmenően, egy felületaktív anyag oldatának levegőztetése a felületaktív anyagot a habrétegben koncentrálja; a hab elvesztése a vizsgálati rendszerből csökkenti az expozíciós koncentrációkat. A habzás egyszerű mechanikai módszerekkel is kontrollálható (pl. alkalmi manuális keverés egy üvegbot segítségével), vagy úgy, hogy felületaktív anyagtól mentes szilikonemulzió habzásgátló szert adnak hozzá és/vagy alkalmazzák a lombikrázásos levegőztető módszert. Ha a probléma a szintetikus szennyvíz jelenlétéhez társul, módosítani kell a szennyvíz összetételét egy habzásgátló reagens pl. 50 µl/l. mennyiségben történő hozzáadásával. Ha a habzást a vizsgált vegyi anyag okozza, a csökkentéséhez szükséges mennyiséget a maximális vizsgált koncentráción kell meghatározni, majd minden egyes levegőztető edényt azonos módon kell kezelni (beleértve például a vak kontrollokat és a referencia edényeket is, ahol nincs hab). Ha habzásgátló anyagokat használnak, az nem léphet kölcsönhatásba az oltóanyaggal és/vagy a vizsgált vegyi anyaggal.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

30. Három különböző oxigénfelvétel gátlását lehet meghatározni: teljes, csak heterotróf és nitrifikáció okozta oxigénfelvétel. Normális esetben elegendő a teljes oxigénfelvétel gátlásának mérése. A szerves szén oxidációjából eredő heterotróf oxigénfelvételre, illetve az ammónium oxidációjából eredő oxigénfelvételre gyakorolt hatások bemutatására akkor van szükség, ha egy adott vegyi anyaggal kapcsolatban specifikus igény merül fel két ilyen különböző végpont iránt vagy (adott esetben) a teljes oxigénfelvétel gátlásáról készült atípusos dózis-válasz görbéket kell megmagyarázni.

Vizsgálati körülmények

31. A vizsgálatot a 20 ± 2 °C hőmérsékleti tartományban kell elvégezni.

Vizsgálati keverékek

32. Vizsgálati keverékeket (F_T az 1. táblázat szerint) kell készíteni vízből, szintetikus szennyvíz tápszerből és a vizsgált vegyi anyagból úgy, hogy azok a vizsgált vegyi anyag különböző névleges koncentrációit tartalmazzák (térfogatokat és összetevőket tartalmazó példáért lásd az 1. táblázatot). A pH-t 7,5 ± 0,5 értékre kell beállítani, ha szükséges; a keverékeket vízzel fel kell hígítani és az oltóanyagot hozzá kell adni úgy, hogy az edényekben azonos végső térfogatok legyenek és meg lehessen kezdeni a levegőztetést.

Referencia keverékek

33. A vizsgált vegyi anyag helyett referencia vegyi anyagot, például 3,5-diklór-fenolt tartalmazó keverékeket (F_R) kell készíteni a vizsgálati keverékekkel megegyező módon.

Blank (»vak«) kontrollok

34. Vak kontrollokat (FB) kell készíteni az expozíciós idő elején és végén azokban a vizsgálatokban, amelyekben a vizsgálati főzőpoharak egymás után időközönként vannak beállítva. Az olyan berendezések használatával végzett vizsgálatokban, amelyek lehetővé teszik az oxigénfogyasztás egyidejű mérését, legalább két vak kontrollt kell minden egyidejű vizsgálatra kerülő tételbe bevonní. A vak kontrollok megegyező térfogatú eleveniszapot és szintetikus közeget tartalmaznak, de nem tartalmazzák a vizsgált vegyi anyagot vagy a referencia-vegyianyagot. Ezeket a vizsgált és referencia keverékekkel megegyező térfogatra kell hígítani vízzel.

Abiotikus kontroll

35. Szükség esetén, például ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy feltételezik, hogy erős redukáló tulajdonsággal rendelkezik, egy F_A keveréket kell készíteni az abiotikus oxigénfogyasztás mérése céljából. A keveréknek a vizsgált keverékekkel megegyező mennyiségű vizsgált vegyi anyagot és szintetikus szennyvíz tápszert kell tartalmaznia és azzal megegyező térfogatúnak kell lennie, de eleveniszapot nem tartalmazhat.

Általános eljárás és mérések

36. A vizsgálati keverékeket, a referencia keverékeket, valamint a vak és abiotikus kontrollokat a vizsgálati hőmérsékleten, kényszerített levegőztetés körülményei között (0,5–1 l/perc) inkubálják, hogy az oldott oxigén koncentrációja a 60–70 %-os telítettség felett maradjon, illetve hogy az iszappelyheket szuszpenzióban tartsák. A kultúrák keverése is szükséges, hogy az iszappelyheket szuszpenzióban lehessen tartani. Az inkubáció kezdetének azt a pillanatot tekintik, amikor az eleveniszap-oltóanyag először lép érintkezésbe a végső keverék többi alkotóelemével. Az inkubálás végén, az általában 3 órában meghatározott expozíciós idő eltelte után mintákat vesznek, hogy az e célra tervezett cellában (3. függelék 2. ábra) vagy egy teljesen teletöltött BOD-palackban megmérjék az oldott oxigén koncentrációjának csökkenését. Az inkubáció megkezdésének módja az oxigénfogyasztás mérésére használt berendezés kapacitásától is függ. Ha például csak egyetlen oxigénszondából áll, a méréseket egyedileg végzik el. Ebben az esetben a szintetikus szennyvízzel végzett vizsgálatához szükséges különböző keverékeket el kell készíteni, de az oltóanyagot vissza kell tartani, és az iszap szükséges mennyiségeit kell hozzáadni a sorozat egyes edényeihez. Az inkubációkat kényelmes időközönként, pl. 10–15 percenként kell elkezdni. Más esetben a mérési rendszer több szondából is állhat, ami több egyidejű mérést tesz lehetővé; ebben az esetben az oltóanyagot egyidőben is hozzá lehet adni a megfelelő edénycsoportokhoz.
37. Az eleveniszap koncentrációja minden vizsgált, referencia és vak keverékben (de nem abiotikus kontrollban) névlegesen 1,5 g/l szuszpendált szilárd anyag. Az oxigénfogyasztást a 3 órás expozíció után kell megmérni. További 30 perces expozíciós méréseket kell végezni szükség esetén az 5. pontban leírt módon.

Az iszap nitrifikációs potenciálja

38. Annak eldöntésére, hogy az iszap nitrifikál-e, és ha igen, milyen ütemben, a vak kontrollnak megfelelő keverékeket (F_B) és további »kontroll« keverékeket (F_N) kell készíteni, amelyek 11,6 mg/l N-allil-tiokarbamidot is tartalmaznak. A keverékeket levegőztetni és $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ -on 3 órán át inkubálni kell. Ezután meg kell mérni az oxigénfelvétel sebességét, és ki kell számítani a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel mértékét.

A vizsgálat megtervezése

Dózisbehatóró vizsgálat

39. Szükség esetén előzetes vizsgálatot kell végezni, hogy megbecsüljék a vizsgált vegyi anyagnak az oxigénfogyasztás gátlásának meghatározására szolgáló meghatározó vizsgálatához szükséges koncentrációját. Az oxigénfogyasztás vizsgált vegyi anyag által okozott gátlásának előzetes vizsgálatban megfigyelt hiánya azt jelezheti, hogy a meghatározó vizsgálatra nincs szükség, de a vizsgálatba be kell vonni az előzetes vizsgálatban vizsgált legmagasabb koncentráció (jellemzően 1 000 mg/l, de függ az adatokra vonatkozó követelménytől) háromszorosát.

1. táblázat

Példák az előzetes vizsgálatban használt keverékekre

Reagens	Eredeti koncentráció				
A vizsgált vegyi anyag törzsoldata	10 g/l				
A szintetikus közeg törzsoldata	Lásd a 16. pontot				
Eleveniszap törzsszuszpenzió	3 g/l szuszpendált szilárd anyag				
A keverékek összetevői	Adagolás a vizsgálati edényekbe ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
A vizsgált vegyi anyag törzsoldata (ml) (19–21. pont)	0,5	5	50	0	50
A szintetikus szennyvíz tápszer törzsoldata (ml) (16. pont)	16	16	16	16	16
Eleveniszap-szuszpenzió (ml) (26–29. bekezdés)	250	250	250	250	0
Víz (15. pont)	233,5	229	184	234	434
A keverékek összes térfogata (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrációk a keverékben					
Vizsgálati szuszpenzió (mg/l) Eleveniszap	10	10	1 000	0	1 000
(szuszpendált szilárd anyagok) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) (Ugyanezt az eljárást kell követni a referencia-vegyianyag esetében, hogy megkapjuk az F_{R1-3} lombikot)

40. A vizsgálatot a vizsgált vegyi anyag legalább három koncentrációjával (például 10 mg/l, 100 mg/l és 1 000 mg/l) és egy vak kontrollal kell elvégezni, illetve szükség esetén a vizsgált vegyi anyag legmagasabb koncentrációját tartalmazó legalább három abiotikus kontrollal (példaként lásd az 1. táblázatot). Ideális esetben a legalacsonyabb koncentráció nem lehet hatással a oxigénfogyasztásra. Ki kell számítani az oxigénfelvétel sebességét és, ha lényeges, a nitrifikáció sebességét; ezt követően pedig ki kell számítani a százalékos gátlást. A vizsgálat céljától függően az is lehetséges, hogy egyszerűen meghatározzák a határérték koncentráció (pl. 1 000 mg/l) toxicitását. Ha ezen a koncentráción nem lép fel statisztikailag szignifikáns toxikus hatás, nincs szükség magasabb vagy alacsonyabb koncentrációkon végzett további vizsgálatokra. Meg kell jegyezni, hogy a vízben rosszul oldódó anyagokat, a különböző vízdilhatóságú komponensek keverékeit és az adszorbeáló anyagokat közvetlenül kell bemérni a kísérleti edényekbe. Ebben az esetben a vizsgált anyag törzsoldata számára fenntartott térfogatot hígító vízre kell cserélni.

Meghatározó vizsgálat

A teljes oxigénfelvétel gátlása

41. A vizsgálatot az előzetes vizsgálatból levezethető koncentrációtartományban kell elvégezni. A NOEC és az EC_x (pl. EC₅₀) megállapítása érdekében a legtöbb esetben hat kontroll, egy mértani sorozatot alkotó öt kezelési koncentráció, illetve öt ismétlés ajánlott. Az abiotikus kontrollt nem kell megismételni, ha nem volt oxigénfelvétel az előzetes vizsgálat során, de ha jelentős mértékű felvétel történik, abiotikus kontrollokat kell alkalmazni a vizsgált vegyi anyag minden egyes koncentrációjához. Az iszap érzékenységét a 3,5-diklór-fenol referencia-vegyianyag alkalmazásával kell ellenőrizni. Az iszap érzékenységét minden vizsgálati sorozat esetében ellenőrizni kell, hiszen az érzékenység köztudottan fluktuál. Minden esetben mintákat vesznek a kísérleti edényből 3 óra elteltével, és ezen felül 30 perc múlva, ha szükséges, hogy megmérjék az oxigénfelvétel sebességét az oxigén-elektroda cellában. Az összegyűjtött adatokból kiszámítják a kontroll és vizsgálati keverékek specifikus légzési sebességét; a százalékos gátlást ezt követően az alábbi 7. egyenletből vezetik le.

A heterotróf légzés és a nitrifikáció gátlásának megkülönböztetése

42. A nitrifikáció specifikus inhibitorának (ATU) használata lehetővé teszi, hogy közvetlenül értékeljék a vizsgált vegyi anyagoknak a heterotróf oxidációt gátló hatását, és az oxigénfelvétel ATU jelenlétében mért sebességét kivonva a teljes felvételi sebességből (ATU nincs jelen) ki lehet kiszámítani a nitrifikáció sebességére gyakorolt hatást. Két sorozat reakciókeveréket kell készíteni a 41. pontban leírt EC_x vagy NOEC vizsgálat elrendezés szerint, de emellett ATU-t kell hozzáadni az egyik sorozat minden egyes keverékéhez 11,6 mg/l végső koncentrációban, amelyről kimutatták, hogy teljes mértékben gátolja a legfeljebb 3 000 mg/l szuszpendált szilárd anyag koncentrációjú iszap nitrifikációját (4). Az oxigénfelvétel sebességét az expozíciós idő eltelte után kell mérni; ezek a közvetlen értékek csak a heterotróf légzést reprezentálják, és az ezek és a hozzájuk tartozó teljes légzési sebességek különbsége reprezentálja a nitrifikációt. A gátlás különböző mértékeit ezt követően számítják ki.

Mérések

43. Az expozíciós idő(k) eltelte után az első levegőztető edényből át kell transzferálni egy mintát az oxigén-elektrod cellába (2. függelék 1. ábra), és az oldott oxigén koncentrációját azonnal meg kell mérni. Ha több elektrodát tartalmazó rendszer áll rendelkezésre, akkor a mérések végezhetőek egyidejűleg is. A keverés (bevont mágnes útján) alapvető fontosságú és ugyanolyan sebességen kell történnie, mint amelyet az elektroda kalibrálásakor alkalmaztak. Ez biztosítja, hogy a sonda minimális késéssel válaszoljon a változó oxigén koncentrációkra, és ez teszi lehetővé a rendszeres és reprodukálható oxigénmérések végzését a mérőedényben. Általában az egyes oxigén-elektrodák önkeverő szondarendszere megfelelő. A cellát a mérések között vízzel ki kell öblíteni. Alternatív megoldásként a mintát egy mágneses keverővel ellátott BOD-palack megtöltésére is lehet használni (3. függelék 2. ábra). Egy hüvely adapterrel ellátott oxigénszondát kell ezután beilleszteni a palack nyakába, és a mágneses keverőt el kell indítani. Mindkét esetben folyamatosan kell mérni és regisztrálni az oldott oxigén koncentrációját egy adott ideig, rendszerint 5–10 percig, vagy amíg az oxigénkoncentráció 2 mg/l alá nem csökken. Az elektrodát el kell távolítani, a keveréket pedig vissza kell juttatni a levegőztető edénybe és folytatni kell levegőztetést és a keverést, ha hosszabb expozíciós időszakok utáni mérésekre is szükség van.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának ellenőrzése

44. Bizonyos esetekben szükség lehet arra, hogy megmérjék a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálati edényben. Meg kell jegyezni, hogy ha

— vízben rosszul oldódó anyagokból,

— különböző vízoldhatóságú összetevők keverékéből, vagy

— vízben jól oldódó anyagokból, de ahol a törzsoldat koncentrációja a közel van a maximális vízoldhatósághoz,

készített törzsoldatokat használnak, az oldott frakció ismeretlen, és a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgálati edénybe transzferált valódi koncentrációja nem ismert. Az expozíció jellemzése érdekében szükség van a vizsgált vegyi anyag vizsgálati edényben elért koncentrációjának analitikus becslésére. Az egyszerűség kedvéért az analitikus becslést az oltóanyag hozzáadása előtt kell elvégezni. Annak a ténynek köszönhetően, hogy csak oldott frakciók kerülnek át a vizsgálati edényekbe, a mért koncentrációk nagyon alacsonyak lehetnek.

45. Az időigényes és drága analízisek elkerülése érdekében ajánlott a vizsgált vegyi anyagot egyszerűen közvetlenül a vizsgálati edényekbe bemérni, és a későbbi számítások során a kezdeti bemért névleges koncentrációra hivatkozni. A vizsgált vegyi anyag oldott, nem oldott vagy adszorbeált frakciói közötti különbségtételre nincs szükség, mert ezek a frakciók valós körülmények között, a szennyvízkezelő üzemben is megjelennek, és a frakciók a szennyvíz összetételétől függően eltérőek lehetnek. A vizsgálati módszer célja a nem gátló koncentráció reális becslése, és nem alkalmas annak részletes vizsgálatára, hogy mely frakciók járulnak hozzá az eleveniszapban található organizmusok gátlásához. Végezetül az adszorbens anyagokat is közvetlenül a vizsgálati edényekbe kell bemérni, és az edényeket az adszorpció okozta veszteségek minimalizálása érdekében szilanizálni kell.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az oxigénfelvételi sebességek kiszámítása

46. Az oxigénfelvételi sebességet az átlagos mért értékekből kell kiszámítani, pl. az oxigénkoncentrációt az idő függvényében ábrázoló grafikonok lineáris részéből, a számításokat a 2,0 mg/l és 7,0 mg/l közötti oxigénkoncentrációkra korlátozva, mivel a magasabb és az alacsonyabb koncentrációk maguk is befolyásolhatják a fogyasztás sebességét. Az ezen értékek alatti vagy feletti koncentrációsávokba történő kiterjesztés alkalmanként elkerülhetetlen és szükséges, például, ha a légzés erősen elnyomott, és ennek következtében nagyon lassú, vagy ha egy adott eleveniszap nagyon gyorsan lélegzik. Ez elfogadható, feltéve, hogy az oxigénfelvételi grafikon kiterjesztett szakaszai egyenesek és a gradiensei nem változnak, miközben áthaladnak a 2,0 mg/l vagy a 7,0 mg/l O₂-határokon. A grafikon ívelt szakaszai azt jelzik, hogy a mérési rendszer stabilizálódik, vagy a felvételi sebesség változik, és ezeket nem szabad a légzés sebességének kiszámításához használni. Az oxigénfelvétel sebességét milligramm per liter per óra (mg/lh) vagy milligramm per gramm száraz iszap per óra (mg/gh) mértékegységben kell megadni. Az oxigénfogyasztás mértékét (R, mg/lh mértékegységben) a felvett oxigénnövekedési grafikon lineáris részéből lehet kiszámítani vagy interpolálni az 1. egyenlet szerint:

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

ahol:

Q₁ oxigénkoncentráció a lineáris fázis kiválasztott szakaszának elején (mg/l);

Q₂ oxigénkoncentráció a lineáris fázis kiválasztott szakaszának végén (mg/l);

Δ_t időintervallum a két mérés között (perc).

47. A fajlagos légzési sebességet (R_s) az iszap egy gramm száraz tömege által óránként elfogyasztott oxigén mennyiségében (mg/gh) fejezik ki a 2. egyenlet szerint:

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

ahol SS a szuszpendált szilárd anyag koncentrációja a vizsgálati keverékben (g/l).

48. Az R különböző kombinálható indexei a következők:

S specifikus sebesség

T teljes légzés sebessége

N nitrifikációs légzés miatti sebesség

H heterotróf légzés miatti sebesség

A abiotikus folyamatok miatti sebesség

B sebesség a vak vizsgálatok alapján (átlag)

A nitrifikáció miatti oxigénfelvétel sebességének kiszámítása

49. A teljes légzés (R_T), a nitrifikációs légzés (R_N), és a heterotróf légzés (R_H) közötti összefüggést a 3. egyenlet adja meg:

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

ahol:

R_N a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel sebessége (mg/lh);

R_T a vak kontroll oxigénfelvételének mért sebessége (ATU nélkül; F_B) (mg/lh).

R_H a vak kontroll oxigénfelvételének mért sebessége hozzáadott ATU-val (F_N) (mg/lh).

50. Ez az összefüggés a vakértékekre (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), az abiotikus kontrollokra (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) és a vizsgált vegyi anyagokkal végzett vizsgálatokra (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh) érvényes. A specifikus légzési sebesség kiszámítása:

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

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

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

51. Ha az előzetes vizsgálat során az R_N nem szignifikáns (pl. az $R_T < 5$ %-a a vak kontrollokban), abból kell kiindulni, hogy a heterotróf oxigénfelvétel megegyezik a teljes felvétellel, és hogy nitrifikáció nem zajlik. Alternatív eleveniszap forrásra lenne szükség, ha a vizsgálatoknak figyelembe kellene venniük a heterotróf és nitrifikáló mikroorganizmusokra gyakorolt hatásokat. Meghatározó vizsgálatot végeznek, ha nyomott oxigénfelvételi sebességre utaló bizonyítékok adódnak a vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációival.

A százalékos gátlás kiszámítása

52. A teljes oxigénfogyasztás százalékos gátlását (I_T) a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinál a 7. egyenlet adja meg:

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

53. Hasonlóképpen, a heterotróf oxigénfelvétel százalékos gátlását (I_H) a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinál a 8. egyenlet adja meg:

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

54. Végezetül, az oxigénfelvétel nitrifikáció miatti gátlását (I_N) az egyes koncentrációknál a 9. egyenlet adja meg:

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

55. Az oxigénfelvétel százalékos gátlását a vizsgált vegyi anyag koncentrációja logaritmusának függvényében kell ábrázolni (gátlási görbe, lásd a 4. függelék 3. ábráját). A gátlási görbét minden egyes 3 órás levegőztetési periódus esetében felrajzolják, illetve kiegészítésképpen 30 perc után is. A vizsgált vegyi anyag azon koncentrációját, amely az oxigén felvételét 50 %-kal gátolja (EC_{50}), a grafikomból kell kiszámítani vagy interpolálni. Ha megfelelő adatok állnak rendelkezésre, az EC_{50} 95 %-os megbízhatósági határait, a görbe lejtését, a gátlás kezdetét jelölő megfelelő értékeket (például EC_{10} vagy EC_{20}), és a gátlási tartomány a végét (például EC_{80} vagy EC_{90}) ki lehet számítani vagy interpolálni lehet.

56. Meg kell jegyezni, hogy tekintettel az eredmények gyakran megfigyelt variabilitására, sok esetben elegendő lehet az eredményeket nagyságrendileg kifejezni, például:

$EC_{50} < 1$ mg/l

EC_{50} 1-10 mg/l

EC_{50} 10-100 mg/l

$EC_{50} > 100$ mg/l

Az eredmények értelmezése

EC_x

57. Az EC_x -értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os megbízhatósági határokat, megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull funkció, vágott Spearman-Kärber módszer vagy egyszerű interpoláció (11)). Az EC_x -értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat (x) regressziós elemzésnek kell alávetni.

A NOEC becslése

58. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató című OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni (11). Általában a vizsgált vegyi anyag káros hatásait a kontrollal összehasonlítva egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal ($p \leq 0,05$) vizsgálják.

Vizsgálati jegyzőkönyv

59. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

- közös név, kémiai név, CAS-szám, tisztaság;
- a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. $\log K_{ow}$, vízdoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag sorsára vonatkozó esetleges információk, pl. eleveniszapos adszorpció);

Kísérleti rendszer

- forrás, a szennyvíztisztító telep működésének feltételei és a kapott befolyó anyag, koncentráció, az eleveniszap előkezelése és fenntartása;

Vizsgálati körülmények

- vizsgálati hőmérséklet, pH a vizsgálat alatt és az expozíció időtartama, fázis(ok);

Eredmények

- a kontrollok fajlagos oxigénfogyasztása ($\text{mg O}_2/(\text{g iszap} \times \text{h})$);
- mért adatok, gátlási görbe (görbék), az EC_{50} számítási módszere;
- EC_{50} , és ha lehetséges, a 95 %-os megbízhatósági határok, esetleg EC_{20} , EC_{80} ; esetleg NOEC és az alkalmazott statisztikai módszerek, ha az EC_{50} -et nem lehet meghatározni;
- a teljes, és ha szükséges, a heterotróf és a nitrifikációs gátlás eredményei;
- a fizikai-kémiai kontroll abiotikus oxigénfelvétele (ha van);
- a referencia-vegyianyag neve és az ezzel a vegyi anyaggal kapott eredmények;
- minden megfigyelés és minden eltérés a vizsgálati módszertől, amely az eredményeket befolyásolhatta.

IRODALOM

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
 - (2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
 - (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
 - (4) ISO (2007). ISO 8192 Vízminőség. Az eleveniszap oxigénfogyasztás-gátlásának vizsgálata szén- és ammónium-oxidációval, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.
 - (5) Bealing, D. J. (2003). ISO/TC147/WGI/N.183 dokumentum, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.
 - (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
 - (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
 - (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
 - (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
 - (10) ISO (1995). ISO 10634 Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.
 - (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
-

*1. függelék***Fogalommeghatározások**

E vizsgálati módszerben a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

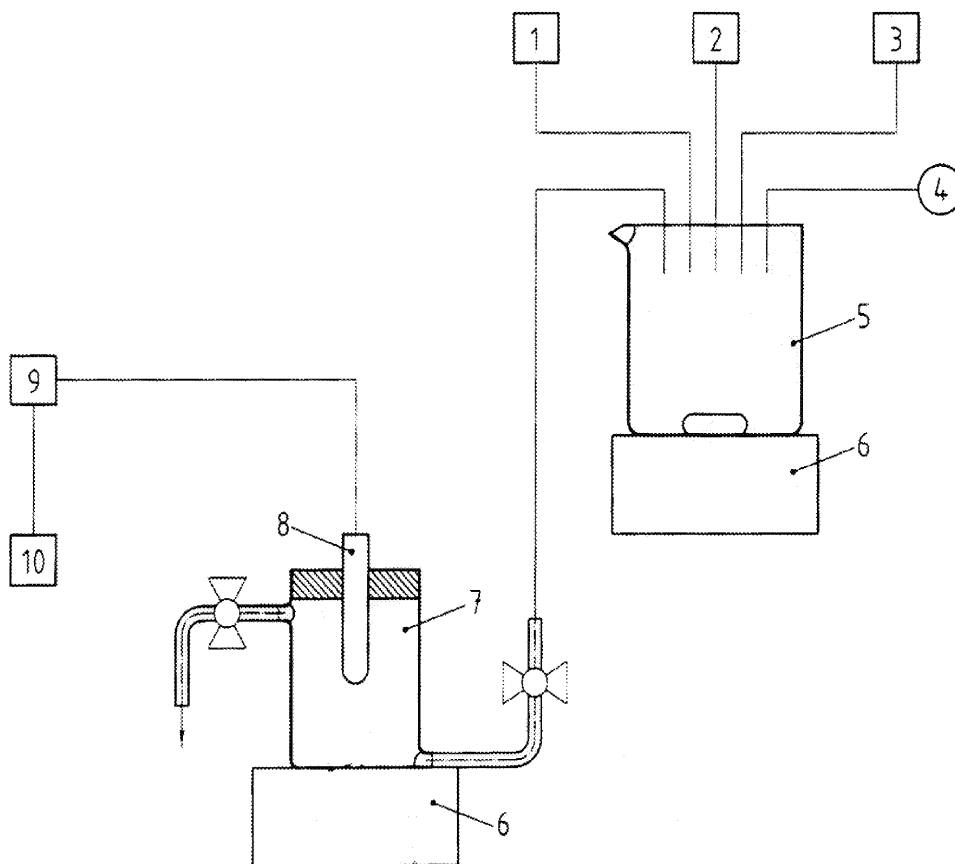
EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC₅₀ az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszerrel vizsgált anyag vagy keverék.

2. függelék

1. ábra: Példa mérőegységre

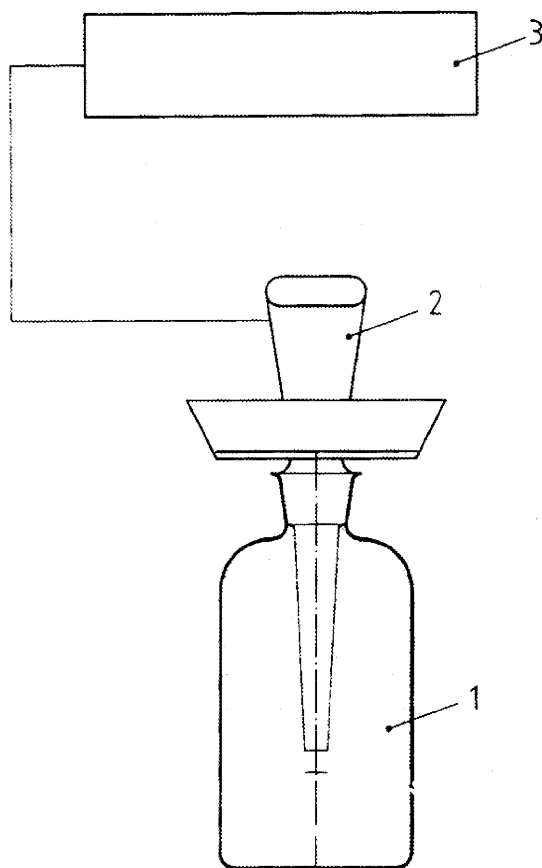


Jelmagyarázat

- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1 eleveniszap | 6 mágneses keverő |
| 2 szintetikus közeg | 7 oxigénmérő cella |
| 3 vizsgált vegyi anyag | 8 oxigén-elektrod |
| 4 levegő | 9 oxigénmérő műszer |
| 5 keverőedény | 10 felvevő |

3. függelék

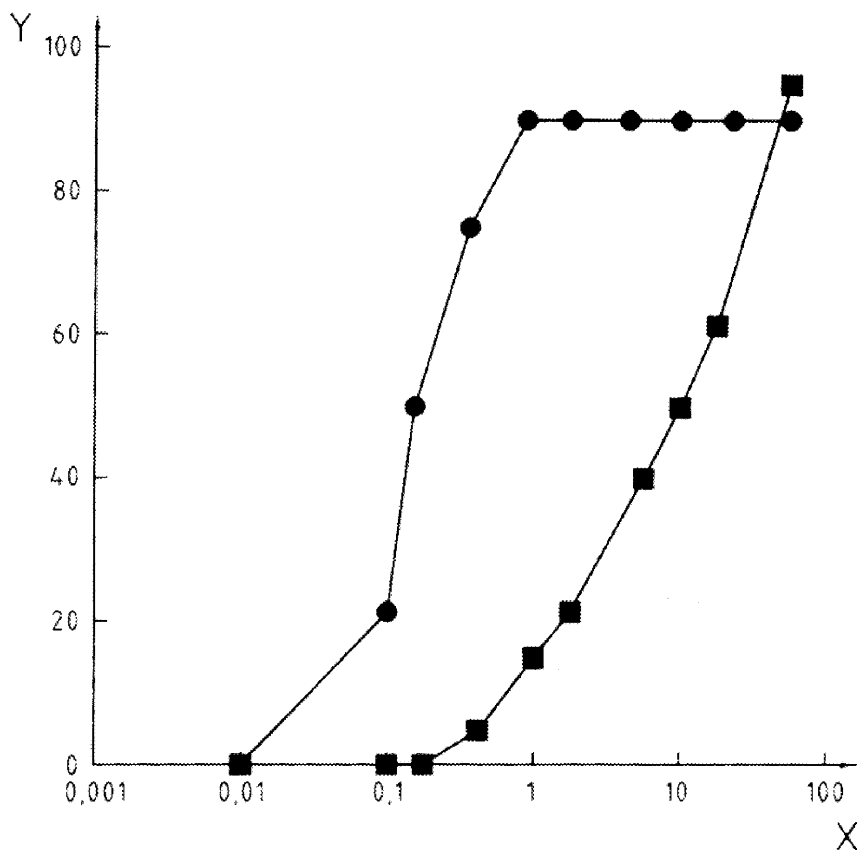
2. ábra: Példa mérőegységre, BOD-palackkal

*Jelmagyarázat*

- 1 Vizsgálati edény
- 2 oxigénelektród
- 3 oxigénmérő műszer

4. függelék

3. ábra: Példa gátlási görbére



Jelmagyarázat

X a 3,5-diklór-fenol koncentrációja (mg/l)

Y gátlás (%)

■ a heterotróf légzés gátlása nitrifikáló iszap használata esetén

● a nitrifikáció gátlása nitrifikáló iszap használata esetén”

5. A C.26. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

„C.26 A LEMNA-FAJOK NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 221. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. Ez a vizsgálati módszer a különböző vegyi anyagok által a *Lemna* (békalencse) nemzetséghez tartozó édesvízi növényekre kifejtett toxikus hatás meghatározására szolgál. A módszer meglévő módszereken (1)(2)(3)(4)(5)(6) alapul, de azoktól több kulcsfontosságú kérdés tekintetében, a legfrissebb kutatási eredmények és szakmai egyeztetések figyelembevételére érdekében eltér. A vizsgálati módszer validálása nemzetközi körvizsgálattal (7) történt.

2. A vizsgálati módszer *Lemna gibba* és *Lemna minor* felhasználásával végzendő toxicitási vizsgálatot ír le; mindkét fajon számos vizsgálatot végeztek, és a fent említett szabványosított vizsgálatok is ezekre vonatkoznak. A *Lemna* nemzetség rendszertana nehezen leírható, amit tovább bonyolít a létező fenotípusok nagy száma. Bár a *Lemna* nemzetségben a genetikai eltérések a toxikus anyagokkal szembeni viselkedés változatosságát eredményezhetik, erről a változóról egyelőre kevés adat áll rendelkezésre ahhoz, hogy az ismertető eljárás keretében konkrét klón használatát ajánlhassunk. Megjegyzendő, hogy a vizsgálat nem steril körülmények között zajlik, de az eljárás egyes szakaszaiban erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy más élő szervezetek zavaró hatása a lehető legkisebb legyen.
3. Az alábbiakban részletesen ismertetjük a vizsgálati oldat cseréjével végzett (félstatikus és állandó áramlású) és a vizsgálati oldat cseréje nélkül végzett (statikus) vizsgálatokat. A vizsgálat céljától és a jogszabályi követelményektől függően a félstatikus és az átfolyásos vizsgálat alkalmazását például az oldatból gyorsan eltávozó (illékony, fény hatására lebomló, kicsapódó vagy biológiailag lebomló) vegyi anyagok esetén érdemes megfontolni. További iránymutatást a (8) irodalom tartalmaz.
4. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

5. Exponenciálisan növekedő, a *Lemna* nemzetséghez tartozó növénytenyészeteket monokultúráként hét napig növekedni hagyunk a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak jelenlétében. A vizsgálat célja: a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált vegyi anyag vegetatív növekedésre gyakorolt hatásának számszerű kifejezése alkalmasan megválasztott mérési változók értékelése alapján. Elsődleges mérési változóként a levélszám szolgál. Emellett legalább még egy mérési változót (a levelek összterületét, a száraz tömeget vagy a nedves tömeget) is mérni kell, mert bizonyos vegyi anyagok más mérési változókat sokkal inkább befolyásolnak, mint a levélszámot. A vizsgált vegyi anyag hatásainak számszerű kifejezése érdekében a vizsgálati oldatban bekövetkező növekedést összehasonlítjuk a kontrolltenyészetben bekövetkező növekedéssel, és meghatározzuk azt az EC_x (például EC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.
6. A vizsgálat végpontjaként a növekedésgátlás szolgál, amelyet a mérési változóban az expozíciós idő alatt bekövetkező logaritmikus növekedéssel (az átlagos fajlagos növekedési sebességgel) fejezünk ki. A kísérleti oldatsorozattal mért átlagos fajlagos szaporodási sebességekből meg kell határozni azt a koncentrációt, amely a szaporodási sebességet adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt $E_t C_x$ -ként (pl. $E_t C_{50}$) kell kifejezni.
7. Az eljárás másik hatásváltozója a szaporulat, amelyre bizonyos országok esetében a jogszabályi követelmények teljesítéséhez lehet szükség. A szaporulat a mérési változóknak az expozíciós idő végén érvényes értéke és az expozíciós idő kezdetén érvényes értéke közötti különbséget jelenti. A vizsgálati oldatok tekintetében egyenként kiszámított szaporulatok alapján meghatározzuk azt az $E_y C_x$ (például $E_y C_{50}$) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.
8. Statisztikai eljárással meghatározható továbbá az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. Rendelkezésre kell állnia egy olyan analitikai eljárásnak, amellyel a vizsgálati oldatban lévő vegyi anyag mennyisége kellő pontossággal meghatározható.
10. A vizsgálati körülmények rögzítése érdekében célszerű lehet tájékozódni többek között a vizsgált anyag szerkezeti képletéről, tisztaságáról, vízben való oldhatóságáról, vízben és fény hatására tanúsított stabilitásáról, pK_a és K_{ow} értékéről, gőznyomásáról és biológiai lebonthatóságáról. A vízben való oldhatóságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, mennyire kell arra számítani, hogy a vizsgálat során a vizsgált vegyi anyag jelentős mennyiségben eltávozik. Ennek alapján eldönthető, kell-e külön gondoskodni az így adódó veszteségek ellensúlyozásáról. Ha a vizsgált vegyi anyag oldhatóságára és stabilitására vonatkozó információk bizonytalanok, célszerű ezeket a vizsgálat körülményei, azaz a vizsgálati oldat, hőmérséklet és fényviszonyok mellett meghatározni.

11. Ha különösen fontos a vizsgálati oldat pH-értékének szabályozása, például könnyen hidrolizálódó fémek vagy egyéb vegyi anyagok vizsgálata esetén, akkor ajánlatos a vizsgálati oldatot pufferral kiegészíteni (lásd a 21. pontot). A (8) irodalom további iránymutatást ad olyan vegyi anyagok vizsgálatához, amelyek fizikai-kémiai jellegzetességeiknél fogva nehezen vizsgálhatók.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

12. A vizsgálat akkor érvényes, ha a kontrolltenyészetben a levélszám megkettőződési ideje 2,5 napnál (60 óránál) kisebb, ami hét nap alatt körülbelül hétszeres növekedést, illetve 0,275 1/nap átlagos fajlagos növekedési sebességet jelent. A jelen módszerben ismertetett vizsgálati oldat és vizsgálati körülmények alkalmazása esetén ez a feltétel statikus vizsgálattal kielégíthető (5). Várható, hogy a feltétel félstatikus és állandó áramlású vizsgálat esetén is kielégíthető. A megkettőződési idő számítását a 49. pont ismerteti.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

13. A vizsgálati eljárás referencia-vegyianyag(ok), mint például a nemzetközi körvizsgálatban (7) alkalmazott 3,5-diklór-fenol segítségével ellenőrizhető. Referencia-vegyianyaggal legalább évente kétszer (ha ennél ritkábban végzünk vizsgálatot, akkor a vizsgált vegyi anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan mindig) ajánlott vizsgálatot végezni.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

14. Minden, a vizsgálati oldattal érintkező eszköz üvegből vagy más, kémiaiilag semleges anyagból legyen. A tenyésztés és a vizsgálat céljára felhasznált üvegeszközök sterilnek legyenek, és meg kell őket tisztítani minden olyan kémiai szennyeződéstől, amely a vizsgálati oldatba bemosódhatna. A vizsgálati edények legyenek kellően szélesek ahhoz, hogy a kontrolltenyészetekben a különböző telepek levelei a vizsgálat végéig átfedésmentesen növekedhessenek. Nem jelent problémát, ha a gyökér az edény alját éri, de ajánlatos legalább 20 mm mélységű és legalább 100 ml térfogatú vizsgálati edényeket alkalmazni. Ha ezek a feltételek teljesülnek, a vizsgálati edények megválasztása nem kritikus. A korábbiakban a kellő méretű üveg főzőpoharak, kristályosító tégelyek és üveg Petri-csészék egyaránt alkalmasnak bizonyultak. A vizsgálati edényeket a párolgás és a véletlen szennyeződések megakadályozása érdekében le kell fedni oly módon, hogy a levegő cserélődhessen. A vizsgálati edény, különösen pedig a fedő lehetőleg ne keltsen árnyékot vagy okozza a fény spektrális jellemzőinek módosulását.
15. A tenyészeteket és a vizsgálati edényeket ne tartsuk együtt. A legjobb megoldás, ha külön környezeti növesztőkamrákat, inkubátorokat vagy helyiségeket veszünk igénybe. A fényviszonyok és a hőmérsékletek szabályozhatók legyenek, és állandó szinten kell őket tartani (lásd a 35-36. pontot).

Vizsgált szervezet

16. A vizsgálat során *Lemna gibba* vagy *Lemna minor* egyedeket kell használni. A toxicitási vizsgálatokhoz korábban már felhasznált békalencsefajok rövid leírását az 2. függelék adja meg. A növényanyag törzsgyűjteményből, más laboratóriumból vagy a terepről nyerhető. A terepről származó növényanyag tenyésztését felhasználás előtt legalább nyolc hétig a vizsgálat során alkalmazandóval megegyező tápoldatban kell tartani. A tenyészet kialakításához a növényanyagot nyilvánvaló szennyeződéstől mentes helyszínről kell begyűjteni. A más laboratóriumból vagy törzsgyűjteményből származó növényanyagot legalább három hétig kell hasonló körülmények között tartani. A mérési jegyzőkönyvben mindig rögzíteni kell a növényanyag eredetét és a vizsgálatához felhasznált fajt és klónt (ha ismert).
17. Olyan monokultúrát használjunk, amelyet más élő szervezetek, például algák vagy egysejtűek szemmel érzékelhető módon nem szennyeznek. Az egészséges *L. minor* növények kettő-öt levélből állnak, míg a *L. gibba* egészséges telepei akár hét levelet is tartalmazhatnak.
18. A vizsgálat során felhasznált növények minősége és egységessége jelentősen befolyásolja a vizsgálat eredményeit, ezért megválasztásuk során kellő gondossággal kell eljárni. Fiatal, gyorsan növekvő, látható sérüléstől és fakulástól (klorózistól) mentes egyedeket kell felhasználni. A jó minőségű tenyészetet az jellemzi, hogy nagy arányban tartalmaz legalább két levélből álló telepeket. A sok egyedülálló levél kedvezőtlen környezeti körülményekre, például tápanyaghiányra utal, ezért ilyen tenyészetekből vett egyedeket nem szabad a vizsgálatban felhasználni.

Tenyésztés

19. Az átoltás gyakoriságának csökkentése érdekében (például ha egy ideig előreláthatóan nem végzünk *Lemna*-vizsgálatokat) a tenyésztés csökkentett fényviszonyok mellett és hőmérsékleten (4–10 °C) tartható. A tenyésztés körülményeit részletesen a 3. függelék ismerteti. Ha olyan nyilvánvaló jeleket figyelünk meg, amelyek algák vagy más élő szervezetek okozta szennyeződésre utalnak, akkor a *Lemna*-levelek egy részét felületi sterilizálásnak kell alávetni, majd másik oldatba kell áthelyezni (lásd a 3. függelékét). Ebben az esetben a fennmaradó szennyezett kultúrát meg kell semmisíteni.
20. A vizsgálatok előtt legalább hét nappal elegendő mennyiségű telepet csíramentesen friss, steril oldatba kell áthelyezni, majd hét–tíz napon át a vizsgálatnak megfelelő körülmények között tartani.

Vizsgálati oldat

21. *Lemna minor* és *Lemna gibba* esetén eltérő oldatot ajánlott alkalmazni az alábbiak szerint. Kellő körültekintéssel meg kell fontolni pH-puffer alkalmazását a vizsgálati oldatban (MOPS (4-morfolinpropánszulfonsav, CAS-szám: 1132-61-5 a *L. minor* és NaHCO₃ a *L. gibba* vizsgálati oldatában), ha gyanítható, hogy az oldat reakcióba léphet a vizsgált anyaggal és befolyásolhatja a toxikus hatást. Az érvényességi kritériumok betartása mellett Steinberg-féle tápoldat (9) is alkalmazható.
22. A *L. minor* tenyésztése és vizsgálata során a svéd szabvány (SIS) szerinti *Lemna*-tápoldat módosított változatát ajánlott alkalmazni. E tápoldat összetételét a 4. függelék ismerteti.
23. A *L. gibba* tenyésztése és vizsgálata során a 4. függelék szerinti 20X–AAP tápoldatot ajánlott alkalmazni.
24. A 4. függelék szerinti Steinberg-féle tápoldat ugyancsak alkalmas *L. minor* esetén, és az érvényességi kritériumok betartása mellett *L. gibba* esetén is alkalmazható.

Vizsgálati oldatok

25. A vizsgálati oldatokat általában törzsoldat hígításával állítjuk elő. A vizsgált vegyi anyag törzsoldatait általában úgy készítjük, hogy a vegyi anyagot tápoldatban feloldjuk.
26. A vizsgált vegyi anyag legnagyobb vizsgálati koncentrációja általában ne haladja meg a vegyi anyag vizsgálati körülmények között érvényes vízben való oldhatóságát. Megjegyzendő azonban, hogy a *Lemna* nemzetség egyedei a víz felszínén úsznak, ezért olyan vegyi anyagok hatásának is ki lehetnek téve, amelyek jellemzően a víz és a levegő határfelületén fordulnak elő (például vízben nehezen oldódó vagy víztaszító vegyi anyagok, felületaktív vegyi anyagok). Ilyenkor az expozíció nem a vizsgálati oldatban lévő anyag következtében áll elő, és a vizsgálati koncentráció a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől függően meghaladhatja a vízben való oldhatóságot. Vízben kismértékben oldódó vizsgált vegyi anyag esetén szükséges lehet szerves oldó- vagy diszpergálószer alkalmazásával nagy koncentrációjú törzsoldatot vagy -diszperziót készíteni annak érdekében, hogy könnyebb legyen a vizsgált vegyi anyagból a pontos mennyiséget a vizsgálati oldathoz adagolni, és könnyebben végbemenjen az oldódás vagy a diszperzióképződés. Ilyen anyag alkalmazását lehetőség szerint kerülni kell. A segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása nem járhat fitotoxikus hatással. A széles körben alkalmazott oldószerek közül például az aceton vagy a dimetil-formamid 100 µl/l koncentrációig nem okoz fitotoxikus hatást. Az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer végső koncentrációja – amelyet a mérési jegyzőkönyvben rögzíteni kell – a lehető legkisebb legyen (≤ 100 µl/l), és az oldó- vagy diszpergálószer a vizsgálathoz és a kontrolltenyésztés esetében azonos koncentrációban kell alkalmazni. A (8) irodalom bővebb iránymutatást ad a diszpergálószerre vonatkozóan.

Vizsgálati csoportok és kontrollcsoportok

27. A vizsgált vegyi anyag *Lemna*-fajokra gyakorolt toxikus hatásának előzetes ismerete alapján, amely származhat például koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatból, megválaszthatók az alkalmas vizsgálati koncentrációk. A végleges toxicitási vizsgálatnak általában öt, egymással mértani sorozatot alkotó vizsgálati koncentrációra kell kiterjednie. A koncentrációk sorozatának hányadosa általában ne legyen 3,2-nél nagyobb, de lapos koncentráció-válasz görbe esetén ennél nagyobb érték lehet indokolt. Ötnél kevesebb koncentráció alkalmazását indokolni kell. Minden koncentrációval legalább három ismétlést kell megvizsgálni.

28. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során (akár a koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatot, akár a végleges vizsgálatot megelőzően) a következőket célszerű megfontolni:
- EC_x meghatározása esetén a kellő konfidenciaszint biztosítása érdekében a vizsgálati koncentrációknak közre kell fogniuk az EC_x értékét. Ha például az EC_{50} értéket kívánjuk meghatározni, akkor a legnagyobb vizsgálati koncentrációnak nagyobbak kell lennie EC_{50} -nél. Ha az EC_{50} kívül esik a vizsgálati koncentrációk tartományán, akkor a kiadódó konfidenciaintervallumok szélesek lesznek, és előfordulhat, hogy nem végezhető el a modell statisztikai illesztése.
 - LOEC és/vagy NOEC meghatározása esetén a legkisebb vizsgálati koncentráció legyen elegendően kicsiny ahhoz, hogy a növekedési sebesség ne legyen jelentősen kisebb, mint a kontrollcsoportban. A legnagyobb koncentráció ugyanakkor legyen elegendően nagy ahhoz, hogy a növekedési sebesség jelentősen kisebb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ha ez nem teljesül, a vizsgálatot más koncentrációtartománnyal meg kell ismételni (kivéve akkor, ha a legnagyobb koncentráció megegyezik az oldhatósági határral vagy az előírt maximális határkoncentrációval, például 100 mg/l-rel).
29. Az egyes vizsgálatok mellett kontrolltenyészeteket is kell vizsgálni a vizsgálati edényekével megegyező táptalaj, levél- és telepszám, környezeti körülmények és eljárások alkalmazásával, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása esetén egy további kontrolltenyészet is szükséges, amelyben az oldó- vagy diszpergálószer azonos koncentrációban van jelen, mint a vizsgálati edényekben. Legalább a koncentrációnként alkalmazott edényszámmal megegyező, ideális esetben kétszer annyi ismétlést (illetőleg szükség szerint oldószeres edényt) kell alkalmazni.
30. Ha nem kívánjuk meghatározni az NOEC értékét, a vizsgálati terv módosítható oly módon, hogy több koncentrációt, de koncentrációnként kevesebb ismétlést tartalmazzon. A kontroll ismétlések száma azonban ilyenkor is legalább három legyen.

Expozíció

31. Kettő–négy látható levélből álló telepeket a kiindulási tenyészetből csíramentesen a kísérleti edényekbe helyezünk, véletlenszerűen elosztva. A kísérleti edényekbe egyenként összesen 9–12 levél kerüljön. Minden kísérleti edényben azonos számú levél és telep legyen. A módszer alkalmazása és a körvizsgálat során szerzett tapasztalatok azt mutatják, hogy a készítmények közötti, a növekedési sebesség alapján meghatározott növekedésgátlás 4–7 %-os értékének (a szaporulat alapján meghatározott növekedésgátlás 10–15 %-os értékének) megfelelő nagyságú növekedéskülönbség kimutatásához elegendő, ha készítményenként három ismétlést és edényenként 9–12 kiindulási levelet alkalmaznak (7).
32. Az inkubátorban a kísérleti edényeket véletlenszerű elrendezésben kell elhelyezni annak érdekében, hogy a fényerő és a hőmérséklet térbeli változatossága minél kisebb hatást gyakoroljon a vizsgálatokra. A megfigyelések végzésekor (vagy gyakrabban) az edényeket véletlenszerűen vagy blokkonkénti kiosztási terv alapján át kell rendezni.
33. Ha az előzetesen elvégzett stabilitásvizsgálatok azt jelzik, hogy a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálat időtartama (7 nap) alatt nem tartható fenn (azaz a mért koncentráció a kezdeti mért koncentráció 80 %-a alá csökken), akkor félstatikus vizsgálatot ajánlatos végezni. Ennek keretében a telepeket a vizsgálat során legalább két alkalommal (a 3. és az 5. napon) friss vizsgálati és kontrolloldatokba kell helyezni. A friss oldatba helyezés gyakorisága a vizsgált vegyi anyag stabilitásától függ; nagymértékben instabil vagy illékony vegyi anyagok esetén a közel állandó koncentráció fenntartása gyakoribb oldatcserét igényelhet. Bizonyos esetekben állandó áramlású vizsgálatot célszerű végezni (8)(10).
34. Ez az eljárás nem tartalmazza a levélre történő felvitellel (permetezéssel) megvalósuló expozíciót; erről lásd a (11) irodalmat.

Inkubációs körülmények

35. Folyamatos meleg- vagy hidegféhr fluoreszcens megvilágítást alkalmazunk oly módon, hogy a fotoszintetikusan aktív sugárzásban (400–700 nm), a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban lévő pontokban mért fényerő a 85–135 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ tartományban előzetesen felvett értéknek feleljen meg (ez 6 500–10 000 lux értéket jelent). A vizsgálat területén a fényerő az előzetesen felvett értéktől legfeljebb ± 15 %-kal térhet el. A fényerő érzékelésére és mérésére szolgáló módszer, különösen pedig a fényérzékelő befolyásolja a mért értéket. A gömbérzékelők (amelyek a mérési sík alatt és felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) és a »koszinuszos« érzékelők (amelyek csak a mérési sík felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) előnyben részesítendő az egytengelyű érzékelőkkel szemben, mert a jelen módszerben előírt többpontos fényforrás esetén nagyobb értékeket szolgáltatnak.

36. A vizsgálati edényekben a hőmérséklet 24 ± 2 °C legyen. A vizsgálat során a kontrolltenyészet tápoldatának pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Az 1,5-nél nagyobb eltérés ugyanakkor nem teszi érvénytelenné a vizsgálatot, ha kimutatható, hogy az érvényességi feltételek teljesülnek. A pH-érték eltolódása egyes különleges esetekben, például instabil vegyi anyag vagy fém vizsgálata esetén fokozott körültekintést tesz szükségessé. További iránymutatást a (8) irodalom tartalmaz.

Időtartam

37. A vizsgálat a növények vizsgálati edényekbe helyezése után 7 nappal fejeződik be.

Mérések és analitikai vizsgálatok

38. A vizsgálat kezdetén meg kell számlálni a vizsgálati edényekben lévő leveleket, és az értéket fel kell jegyezni a mérési jegyzőkönyvben; a számlálás során ügyelni kell arra, hogy a kiálló, vizuálisan elkülönülő leveleket vegyük figyelembe. A szabályszerűnek vagy rendellenesnek tűnő levelek számát a vizsgálat kezdetén, az expozíció időtartama alatt legalább háromnaponta (azaz a hét nap során legalább kétszer), valamint a vizsgálat végén kell meghatározni. Fel kell jegyezni a növények fejlődésében beálló változásokat, például a levélméret vagy a megjelenés változásait, a nekrozízra, a klorózisra, a púposágra utaló jeleket, a telepek felbomlását vagy az úszóképesség megszűnését, a gyökerek hosszának vagy megjelenésének megváltozását. Fel kell továbbá jegyezni a vizsgálati oldat jellegzetességeit (például oldatlan anyag jelenléte, algaképződés a vizsgálati edényben) is.
39. A vizsgálat során a levélszám mellett a vizsgált vegyi anyagnak a következő mérési változók közül legalább egy továbbira gyakorolt hatását is meg kell határozni:
- a levelek összterülete,
 - száraz tömeg,
 - nedves tömeg.
40. A levelek összterülete azért előnyös mérési változó, mert a vizsgálat kezdetén, folyamán és végén minden vizsgálati és kontrolltenyészetre külön-külön meghatározható. A száraz és a nedves tömeget a vizsgálat elején a vizsgálatban alkalmazandó kiindulási tenyészet szempontjából reprezentatív mintán, majd a vizsgálat végén az egyes vizsgálati és kontrolltenyészetek növényanyagán kell meghatározni. Ha a levélfelületet nem mérjük, a száraz tömeg mérését előnyben kell részesíteni a nedves tömeg mérésével szemben.
41. A levelek összterülete, a száraz tömeg és a nedves tömeg a következőképpen határozható meg:
- A levelek összterülete:* A telepekben előforduló levelek összterülete meghatározható képelemzés segítségével. Videokamerával (például az edényt világító testre helyezve) rögzíthetők a vizsgálati edény és a növények körvonalai, majd a kiadódó kép digitalizálható. Ismert területű síkidomokhoz hasonlítva meghatározható a vizsgálati edényekben lévő levelek összterülete. Kellő gondossággal ki kell küszöbölni a vizsgálati edény pereme miatti zavarás hatását. Másik, munkaigényesebb lehetőség, ha a vizsgálati edényeket és a növényeket lefényképezzük, a kiadódó körvonalak mentén kivágjuk az alakokat, majd levélterület-elemzővel vagy milliméterpapíron meghatározzuk a levélterületet. Egyéb technikák (például a papírból kivágott terület egységnyi területű idomokhoz hasonlítása a tömegek összevetése alapján) ugyancsak megoldást jelenthetnek.
 - Száraz tömeg:* A telepeket összegyűjtjük a vizsgálati edényekből, desztillált vagy ionmentesített vízzel leöblítjük őket, leitatjuk a felesleges vizet, és a telepeket 60 °C-on tömegállandóságig hevítjük. A kapcsolódó gyökereket nem távolítjuk el. A száraz tömeget legalább 0,1 mg pontossággal kell kifejezni.
 - Nedves tömeg:* A telepeket előzetesen megmért tömegű, kerek aljukon kis (1 mm-es) lyukakkal ellátott polisztirol (vagy más kémiaiilag semleges anyagból készült) csövekbe helyezük. A csöveket ezt követően 3 000 1/perc fordulatszámon, szobahőmérsékleten 10 percig centrifugáljuk. Megmérjük a most már szárított telepeket tartalmazó csövek tömegét, és a nedves tömeget az üres csövek tömegének levonásával nyerjük.

A mérések és az analitikai vizsgálatok gyakorisága

42. Statikus vizsgálat esetén a vizsgálat elején és végén megmérjük az egyes készítmények pH-értékét. Félstatikus vizsgálat esetén a pH-értéket minden oldatcseré alkalmával meghatározzuk mind a friss, mind az elhasznált oldaton.

43. A fényerőt a növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban elhelyezkedő pontokban mérjük. Fényerőt a vizsgálat során legalább egyszer kell mérni. A növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben azonos körülmények között külön erre a célra tartott edényben legalább naponta mérjük a tápoldat hőmérsékletét.
44. A vizsgálat során alkalmas időközönként meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját. Statikus vizsgálat esetén a koncentrációt legalább a vizsgálat elején és végén kell meghatározni.
45. Félstatikus vizsgálat esetén, ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja várhatóan nem marad a névleges koncentráció ± 20 %-os környezetében, akkor minden friss vizsgálati oldatot elkészítéskor, továbbá minden lecserélt oldatot analitikai vizsgálatnak kell alávetni (lásd a 33. pontot). Olyan vizsgálatok esetén ugyanakkor, amelyekben a vizsgált vegyi anyag mért kezdeti koncentrációja ugyan nem a névleges koncentráció ± 20 %-os környezetében van, de adatokkal kellően bizonyítható, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentráció 80–120 %-os környezetében vannak), akkor az analitikai vizsgálatokat elegendő csak a legkisebb és a legnagyobb vizsgálati koncentráción elvégezni. Az oldatcsere előtt a vizsgált vegyi anyag koncentrációját minden esetben elegendő vizsgálati koncentrációnként egy ismétlésen (vagy az edények ismétlésenként egyesített tartalmán) elvégezni.
46. Állandó áramlású vizsgálat esetén a félstatikus vizsgálatához hasonló rendben, így a vizsgálat elején, felénél és végén kell mintákat venni, de ilyenkor nincs értelme az »elhasznált« oldat vizsgálatának. Átfolyásos vizsgálat esetén naponta ellenőrizni kell az oldószer és a vizsgált vegyi anyag vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldata adagolási sebességét.
47. Ha kimutatható, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálat időtartama alatt sikerült a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció ± 20 %-os környezetében tartani, akkor az eredmények a névleges vagy mért kezdeti értékek alapján elemezhetők. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés meghaladja a ± 20 %-ot, akkor az eredményeket az expozíció idején érvényes koncentrációértékek mértani középértéke vagy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (8).

Határérték-vizsgálat

48. Bizonyos körülmények között, például amikor egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs toxikus hatása 100 mg/l koncentrációig, vagy a kísérleti oldatban való oldhatósága határáig (amelyik a kettő közül kisebb), határérték-vizsgálat végezhető, amely egy kontrollcsoport és egy kezelt csoport (100 mg/l-es vagy az oldhatósági határral megegyező koncentrációval) szaporodási viselkedésének összehasonlítását jelenti. A vizsgálat során fokozottan ajánlatos elemezni az expozíció koncentrációját. A határérték-vizsgálat során biztosítani kell valamennyi fent leírt vizsgálati körülmény fennállását és érvényességi feltétel teljesülését azzal az eltéréssel, hogy kétszer annyi kezelt ismétlést kell vizsgálni. A kontrollcsoportban és az expozíciónak kitett csoportban tapasztalt növekedés olyan statisztikai próbával (például a Student-féle t-próbával) elemezhető, amely a középértékek összehasonlításán alapul.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Megkettőződési idő

49. A vizsgálat során a levélszám megkettőződéséhez szükséges T_d idő meghatározásához és az erre vonatkozó érvényességi feltétel (lásd a 12. pontot) ellenőrzéséhez a kontrolltenyészetek adataira a következő összefüggést kell alkalmazni:

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

ahol μ az 54–55. pont szerint meghatározott átlagos fajlagos növekedési sebesség.

Hatásváltozók

50. A vizsgálat célja annak meghatározása, milyen hatást gyakorol a vizsgált vegyi anyag a *Lemna*-telepek vegetatív növekedésére. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót tartalmaz, mert a különböző jogrendszerek preferenciái és szabályozási igényei eltérőek. Hogy a vizsgálati eredmények valamennyi jogrendszerben elfogadhatók legyenek, a hatást mindkét alábbi hatásváltozó alapján meg kell határozni.
- a) *Átlagos fajlagos növekedési sebesség*: ezt a hatásváltozót a levélszám logaritmusának, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) logaritmusának napi változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozícióknak kitett tenyészetek figyelembevételével. Ezt a mennyiséget relatív növekedési sebességnek is nevezik (12);
- b) *Szaporulat*: ezt a hatásváltozót a levélszám, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékének változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozícióknak kitett tenyészetek figyelembevételével.
51. Megjegyzendő, hogy a két hatásváltozó alapján számított toxicitásértékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. A jelen vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttéré következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_yC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a szaporulaton alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag más jelent. Az átlagos fajlagos növekedési sebesség a békalcse korlátozatlan tenyészetekben tanúsított általános exponenciális növekedési mintáján alapul, és a toxicitást a növekedési sebességre kifejtett hatás alapján, a kontrolltenyészetekben tapasztalható növekedési sebesség abszolút nagyságától, a koncentráció-válasz görbe meredekségétől és a vizsgálat időtartamától függetlenül becsli. A szaporulatból származtatott eredmények ezzel szemben mindezeketől a változóktól is függenek. Az E_yC_x függ az egyes vizsgálatokban használt békalcsefajok fajlagos szaporodási sebességétől és a legnagyobb fajlagos növekedési sebességétől, ami a fajok, sőt még különböző klónok között is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem alkalmas az egyes békalcsefajok vagy klónok toxikus hatással szembeni érzékenységében fennálló különbségek megítélésére. Bár tudományos szempontból a toxikus hatást indokoltabb az átlagos fajlagos növekedési sebességéből meghatározni, ez a vizsgálati módszer a szaporulaton alapuló toxicitászámítást is tartalmazza, mert egyes jogrendszerek hatályos jogszabályi követelményei ezt is szükségessé teszik.
52. A toxicitást a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) alapján is meg kell határozni, mert bizonyos vegyi anyagok egy másik mérési változót sokkal erősebben befolyásolhatnak, mint a levélszámot. Ez a hatás nem volna kimutatható, ha csak a levélszámból indulnánk ki.
53. A levélszám, valamint a többi feljegyzett mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékét az egyes mérések alkalmával a vegyi anyag koncentrációértékei szerint táblázatba kell rendezni. A további adatelemzés, azaz az LOEC, az NOEC vagy az EC_x meghatározása során az ismétlések külön-külön vett adataiból, nem pedig az egyes kezelési csoportok középértékéből kell kiindulni.

Átlagos fajlagos növekedési sebesség

54. Az adott időszakhoz tartozó átlagos fajlagos növekedési sebességet a növekedést leíró változók (levélszám, valamint egy további mérési változó: a levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) logaritmusának növekedéseként számítjuk a vizsgálati és a kontrolltenyészetek minden egyes példányára külön-külön, a következő összefüggés szerint:

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

ahol:

— μ_{i-j} : az átlagos fajlagos növekedési sebesség az »i«-tól a »j« időpillanatig

— N_i : a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben az »i« időpillanatban

- N_j : a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben a »j« időpillanatban
- t : az »i«-től »j«-ig terjedő időtartam

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a szaporodási sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

55. Az átlagos fajlagos növekedési sebességet a vizsgálat teljes időtartamára (tehát úgy, hogy a fenti összefüggésben »i« a vizsgálat kezdetét, »j« a vizsgálat végét jelöli) kell meghatározni. Minden egyes vizsgálati koncentrációra és kontrollcsoportra meg kell határozni az átlagos fajlagos növekedési sebesség középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Emellett (például a növekedési görbék logaritmikus transzformáltjának szemügyre vételével) becslést kell adni a növekedési sebesség szakaszonkénti értékére is annak érdekében, hogy megítélhető legyen a vizsgált vegyi anyag által az expozíciós időszak folyamán kifejtett hatás. Ha a szakaszonkénti növekedési sebesség és az átlagos növekedési sebesség között nagy különbséget tapasztalunk, az azt jelenti, hogy a növekedés mintája erősen eltér az állandó kitevőjű exponenciális növekedéstől és különösen ajánlott a növekedési görbék részletes vizsgálata. Ilyenkor a biztonság javára járunk el, ha az összehasonlítást a legnagyobb gátlás időszakában a vizsgált tenyészetekben és az ugyanebben az időszakban a kontrolltenyészetekben tapasztalt fajlagos növekedési sebesség között végezzük.
56. A növekedési sebesség (I_r) százalékos gátlását ezután vizsgálati koncentrációnként (kezelési csoportonként) a következő összefüggésből kell meghatározni:

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

ahol:

- $\% I_r$: az átlagos fajlagos növekedési sebesség százalékos gátlása
- μ_C : a μ középértéke a kontrollcsoportban
- μ_T : a μ középértéke a vizsgált csoportban

Szaporulat

57. A szaporulatra gyakorolt hatást vizsgálati edényenként, két mérési változó: a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) vizsgálat kezdetén és vizsgálat végén mért értékekből számítjuk. A száraz tömeg és a nedves tömeg esetében a kezdeti élőanyagtömeget a vizsgálati edények tartalmának összeállításához (lásd a 20. pontot) használt tételből származó levelekből vett mintán határozzuk meg. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén kiszámítjuk a szaporulat középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Az egyes kezelési csoportok vonatkozásában a szaporulatra vonatkozó átlagos százalékos gátlás ($\% I_y$) az alábbiak szerint számítható ki:

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

ahol:

- $\% I_y$: a szaporulat százalékos csökkenése
- b_c : az élőanyagtömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kontrollcsoportban
- b_T : az élőanyagtömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a vizsgált csoportban

A koncentráció-válasz görbék elkészítése

58. El kell készíteni a hatásváltozóhoz tartozó átlagos százalékos gátlás értékét (az 56., illetve az 57. pontban bemutatottak szerint számított I_r vagy I_y értéket) a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának logaritmusában ábrázoló koncentráció-válasz görbéket.

Az EC_x becslése

59. Az EC_x (például EC_{50}) becslését mind az átlagos fajlagos növekedési sebesség ($E_r C_x$), mind a szaporulat ($E_y C_x$) alapján el kell végezni, amelyeket viszont a levélszámból és egy további mérési változóból (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) egyaránt ki kell számítani. Ez azért szükséges, mert egyes vizsgált vegyi anyagok a levélszámra és a második mérési változóra eltérő hatást gyakorolnak. Ennek megfelelően tehát minden x gátlási szinthez négy EC_x toxicitási paramétert állítunk elő: $E_r C_x$ (levélszám); $E_r C_x$ (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg); $E_y C_x$ (levélszám); and $E_y C_x$ (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg).

Statisztikai eljárások

60. A statisztikai számítások célja, hogy regressziószámítással kvantitatív koncentráció-válasz összefüggést állítsunk elő. Lehetőség van arra, hogy a hatásváltozók – például probit-, logit- vagy Weibull-modell (13) szerinti – lineáris transzformálását követően súlyozott lineáris regressziót végezzünk, de előnyösebb inkább nemlineáris regressziót alkalmazni, mert ez jobban kezeli az adatok elkerülhetetlen irregularitását és a sima eloszlástól való eltérést. A nulla és a teljes gátlás környezetében az irregularitást a transzformáció felnagyíthatja, ami a számítás szempontjából előnytelen (13). Megjegyzendő, hogy a probit-, logit- vagy Weibull-transzformáltat alkalmazó szokásos számítási módszerek elsősorban kvantált (például mortalitási vagy túlélési) adatok feldolgozására alkalmasak, így módosítást igényelnek, ha a növekedési sebességre vagy a szaporulatra kívánjuk őket alkalmazni. Az EC_x -értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszereket a (14), (15) és (16) irodalom ismerteti.
61. Az EC_x értékek pontbecsléseinek kiszámításához a koncentráció-válasz összefüggést kell használni minden elemzendő hatásváltozóra. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásváltozók regressziós modellhez illeszkedésének jószágát grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regressziószámítást az egyes vizsgálati edényeken nyert értékekkel, nem pedig a vizsgálati csoportok középértékével kell elvégezni.
62. Ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem alkalmasak a konkrét adatok elemzésére, az EC_{50} -re vonatkozó becsléseket és a konfidenciahatárokat »bootstrap« módszerrel együtt alkalmazott lineáris interpolációval (17) is előállíthatjuk.
63. Az LOEC, és így az NOEC becsült értékének előállítása érdekében varianciaanalízis (ANOVA) segítségével összevetjük az egyes készítményekhez tartozó középértékeket. Az egyes koncentrációkhoz tartozó középértékeket ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbával a kontrollcsoporton nyert középértékhez hasonlítjuk. Hasznos lehet a Dunnett- és a Williams-próba alkalmazása (18)(19) (20)(21). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ezt az ellenőrzést grafikusan vagy formális próbával (22) végezhetjük. A Levene- és Bartlett-féle próbák megfelelőek ehhez. A szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevés nem teljesülése gyakran kiküszöbölhető az adatok logaritmikus transzformálásával. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lépésenkénti Jonkheere-trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatást ad a (16) irodalom.
64. Az újabb keletű tudományos eredmények az NOEC-konceptió elhagyásának ajánlásához és az EC_x regresszió alapuló pontbecsléssel történő meghatározásával való helyettesítéséhez vezettek. Ehhez a Lemma-vizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10} -et, mind az EC_{20} -at megadni a mérési jegyzőkönyvben.

Jelentéstétel

65. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- fizikai jelleg és fizikokémiai tulajdonságok, vízben való oldhatósági határ;
- kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság (szennyeződések).

A vizsgálathoz felhasznált faj:

- tudományos név, klón (ha ismert) és eredet.

Vizsgálati körülmények:

- alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus, félstatikus vagy állandó áramlású);
- a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama;
- vizsgálati oldat;
- a kísérleti terv ismertetése: vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, telep- és levélszámok vizsgálati edényenként a vizsgálat megkezdésekor;
- vizsgált koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és az ismétlések száma koncentrációnként;
- a törzs- és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer;
- hőmérséklet a vizsgálat folyamán;
- fényforrás, a fény ereje és homogenitása;
- a vizsgálati és a kontrolloldatok pH-értékei;
- a vizsgált vegyi anyag koncentrációi és az analízis módszere a megfelelő minőségellenőrzési adatokkal együtt (az érvényesség vizsgálata, a szórás vagy az analízis konfidenciahatára);
- a levélszám és a további mérési változók (száraz tömeg, nedves tömeg vagy levélterület) meghatározásának módszere;
- a jelen vizsgálati módszertől való esetleges eltérések.

Eredmények:

- nyers mérési adatok: levélszám és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolltenyészetben minden adatfelvételkor és analízis alkalmával;
- az egyes mérési változók középértékei és szórásai;
- növekedési görbék minden egyes koncentrációra (logaritmikusan transzformált mérési változókkal ajánlott megadni, lásd az 55. pontot);
- megkettőződési idő, illetve növekedési sebesség a kontrolltenyészetben, a levélszám alapján;
- hatásváltozók számított értéke kezelési ismétlésenként, továbbá ismétlésenként a középérték és a szórásnégyzet;
- a koncentráció-válasz összefüggés grafikus formában;
- a hatásváltozók toxikus végpontjainak becslése, pl. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} és a kapcsolódó konfidenciaintervallumok. Ha kiszámítottuk, az LOEC és/vagy az NOEC értéke, továbbá a számításhoz alkalmazott statisztikai módszer;
- ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség);
- a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés;
- fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek;
- az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

IRODALOM

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«. EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) SSI – Svéd Szabványügyi Intézet. (1995). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).
- (5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 pp.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (9) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet. 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. EPA-600/3-77 108. 1977. szeptember.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 – 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096–1121.
 - (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
 - (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
 - (22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben az alábbi definíciók és rövidítések használatosak:

Élőanyag-tömeg: a populációban lévő élő anyag száraz tömege. A vizsgálat során az élőanyag-tömeg helyett jellemzően helyettesítő mennyiségeket, például levélszámot vagy levélterületet mérünk, és ezekre a helyettesítő mennyiségekre is »élőanyag-tömegként« hivatkozunk.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Klorózis: a levélszövet sárgulása.

Klón: egy adott egyedből ivartalan szaporodással létrejövő szervezet vagy sejt. Az azonos klónhoz tartozó egyedek tehát genetikai szempontból azonosak.

Telep: egymáshoz kapcsolódó anya- és leánylevelek (általában 2–4) összessége. Néha növénynek is nevezik.

EC_x: a vizsgálati oldatban feloldott vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely adott expozíciós idő alatt a *Lemma* növekedésének x %-os (például 50 %-os) csökkenését okozza (az expozíciós időt külön meg kell adni, ha eltér a vizsgálati rendes vagy teljes időtartamától). Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értéket a növekedési sebességből vagy a szaporulatból nyertük-e, növekedési sebesség esetén »E_iC_i«-t, szaporulat esetén »E_sC_s«-t írunk, majd ezt követően megadjuk a mérési változót, például: E_iC (levélszám).

Állandó áramlású vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot folyamatosan cseréljük.

Levél: a békalencse növény egyetlen különálló, »levélszerű« struktúrája. Ez a szaporodásra képes legkisebb egység (egyed).

Púposág: púpos vagy duzzadt megjelenést mutató levelek.

Növekedés: a vizsgálat ideje alatt a mérési változóban (például a levélszámban, a száraz tömegben, a nedves tömegben vagy a levélterületben) bekövetkező növekedés.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyag-tömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontroll-tenyészethez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Mérési változók: minden olyan változó, amelyet a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mérünk. Ebben az eljárásban mérési változó a levélszám, a levélterület, a nedves tömeg és a száraz tömeg.

Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.

Nekrózis: elhalt (például fehér vagy vízzel átitatott) levélszövet.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Fenotípus: az élőlény észlelhető, génjei és a környezet kölcsönhatása által meghatározott jellemzői.

Hatásváltozók: a toxikus hatás becslésére szolgáló, az élőanyag-tömeget leíró mérési változókból különböző számítási módszerekkel származtatott változók. Ebben az vizsgálati módszerben hatásváltozó a növekedési sebesség és a szaporulat, amelyeket a levélszámból, a levélterületből, a nedves tömegből és a száraz tömegből mint mérési változókból származtatunk.

Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecseréljük.

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cseréljük le.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszerrel vizsgált anyag vagy keverék.

A vizsgálat végpontja: az az általános jellemző, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgált vegyi anyag hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben az vizsgálati módszerben a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.

Vizsgálati oldat: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgált növények a vizsgált vegyi anyag jelenlétében növekednek. A vizsgált vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.

Szaporulat: az élőanyagtömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén.

2. függelék

A *Lemna* nemzetség leírása

A *Lemna* nemzetséghez tartozó, békalencseként közismert vízinövények a *Lemnaceae* családba tartoznak, amelynek négy nemzetsége számos világszerte elterjedt fajt felölel. Különböző megjelenésüket és rendszertanukat a szakirodalom kimerítően ismerteti (1)(2). A *Lemna gibba* és a *L. minor* a mérsékelt éghajlati övezet jellegzetes képviselői; a toxicitási vizsgálatokban többnyire ezeket alkalmazzák. Mindkét fajnak úszó vagy alámerülő, korong alakú levelei és nagyon vékony, az egyes levelek alsó felszínének közepéről eredő gyökerei vannak. A *Lemna*-fajok többnyire nem virágznak, a szaporodás érdekében a növények vegetatív úton új leveleket hoznak létre (3). Az idősebb növényekhez képest a fiatalabbak általában halványabbak, rövidebb gyökereik vannak és két-három, különböző méretű levélből állnak. A *Lemna*-növények kis mérete, egyszerű struktúrája, ivartalan szaporodása és rövid generációs ideje a nemzetség fajait különösen alkalmassá teszi laboratóriumi vizsgálatokra (4)(5).

Mivel az egyes fajok előreláthatóan eltérő mértékben lesznek érzékenyek a különböző behatásokra, az érzékenységet kizárólag fajon belül szabad összehasonlítani.

Példák a vizsgálatokban korábban már alkalmazott *Lemna*-fajokra: Fajonkénti szakirodalmi hivatkozások

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

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

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

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

Svéd Szabványügyi Intézet (SIS). (1995). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).

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

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

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

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

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

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

A *Lemna*-fajok beszerzési forrásai

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Telefon: +1-416-978-3641
Fax +1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SVÉDORSZÁG
Telefon: +46 8 674 7240
Fax (+46) 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin Tel.
Németország
e-mail: lemna@uba.de

SZAKIRODALOM

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

3. függelék

A törzstenyészet fenntartása

A törzstenyészetek alacsony hőmérsékleteken (4–10 °C) hosszabb ideig átoltás nélkül is fenntarthatók. A *Lemma* tápoldata megegyezhet a vizsgálatok során alkalmazottal, de a törzstenyészetek más, tápanyagokban gazdag oldatban is tarthatók.

Időről időre néhány fiatal, világoszöld növényt csíramentes eljárással friss tápoldatot tartalmazó növesztőedénybe helyezünk. A javasolt hűvösebb körülmények között elegendő lehet akár háromhavonta is átoltást végezni.

Kémiaileg tiszta (savval lemosott) és steril üveg növesztőedényeket alkalmazunk, és a kezelés során biztosítunk csíramentes körülményeket. A törzskultúra (például algával vagy gombákkal történő) fertőződése esetén meg kell kísérelni a szennyező organizmusok eltávolítását. Algák és a legtöbb más szennyező organizmus esetén ez felületi fertőtlenítéssel valósítható meg. A fertőződött növényanyagból mintát veszünk, és a gyökereket levágjuk. A növényeket ezután tiszta vízben intenzíven megrázzuk, majd 30 másodperc és 5 perc közötti időtartamra 0,5 térfogatszázalékos nátrium-hipoklorit-oldatba merítjük. A növényanyagot ezután steril vízben átöblítjük, majd több részletben friss tápoldatot tartalmazó növesztőedényekbe helyezjük. A kezelés eredményeképpen számos levél elhal, különösen hosszabb expozíciós idő esetén, de a fennmaradók közül néhány általában fertőzésmentes lesz. Ez a tenyészet a későbbiekben újabbak leoltására használható fel.

4. függelék

Tápanyagok

L. minor és *L. gibba* esetén eltérő tápanyagot ajánlott alkalmazni. *L. minor* esetén a svéd szabvány (SIS) szerinti tápanyag módosított változatát, míg *L. gibba* esetén a 20X-AAP tápanyagot javasoljuk. Az alábbiakban megadjuk minkét tápanyag összetételét. Ezeknek a tápanyagoknak az elkészítése során laboratóriumi reagenseket vagy analitikai tisztaságú vegyszereket, és ionmentesített vizet kell használni.

Svéd szabvány (SIS) szerinti *Lemna*-tápanyag

- Az I–V. törzsoldatot autoklávozással (120 °C, 15 perc) vagy membránszűréssel (körülbelül 0,2 µm pórusméret) sterilizáljuk.
- A VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldatot kizárólag membránszűréssel sterilizáljuk, autoklávozás nem alkalmazható.
- A steril törzsoldatokat hideg, sötét helyen tároljuk. Az I–V. törzsoldatot hat hónap elteltével ki kell önteni, míg a VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldatot eltarthatósági ideje egy hónap.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/l)	Koncentráció a kész tápanyagban (mg/l)	Kész tápanyag	
				Elemek	Koncentráció (mg/l)
I.	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV.	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V.	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI.	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	-	-
VII.	MOPS (puffer)	490	490	-	-

Egy liter SIS szerinti tápoldat elkészítéséhez 900 ml ionmentesített vízhez a következőket adagoljuk:

- 10 ml az I. törzsoldatból
- 5 ml a II. törzsoldatból
- 5 ml a III. törzsoldatból
- 5 ml a IV. törzsoldatból
- 1 ml az V. törzsoldatból
- 5 ml a VI. törzsoldatból
- 1 ml a VII. törzsoldatból (ha szükséges)

Megjegyzés: A VII. törzsoldatot (MOPS puffer) bizonyos vizsgált vegyi anyagok esetében kell alkalmazni (lásd a 11. pontot).

A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával $6,5 \pm 0,2$ értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük.

20X–AAP tápoldat

A törzsoldatokat steril desztillált vagy ionmentesített vízzel készítjük.

A steril törzsoldatokat hűvös, sötét helyen tároljuk. Ilyen körülmények között eltarthatósági idejük legalább 6–8 hét.

A 20X–AAP tápoldat előállításához öt, tápanyagokat tartalmazó törzsoldatot (A1., A2., A3., B. és C.) készítünk reagens minőségű vegyületek felhasználásával. A tápoldat előállításához kb. 850 ml ionmentesített vízhez 20 ml-t adunk minden törzsoldatból. A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával $7,5 \pm 0,1$ értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük. Ezután a tápoldatot egy kb. 0,2 μm pórusméretű membránszűrőn át steril edénybe szűrjük.

A vizsgálatok céljára szánt tápoldatot egy-két nappal a felhasználás előtt kell elkészíteni annak érdekében, hogy pH-értékük stabilizálódhasson. A tápoldat pH-értékét felhasználás előtt ellenőrizni kell, és szükség esetén 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával a fentieknek megfelelően újra be kell állítani.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/•l) (*)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/•l) (*)	Kész tápoldat	
				Elemek	Koncentráció (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

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/•l) (*)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/•l) (*)	Kész tápoldat	
				Elemek	Koncentráció (mg/•l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na;C	220; 43

(*) eltérő előírás hiányában

Megjegyzés: Az elméletileg szükséges hidrogén-karbonát-koncentráció (amely mellett nincs szükség a pH-érték jelentős mértékű utánállítására) 15 mg/l, nem 300 mg/l. A 20X–AAP tápoldattal végzett korábbi vizsgálatok és a jelen iránymutatáshoz kapcsolódó körvizsgálat azonban egyaránt 300 mg/l-en alapult. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

STEINBERG-féle tápoldat (az ISO 20079 szerint)

Koncentrációk és törzsoldatok

A módosított Steinberg-féle tápoldatot az ISO 20079 kizárólag *Lemna minor* esetére írja elő (mert a szabvány csak *Lemna minor* alkalmazását engedélyezi), de korábbi vizsgálatok *Lemna gibba* esetén is kedvező eredményekre vezettek.

A tápoldat készítése során reagens vagy analitikai tisztaságú anyagokat és ionmentesített vizet kell alkalmazni.

A tápoldatot elkészíthetjük törzsoldatokból vagy a tízszeres töménységű oldatból, amely maximális oldatkonzentrációt tesz lehetővé kicsapódás nélkül.

1. táblázat

pH-stabilizált (Altenburger szerint módosított) STEINBERG-féle tápoldat

Összetevő		Tápoldat	
Makroelemek	móltömég	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

Összetevő		Tápoldat	
Mikroelemek	móltömeg	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
Dinátrium-EDTA-dihidrát	372,24	1 500,00	4,03

2. táblázat

Törzsoldatok (Makroelemek)

1. Makroelemek (50-szeres töménységű)	g/l
1. törzsoldat:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
2. törzsoldat:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
3. törzsoldat:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

3. táblázat

Törzsoldatok (Mikroelemek)

2. Mikroelemek (1 000-szeres töménységű)	mg/l
4. törzsoldat:	
H ₃ BO ₃	120,0
5. törzsoldat:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
6. törzsoldat:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Mikroelemek (1 000-szeres töménységű)	mg/l
7. törzsoldat:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
8. törzsoldat:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
Dinátrium-EDTA-dihidrát	1 500,00

- A 2. és 3., illetve külön a 4–7. törzsoldat egyesíthető (a kívánt koncentrációk figyelembevételével).
- A hosszabb eltarthatóság érdekében kezeljük a törzsoldatokat autoklávbán 121 °C-on 20 percig, vagy végezzünk membránszűrő (0,2 µm) sterilizálást. A 8. törzsoldat esetében fokozottan ajánlott membránszűrő (0,2 µm) sterilizálást végezni.

A végleges koncentrációjú (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése

- A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 900 ml ionmentesített vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (lásd a 2. táblázatot) egyaránt 20 ml-t.
- Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (lásd a 3. táblázatot) egyaránt 1,0 ml-t.
- A pH-érték 5,5 ± 0,2 legyen (ezt az értéket minél kevesebb NaOH-oldat vagy HCl hozzáadásával állítsuk be).
- Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 1 000 ml-re.
- Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.

A 10-szeres töménységű (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése ideiglenes tárolásra

- A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 30 ml vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (lásd a 2. táblázatot) egyaránt 20 ml-t.
- Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (lásd a 3. táblázatot) egyaránt 1,0 ml-t. Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 100 ml-re.
- Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.
- A (végleges koncentrációjú) tápoldat pH-értéke 5,5±0,2 legyen.”

6. A melléklet a következő C.31–C.46. fejezettel egészül ki:

„C.31. SZÁRAZFÖLDI NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA: CSÍRÁZÁS ÉS CSÍRANÖVEKEDÉS

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 208. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés és a szabályozási célra történő használatra való alkalmazhatóság alapján rendszeresen felülvizsgálják. E frissített vizsgálati módszer célja, hogy megvizsgálja a vegyi anyagoknak a csírázásra és a csíranövekedésre gyakorolt potenciális hatásait. A vizsgálat nem terjed ki a szaporodásra (azaz a magképzésre, a virág kialakulására, a gyümölcs érése) gyakorolt krónikus hatásokra. Az expozíció feltételeit és a vizsgálandó vegyi anyag tulajdonságait meg kell fontolni a megfelelő vizsgálati módszerek használatának biztosítása érdekében (például fémek/fémvegyületek vizsgálatakor a pH és a kapcsolódó ellenionok hatásait mérlegelni kell) (1). Ez a vizsgálati módszer nem foglalkozik a vegyi anyagok gőzeinek kitett növényekkel. A vizsgálati módszer általános vegyi anyagok, biocidok és növényvédő szerek (más néven peszticidok) tesztelésére alkalmazható. Meglévő módszerek alapján fejlesztették ki (2) (3) (4) (5) (6) (7). A növények vizsgálatára vonatkozó egyéb hivatkozásokat is figyelembe vettek (8) (9) (10). A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

2. A vizsgálat a vizsgált vegyi anyagnak a magasabb rendű növények csírázására és korai növekedésére gyakorolt hatásait értékeli a talajon (vagy más alkalmas talajmátrixon) keresztül történő expozíciót követően. A magokat érintkezésbe helyezzük a vizsgált vegyi anyaggal kezelt talajjal, és a hatásokat rendszerint 14–21 nap elteltével értékeljük, miután a csíranövények 50 %-a megjelent a kontrollcsoportban. A mért végpontok a csírázás vizuális értékelése, a hajtás száraz tömege (alternatívaként a friss hajtások tömege), és bizonyos esetekben a hajtás magassága, valamint a különböző növényi részekben látható káros hatások értékelése. A méréseket és megfigyeléseket összevetjük a kezeletlen kontroll növényekkel.
3. Az expozíció várható útvonalától függően a vizsgált vegyi anyagot el kell keverni a talajba (vagy esetleg a mesterséges talajmátrixba), vagy szét kell oszlatni a talaj felületén, ami megfelelően képviseli az adott vegyi anyagnak való expozíció potenciális útvonalát. A talajba való elkeverést ömlesztett talaj kezelésével végezhetjük. Az alkalmazást követően a talajt áthelyezzük a cserépbe, majd az adott növényfaj magjait ültetjük a talajba. A felületi alkalmazást a cserepes talajon végezzük, amelybe már beültetjük a magokat. A vizsgálati egységeket (kontroll és kezelt talaj plusz magok) ezután megfelelő, a növények csírázását/növekedését támogató körülmények közé helyezzük.
4. A vizsgálatot a vizsgálat célja szerint el lehet végezni a dózis-válasz görbe meghatározása érdekében, vagy pedig egyetlen koncentráció/arány alkalmazásával határérték vizsgálatként. Ha az egyetlen koncentráció/arány vizsgálatának eredményei meghaladnak egy bizonyos toxicitási szintet (például hogy x %-nál nagyobb mértékű hatás figyelhető-e meg), akkor dózisbehataroló vizsgálatot kell végezni a toxicitás felső és alsó határértékeinek meghatározása céljából, amelyet egy több koncentrációban/arányban elvégzett vizsgálatnak kell követnie a dózis-válasz görbe felvétele céljából. Megfelelő statisztikai elemzést kell használni az érdeklődésre számot tartó legérzékenyebb paraméter(ek) EC_x hatékony koncentrációjának vagy ER_x hatékony alkalmazási arányának (pl. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) megállapításához. Továbbá, az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (LOEC) is ki lehet számítani ebben a vizsgálatban.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. Az alábbi információ hasznos a vegyi anyag várható expozíciós útvonalának azonosításához és a vizsgálat tervezéséhez: szerkezeti képlet, tisztaság, vízben való oldhatóság, szerves oldószerekben való oldhatóság, 1-oktanol-víz megoszlási hányados, talaj szorpciós viselkedés, gőznyomás, kémiai stabilitás vízben és fényben, illetve biológiai lebonthatóság.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

6. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:
 - a magoknak legalább 70 %-a kicsírázott;
 - a csíranövények nem mutatják fitotoxikus hatások látható jeleit (pl. klorózis, elhalás, hervadás, levél- és szárdeformációk) és a növények csak az adott fajnál szokásos növekedési és morfológiai változatosságot mutatják;
 - az átlagos túlélési arány a kikelt kontroll-csíranövények esetében legalább 90 % a vizsgálat időtartama alatt;
 - egy adott faj környezeti feltételei megegyeznek és a táptalaj ugyanakkora mennyiségű talajmátrixot, támogató közeget vagy ugyanabból a forrásból származó táptalajt tartalmaz.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. A referencia-vegyianyagot rendszeres időközönként ellenőrizni lehet annak igazolása céljából, hogy a vizsgálat elvégzése, az adott kísérleti növények által adott válasz és a vizsgálati feltételek nem változtak jelentősen az idő múlásával. Alternatív megoldásként a kontrollok élőanyagtömegének vagy növekedésének korábbi mérési eredményeit lehet felhasználni a vizsgálati rendszer adott laboratóriumban történő értékelésére, amely a laboratórium belüli minőségellenőrzési intézkedésként szolgálhat.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Természetes talaj – Mesterséges táptalaj

8. A növényeket cserépben lehet nevelni homokos vályog, agyagos homok, vagy homokos agyagos vályog használatával, amely legfeljebb 1,5 százalék szerves szént tartalmaz (kb. 3 százalék szerves anyag). A legfeljebb 1,5 százalék szerves szént tartalmazó kereskedelmi virágföldök vagy szintetikus talajkeverékek is használhatók. Agyagos talajok nem használhatók, ha a vizsgált vegyi anyagról közismert, hogy nagy az agyaghoz való affinitása. A terepről származó talajt a homogenizálás és a durva részecskék eltávolítása érdekében 2 mm lyukátmérőjű szitán meg kell szitálni. A végső előkészített talaj típusát és textúráját, százalékos szerves szén tartalmát, pH-ját, sótartalmát és elektronikus vezetőképességét meg kell adni a jelentésben. A talajt be kell sorolni a standard osztályozási rendszer szerint (11). A talajt pasztórozni vagy hőkezelné lehet a talajkórokozók hatásának csökkentése érdekében.
9. A természetes talaj az eltérő fizikai/kémiai tulajdonságok és mikrobiális populációk miatt megnehezítheti az eredmények értelmezését és növelheti a változékonyságot. Ezek a változók megváltoztatják a nedvességmegtartó képességet, a kémiai megkötő képességet, az átszellőzést, valamint a tápanyag- és nyomelemtartalmat. E fizikai tényezők változékonysága mellett a kémiai tulajdonságok – például a pH és a redox potenciál – is változékonyak lehetnek, ami hatással lehet a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetőségére (12) (13) (14).
10. A mesterséges táptalajokat jellemzően nem használják a növényvédő szerek vizsgálatánál, de hasznosak lehetnek az általános vegyi anyagok vizsgálatának céljára, vagy ha arra van szükség, hogy minimálisra csökkentjük a természetes talajok variabilitását és jobban összehasonlíthatóak legyenek a vizsgálati eredmények. A táptalajoknak inert anyagokból kell állniuk, amelyek minimalizálják a vizsgált vegyi anyaggal, az oldószer hordozóanyaggal, vagy mindkettővel való kölcsönhatást. A savval mosott kvarchomokot, az ásványgyapotot és az üvegyöngyöket (pl. a 0,35-0,85 mm átmérőjű gyöngyöket) alkalmas inert anyagoknak találták, amelyek minimális mértékben nyelik el a vizsgált vegyi anyagot (15), és biztosítják, hogy a csíranövények a vegyi anyagot a gyökereiken keresztül maximális mértékben fel tudják venni. Az alkalmatlan táptalajok közé tartoznak a vermikulit, a perlit és az egyéb erősen nedvszívó anyagok. A növények számára tápanyagokat kell biztosítani annak érdekében, hogy a növényekre ne gyakoroljon stresszhatást a tápanyaghiány, és ahol lehetséges, ezt kémiai elemzés vagy a kontroll növények vizuális értékelése útján ellenőrizni kell.

A vizsgált fajok kiválasztásának kritériumai

11. A kiválasztott fajoknak meglehetősen széleskörűnek kell lenniük, pl. a növényvilágon belüli rendszertani diverzitás, az elterjedtség, az előfordulási gyakoriság, az életciklus fajspecifikus jellemzői és a természetbeli előfordulás földrajzi területe tekintetében, hogy széles választartományt adjanak (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). A lehetséges vizsgálati fajok következő jellemzőit kell figyelembe venni a kiválasztás során:
 - a fajoknak egységes méretű magokkal kell rendelkezniük, amelyek a megbízható standard vetőmag forrás (ok)ból könnyen hozzáférhetőek, és konzisztens, megbízható és egyenletes csírázást, valamint a csíranövény egyenletes növekedését mutatják;
 - a növények alkalmasak a laboratóriumban végzett vizsgálatok céljára, illetve megbízható és reprodukálható eredményeket adnak a vizsgálati létesítményen belül és azok között;
 - a vizsgált fajok érzékenységének összhangban kell lennie a vegyi anyagnak kitett környezetben található növények által adott válaszokkal;
 - a fajokat bizonyos mértékig már használták korábbi toxicitási vizsgálatok során, és az alkalmazásuk során szerzett tapasztalatok – például gyomirtó biológiai vizsgálatokban, nehézfém szűrővizsgálatokban, sótartalommal kapcsolatos vagy ásványi stressz vizsgálatokban, illetve allelopátia vizsgálatokban – azt mutatják, hogy sokféle stresszorral szemben mutatnak érzékenységet;
 - összhangban vannak a vizsgálati módszer növekedési feltételeivel;
 - megfelelnek a vizsgálat érvényességi követelményeinek.

Néhány korábban gyakran használt fajt a 2. függelék sorol fel, a potenciális nem terményfajok pedig a 3. függelékben találhatók.

12. A vizsgálandó fajok száma függ a vonatkozó jogszabályi követelményektől, ezért ezt a vizsgálati módszer nem határozza meg.

A vizsgált vegyi anyag bevitel

13. A vegyi anyagot egy megfelelő hordozóban (pl. víz, acetone, etanol, polietilén-glikol, gumiarábikum, homok) kell bevinni. Hatóanyagokat és különböző segédanyagokat tartalmazó keverékeket (formulázott termékeket vagy készítményeket) is lehet vizsgálni.

Bevitel a talajba/mesterséges táptalajba

14. A vízben oldható vagy vízben szuszpendált vegyi anyagokat vízhez adjuk, majd az oldatot egy megfelelő keverő-berendezés segítségével összekeverjük a talajjal. Ez a fajta vizsgálat akkor lehet megfelelő, ha a vegyi anyagnak való kitétség a talajon vagy a talaj pórusaiban lévő vízen keresztül történik, és felmerül a gyökereken át történő felvétel lehetősége. A talaj vízmegtartó képességét a vizsgált vegyi anyag hozzáadásával nem szabad túllépni. A hozzáadott víz térfogatának meg kell egyeznie minden egyes kísérleti koncentráció esetében, de annak mértékét korlátozni kell, hogy a talaj agglomerátumok csomósodása megakadályozható legyen.
15. A vízben kevésbé oldódó vegyi anyagokat egy alkalmas illékony oldószerben (pl. acetone, etanol) fel kell oldani, és homokkal el kell keverni. Az oldószert ezután légáram használatával, a homok állandó kevergetése közben eltávolítjuk a homokból. A kezelt homokot összekeverjük a kísérleti talajjal. Létre kell hozni egy második kontroll mintát is, amely csak homokot és oldószert kap. Egyenlő mennyiségű homokot – a bekevert és eltávolított oldószerral – kell adni minden kezelési szinthez és a második kontrollhoz. Szilárd, oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok esetében a vegyi anyagot egy alkalmas keverő berendezés segítségével összekeverjük száraz talajjal. A továbbiakban a talajt hozzáadjuk a cserepekhez, és azonnal magokat vetünk bele.
16. Amikor talaj helyett mesterséges táptalajt használunk, a vízben oldható vegyi anyagokat közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt oldjuk fel a tápoldatban. A vízben oldhatatlan, de vízben oldószer hordozó segítségével szuszpendálható vegyi anyagokat a hordozóanyaggal együtt kell hozzáadni a tápoldathoz. A vízben nem oldódó vegyi anyagokat, amelyek esetében nem áll rendelkezésre nem-toxikus vízoldékony hordozó, egy megfelelő illékony oldószerben kell feloldani. Az oldatot összekeverjük homokkal vagy üvegyöngyökkel, behelyezzük egy forgó vákuum berendezésbe és elpárologtatjuk, így a vegyi anyag egyenletes bevonatot fog képezni a homokon vagy a gyöngyökön. A cserepek feltöltése előtt a gyöngyök egy lemerített részét ugyanazzal a szerves oldószerral extrahálni, majd a vegyi anyagra analizálni kell.

Felületi alkalmazás

17. Növényvédő termékek esetében a vizsgált vegyi anyag bevitelére gyakran alkalmazzák a talaj felületének a vizsgálati oldattal való permetezését. A vizsgálatok során használt berendezéseknek, beleértve a vizsgált vegyi anyag elkészítésére és bevitelére használt berendezéseket, olyan elrendezésűnek és kapacitásúnak kell lenniük, hogy a berendezéseket használó vizsgálatokat a legpontosabb módon lehessen elvégezni és reprodukálható lefedettséget adjanak. A lefedettség egyenletes legyen a talaj egész felületén. Ügyelni kell arra, hogy elkerüljék annak lehetőségét, hogy a vegyi anyagokat a berendezések adszorbeálják vagy azokkal reakcióba lépjenek (pl. műanyag csövek és lipofil vegyi anyagok, vagy acél alkatrészek és elemek). A vizsgált vegyi anyagot rápermetezzük a talaj felületére, utánozva a permetezőtartályból történő tipikus alkalmazást. A permettérfogatoknak általában a normál mezőgazdasági gyakorlatnak megfelelő tartományban kell lenniük, és a térfogatokat (víz mennyisége stb.) meg kell adni a jegyzőkönyvben. Olyan fűvókátípust kell kiválasztani, amely egyenletes lefedettséget biztosít a talaj felszínén. Ha oldószereket és hordozókat alkalmazunk, egy kontroll növényekből álló második csoportot is ki kell alakítani, amely kizárólag oldószert/hordozóanyagot kap. Ez nem szükséges készítményként vizsgált növényvédelmi termékek esetében.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának/arányának ellenőrzése

18. A koncentrációkat vagy az alkalmazás mértékét megfelelő analitikai ellenőrzéssel meg kell erősíteni. Oldható vegyi anyagok esetében valamennyi koncentráció/arány ellenőrzése megerősíthető a vizsgálat során alkalmazott legmagasabb koncentrációjú vizsgálati oldat elemzése révén a rákövetkező hígításra vonatkozó dokumentációval és kalibrált beviteli berendezésekkel (pl. kalibrált analitikai üvegáru, permetező berendezések kalibrálása). Oldhatatlan vegyi anyagok esetében az összetett anyag ellenőrzését a vizsgált vegyi anyagnak a talajhoz adott tömegével kell biztosítani. Ha demonstrálni kell a homogenitást, a talaj elemzésére lehet szükség.

AZ ELJÁRÁS

A vizsgálat megtervezése

19. Azonos fajba tartozó magokat ültetünk el cserepekben. A cserepenként elültetett magok száma a fajtól, a cserép méretétől és a vizsgálat időtartamától függ. A edényenkénti növények számának megfelelő növekedési feltételeket kell biztosítani, és el kell kerülni túlszűfoaltságot a vizsgálat időtartama alatt. A maximális tőszám 3–10 mag/100 cm² körül van a magok méretétől függően. Például 1–2 kukorica, szójabab, paradicsom, uborka, vagy cukorrépa növény ajánlott egy 15 cm-es tartályban; három repce vagy hüvelyes növény ajánlott egy 15 cm-es tartályban; és 5–10 hagyma, búza, vagy más apró mag ajánlott egy 15 cm-es tartályban. A magok és az ismétlések száma (az ismétlés edényként van meghatározva, ezért az azonos edényben található növények nem jelentenek ismétlést) elegendő kell legyen az optimális statisztikai elemzéshez (21). Meg kell jegyezni, hogy a változékonyság nagyobb lesz az olyan vizsgált fajok esetében, ahol kevesebb nagy magot használunk edényenként (ismétlésenként), összehasonlítva azokkal a vizsgált fajokkal, ahol nagyobb számú kis magot lehet használni edényenként. Edényenként azonos számú mag ültetésével ez a változékonyság minimalizálható.
20. Kontrollcsoportokat kell használni annak igazolására, hogy a megfigyelt hatások összefüggenek a vizsgált vegyi anyagnak való kitétséggel, illetve kizárólag annak tulajdoníthatók. A megfelelő kontrollcsoportnak minden tekintetben azonosnak kell lennie a vizsgált csoporttal, kivéve a vizsgált vegyi anyagnak való kitétséget. Egy adott vizsgálaton belül valamennyi kísérleti növénynek, beleértve a kontrollokat is, azonos forrásból kell származnia. A torzítások megelőzése érdekében a vizsgálati és kontroll edények véletlen besorolására van szükség.
21. Az inszekticiddel vagy fungiciddel bevont magokat (azaz a »kikészített« magokat) kerülni kell. Bizonyos nem szisztémás kontakt fungicidek (pl. kaptán, thiram) használatát azonban egyes szabályozó hatóságok engedélyezik (22). Ha a magok által hordozott kórokozók jelenléte aggodalomra adhat okot, a magokat rövid ideig gyenge 5 %-os hipoklorit-oldatba lehet mártani, majd alaposan át kell öblíteni folyó vízzel és meg kell szárítani. Az egyéb növényvédőszerrel végzett javító kezelés nem engedélyezett.

Vizsgálati körülmények

22. A vizsgálati feltételeknek meg kell közelíteniük a vizsgált fajok és fajták normális növekedéséhez szükséges feltételeket (a vizsgálati feltételek példáit lásd a 4. függelékben). A fejlődő növényeket a jó kertészeti gyakorlatnak megfelelően ellenőrzött környezetű kamarákban, fitotronokban, vagy üvegházakban kell tartani. Növesztő létesítmények használata esetén ez a gyakorlat rendszerint magában foglalja a hőmérséklet, a páratartalom, a széndioxid-koncentráció, a fény (fényerő, hullámhossz, fotoszintetikusan aktív sugárzás) és a megvilágítási időszak, az öntözőeszközök, stb. ellenőrzését és megfelelően rendszeres (pl. naponta történő) feljegyzését a növények megfelelő fejlődésének biztosítása érdekében, amelyet a kiválasztott fajba tartozó kontroll növények alapján ítélnek meg. Az üvegházi hőmérsékletet a szellőztetés és a fűtő és/vagy hűtő rendszerek segítségével kell kontrollálni. Üvegházban történő vizsgálat esetén általában az alábbi feltételek ajánlottak:

— hőmérséklet: 22 °C ± 10 °C;

— nedvesség: 70 % ± 25 %;

— megvilágítási időszak: minimum 16 óra fény;

— fényerő: 350 ± 50 µE/m²/s. A kevesebb fényt igénylő fajok kivételével 400-700 nm hullámhosszú kiegészítő világításra lehet szükség, ha a fényerő 200 µE/m²/s alá csökken.

A környezeti feltételeket a vizsgálat során nyomon kell követni és jegyzőkönyvezni kell. A növényeket nem porózus műanyag vagy mázas edényekben kell nevelni, az edény alatt elhelyezett tálcával vagy csészéaljjal. Az edényeket rendszeresen át lehet helyezni a vizsgálati feltételek tekintetében a növesztő létesítményen belül fennálló különbségek miatt kialakuló és a növények növekedésében megmutatkozó variabilitás minimalizálása érdekében. Az edényeknek elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy lehetővé tegyék a normális növekedést.

23. A talajt tápanyagokkal lehet egészíteni, hogy fenntartsuk a növények jó életképességét. A kiegészítő tápanyagok iránti igényt és azok időzítését a kontroll növények megfigyelése alapján lehet megítélni. Ajánlott a vizsgálati edények alsó öntözése (pl. üvegszálból készült kanóc használatával). Kezdetben azonban felső öntözést is lehet használni a magok csírázásának ösztönzése céljából, illetve a talaj felületén történő kezelés esetén, mivel megkönnyíti a vegyi anyag bejutását a talajba.

24. A specifikus növekedési feltételeknek megfelelőnek kell lenniük a vizsgált faj és a vizsgált vegyi anyag számára. A kontroll és a kezelt növényeket azonos környezeti feltételek között kell tartani, megfelelő intézkedéseket kell azonban tenni a vizsgált vegyi anyaggal történő keresztexpozíció (pl. illékony vegyi anyagok) megakadályozására a különböző kezelési csoportok között, illetve a kezelési csoportok és a kontrollok között.

Egyetlen koncentrációban/arányban történő vizsgálat

25. Egy vegyi anyag egyetlen koncentrációval vagy aránnyal történő vizsgálatának lefolytatásához megfelelő koncentráció/arány (kihívás/határérték) meghatározása érdekében számos tényezőt kell figyelembe venni. Általános vegyi anyagok esetében ezek közé tartoznak a vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságai. Növényvédő szerek esetében a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait és felhasználási formáit, maximális koncentrációját vagy kiszórt mennyiségét, a szezononkénti alkalmazások számát és/vagy a vizsgált vegyi anyag perzisztenciáját figyelembe kell venni. Annak meghatározására, hogy egy általános vegyi anyag rendelkezik-e fitotoxikus tulajdonságokkal, a vegyi anyagot legfeljebb 1 000 mg/kg száraz talaj szinten kell vizsgálni.

Dózisbehatároló vizsgálat

26. Ha szükséges, dózisbehatároló vizsgálatot lehet végezni, hogy útmutatást nyújtson arra vonatkozóan, milyen koncentrációkat/arányokat kell vizsgálni a meghatározó dózis-válasz vizsgálatban. A dózisbehatároló vizsgálatához a vizsgálati koncentrációknak/arányoknak nagy léptékkel kell emelkedniük (pl. 0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg száraz talaj). A növényvédő szerek esetében a koncentrációknak/arányoknak az ajánlott vagy maximális koncentráción, illetve kiszórt mennyiségen kell alapulniuk, pl. az ajánlott/maximális koncentráció vagy a kiszórt mennyiség 1/100, 1/10, 1/1 része.

Több koncentrációban/arányban történő vizsgálat

27. A több koncentrációban/arányban történő vizsgálat célja a dózis-válasz összefüggés megállapítása és a csírázás EC_x vagy ER_x értékének, illetve az élőanyagtömegnek és/vagy a látható hatásoknak a nem kitett kontrollokhoz viszonyított meghatározása, a szabályozó hatóságok követelményei szerint.
28. A koncentrációk és arányok számának és elhelyezkedésének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megbízható dózis-válasz összefüggést és regressziós egyenletet generáljanak, és becslést adjanak az EC_x vagy az ER_x értékére. A kiválasztott koncentrációknak/arányoknak körbe kell venniük a meghatározandó EC_x vagy ER_x értéket. Például, ha az EC_{50} értékre van szükség, akkor olyan arányokat kell vizsgálni, amelyek 20–80 %-os hatást eredményeznek. Az ennek eléréséhez ajánlott kísérleti koncentrációk/arányok száma legalább öt egy mértani sorozatban, plusz a kezeletlen kontroll, és az egyes koncentrációkat/arányokat egymástól elválasztó kvóciens értéke legfeljebb három lehet. Minden egyes kezelt és kontroll csoport esetében az ismétlések száma legalább négy legyen, a magok számának pedig legalább 20-nak kell lennie. Az alacsony csírázási arányú vagy változó növekedésű növények esetében több ismétlésre lehet szükség a vizsgálat statisztikai erejének növelése érdekében. Ha nagyobb számú kísérleti koncentrációt/arányt használnak, az ismétlések száma csökkenthető. Ha a NOEC értékét kívánják becsülni, több ismétlésre lehet szükség a kívánt statisztikai erő eléréséhez (23).

Megfigyelések

29. A megfigyelési időszak alatt, azaz a kontroll növények (adott esetben az oldószer kontrollok is) 50 %-ának kicsírázása után 14-21 napig a növényeket gyakran megfigyelik (legalább hetente, vagy ha lehetséges, naponta), hogy ellenőrizzék a csírázást, a látható fitotoxicitást és a mortalitást. A vizsgálat végén fel kell jegyezni a túlélő növények csírázási százalékát és élőanyagtömegét, valamint a növény különböző részein látható káros hatásokat. Utóbbiak közé tartoznak a csíranövények megjelenésében mutatkozó rendellenességek, a fejlődésben való visszamaradás, a klorózis, az elszíneződés, a mortalitás, és a növény fejlődésére gyakorolt hatások. A végső élőanyagtömeget a túlélő növények hajtásainak átlagos száraz tömege segítségével lehet mérni, amelyhez a hajtásokat a talaj felszínén kell levágni és 60 °C-on tömegállandóságig szárítani. Alternatív módszerként a végső élőanyagtömeget a hajtások friss tömegének segítségével is mérni lehet. A hajtások magassága egy másik végpont lehet, ha a szabályozó hatóságok megkövetelik. A látható sérülések tekintetében egységes pontozási rendszert kell használni a megfigyelhető toxikus válaszok értékelésére. A minőségi és mennyiségi vizuális értékelés elvégzésére vonatkozó példák a (23) és (24) szakirodalmi hivatkozásban találhatók.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Statisztikai elemzés*Egyetlen koncentráció/arány vizsgálata*

30. Az egyes növényfajok adatait megfelelő statisztikai módszerrel kell elemezni (21). A vizsgált koncentráció/arány hatásának szintjét, vagy az adott hatás elérésének hiányát a vizsgált koncentrációban/arányban (pl. $<x$ % hatást figyeltek meg y koncentráció vagy arány esetén) jegyzőkönyvezni kell.

Több koncentráció/arány vizsgálata

31. A dózis-válasz kapcsolatot egy regressziós egyenlet formájában állapítják meg. Különböző modellek használhatók: például a csírázás EC_x vagy ER_x értéke (pl. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) és a megbízhatósági határok – mint kvantális adatok – becslésére a logit, probit, Weibull, Spearman-Kärber, vágott Spearman-Kärber módszerek, stb. lehetnek megfelelőek. A csíranövények növekedése (tömeg és a magasság), mint folyamatos végpont esetében az EC_x vagy ER_x értéket és a megbízhatósági határokat megfelelő regressziós elemzés (pl. Bruce-Versteeg nem lineáris regressziós elemzés (25)) segítségével lehet megbecsülni. Ahol csak lehetséges, a legérzékenyebb fajok esetében az R^2 legyen 0,7 vagy magasabb, és az alkalmazott vizsgálati koncentrációknak/arányoknak a 20–80 %-os hatások tartományát kell felölelniük. Ha a NOEC értékét kívánják becsülni, az erős statisztikai vizsgálatok alkalmazását kell előnyben részesíteni, és ezeket az adatok eloszlása alapján kell kiválasztani (21) (26).

Vizsgálati jegyzőkönyv

32. A vizsgálati jegyzőkönyvnek be kell mutatnia a vizsgálatok eredményeit, valamint a vizsgálati feltételek részletes leírását, az eredmények alapos megvitatását, az adatok elemzését, és az abból levont következtetéseket. Egy táblázatos összefoglalót és az eredmények kivonatát is el kell készíteni. A jelentés kötelező elemei a következők:

Vizsgált vegyi anyag:

- kémiai azonosító adatok, a vizsgált vegyi anyag lényeges tulajdonságai (pl. $\log P_{ow}$, vízdoldhatóság, gőznyomás, illetve a környezetben bekövetkező sorsra és viselkedésre vonatkozó információk, ha rendelkezésre állnak);
- a vizsgálati oldat elkészítésére és a vizsgált koncentrációk ellenőrzésére vonatkozó információk a 18. pontban meghatározottak szerint.

A vizsgálatához felhasznált faj:

- a vizsgált szervezetre vonatkozó információk: faj/fajta, növény család, tudományos és közönséges név, a mag eredete és története a lehető legrészletesebben (azaz a szállító neve, csírázási százalék, mag méretkategória, tételszám, gyűjtés éve vagy vegetációs időszaka, csírázási minősítés dátuma), életképesség, stb.;
- a vizsgált egy- és kétszikű fajok száma;
- a faj kiválasztásának indoklása;
- a mag tárolásának, kezelésének és fenntartásának leírása.

Vizsgálati körülmények:

- vizsgálati berendezés (pl. növesztőkamra, fitotron és üvegház);
- a vizsgálati rendszer leírása (pl. edényméretek, az edény anyaga és a talaj mennyisége);
- a talaj jellemzői (textúra vagy a talaj típusa: a talaj részecskeeloszlása és osztályozása, fizikai és kémiai tulajdonságai, beleértve a szerves anyagok százalékos arányát, a szerves szén százalékos arányát és a pH-t);
- a talaj/táptalaj (pl. talaj, mesterséges talaj, homok és egyéb) előkészítése a vizsgálat előtt;
- a tápközeg leírása, ha használnak ilyet;

- a vizsgált vegyi anyag alkalmazása: a felhasználás módjának leírása, a berendezés leírása, az expozíciós arányok és mennyiségek, beleértve a vegyi anyag ellenőrzését, a kalibrációs módszer leírása és az alkalmazása során tapasztalt környezeti feltételek leírása;
- növekedési feltételek: fényerő (pl. PAR: fotoszintetikusan aktív sugárzás), megvilágítási időszak, maximum és minimum hőmérséklet, az öntözés ütemezése és módja, trágyázás;
- a magok száma edényenként, a növények száma dózisonként, az ismétlések (edények) száma expozíciós arányonként;
- a kontrollok típusa és száma (negatív és/vagy pozitív kontrollok, oldószer kontroll, ha van);
- a vizsgálat időtartama.

Eredmények:

- az összes végpontot, a vizsgálati koncentrációt/arányt és fajt tartalmazó táblázat minden ismétlés esetében;
- a csírázó növények száma és százalékos aránya a kontrollcsoporthoz viszonyítva;
- a növények élőanyagtömegének mérési eredményei (a hajtások száraz tömege vagy nedves tömege) a kontrollok százalékában;
- a növényi hajtások magassága a kontrollok százalékában, ha mérik;
- a vizsgált vegyi anyag által okozott látható sérülések százalékos aránya és a látható sérülések kvalitatív és kvantitatív leírása (klorózis, nekrozis, hervadás, levél- és szárdeformáció, valamint a hatások hiánya), a kontroll növényekkel összehasonlítva;
- a látható sérülések megítéléséhez használt értékelő rendszer leírása, ha készült vizuális értékelés;
- egy arányt tartalmazó vizsgálatok esetében a károsodás százalékos arányát kell jegyzőkönyvezni;
- az EC_x vagy ER_x (pl. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) értékek és a kapcsolódó megbízhatósági határok. Ha regressziós elemzést végeznek, biztosítani kell a standard hibát a regressziós egyenlethez, valamint a standard hibát az egyéni paraméterek becsléséhez (pl. emelkedés, metszés);
- a NOEC (és LOEC) érték, ha kiszámították;
- a statisztikai eljárások és feltételezések leírása;
- ezen adatok és a vizsgált faj dózis-válasz összefüggésének grafikus bemutatása.

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

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

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

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

1. függelék

Fogalommeghatározások

Hatóanyag (a.i.), (vagy aktív anyag (a.s.)): egy specifikus biológiai hatás (pl. rovarirtás, növénybetegségek elleni védekezés, gyomirtás a kezelt területen) elérése céljából tervezett anyag, más néven technikai minőségű hatóanyag, aktív anyag.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Növényvédő szerek (CPP vagy PPP) vagy peszticidok: adott biológiai aktivitással rendelkező anyagok, amelyeket szándékosan használnak a termés kártevőktől (pl. gombás betegségek, rovarok és versengő növények) való megóvása érdekében.

EC_x, x %-os hatáskoncentráció vagy ER_x, x %-os hatásarány: az a koncentráció vagy arány, amely x %-os nemkívánatos változást vagy módosulást eredményez a vizsgált végpontban a kontrollhoz viszonyítva (pl. a csírázás, a hajtástömeg, vagy a megmaradó növények végső számának 25 %-os vagy 50 %-os csökkenése, illetve a látható károsodás 25 %-os vagy 50 %-os növekedése EC₂₅/ER₂₅-nek vagy EC₅₀/ER₅₀-nek minősül).

Csírázás: a koleoptil vagy a sziklevel megjelenése a talaj felülete felett.

Készítmény: a kereskedelemben kapható formulázott termék, amely az aktív anyagot (hatóanyagot) tartalmazza, más néven végső készítmény⁽¹⁾ vagy tipikus végfelhasználói termék (typical end-use product, TEP).

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek alkalmazása esetén hatás volt megfigyelhető. Ebben a vizsgálatban a LOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva, és magasabb, mint a NOEC-érték.

Nem célzott növények: Azok a növények, amelyek kívül esnek a célnövény területén. A növényvédő szerek esetében ez általában a kezelt területen kívüli növényeket jelenti.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legmagasabb koncentrációja, amelyen hatás nem volt megfigyelhető. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Fitotoxicitás: A növények normális megjelenési mintájától és növekedésétől egy adott vegyi anyag hatására kialakuló káros eltérések (mérések és vizuális értékelés alapján).

Ismétlés: az a vizsgálati egység, amely megtestesíti a kontrollcsoportot és/vagy a kezelési csoportot. Ezekben a vizsgálatokban az edényt definiálják ismétlésként.

Vizuális értékelés: A látható károsodás értékelése a növény állásának, életerejének, fejlődési rendellenességeinek, klorózisának, nekrozisának, és általános megjelenésének megfigyelése alapján, a kontrollal összehasonlítva.

Vizsgált vegyi anyag: Az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

⁽¹⁾ Végső készítmény: Az aktív vegyi anyagot (hatóanyagot) tartalmazó, a kereskedelemben értékesített formulázott termék.

2. függelék

A növények vizsgálata során történelmileg használt fajok jegyzéke

Család	Faj	Közismert név
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Sárgarépa
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Napraforgó
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Saláta
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Fehér mustár
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kínai kel
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Olajrepcse
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Káposzta
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Tarlórépa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Kerti zsázsa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Retek
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Cukorrépa
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Uborka
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (G. <i>soja</i>)	Szójabab
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Mungóbab
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Törpe bab, zöldbab, kerti bab
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Borsó
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum- graecum</i>	Görögszéna
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Szarvaskerep
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Vöröshere
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Bükköny
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Len
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Hajdina
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Paradicsom

Család	Faj	Közismert név
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Vöröshagyma
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Zab
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Árpa
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Évelő perje
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Rizs
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Rozs
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Cirokmag, shattercane
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Búza
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Kukorica

A lehetséges nem terményfajok jegyzéke

OECD potenciális fajok növényi toxicitás vizsgálatára.

Megjegyzés: Az alábbi táblázat 52 nem terményfajról tartalmaz információt (az egyes tételekhez kapcsolódó hivatkozások zárójelben vannak megadva). A megadott csírázási arányok a publikált szakirodalomból származnak és csak általános útmutatóként szolgálnak. Az egyéni tapasztalatok a mag beszerzési forrásától és egyéb tényezőktől függően változhatnak.

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (bojtorjános tüskemag)	A, B bolygatott területek, sövények, legelők (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció (7, 14, 18, 19) érlelésre lehet szükség (19) csírázást a sötétség gátolja (1, 19) különleges kezelést nem igényel (5)	POST (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (angol százszorszép)	P rétek, szántók, gyeppek (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (búzavirág)	A mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16)	4,1–4,9 (4, 14)	L = D (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	különleges kezelést nem igényel (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (fekete imola)	P mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	érlelésre lehet szükség (18, 19) csírázást a sötétség gátolja (19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (örménygyökér)	P nedves, zavart helyek (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	A, F	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (közönséges oroszlánfog)	P mezők, utak mente, bolygatott területek (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (17, 18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (borzas kúpvirág)	B, P zavart (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	különleges kezelést nem igényel (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (kanadai aranyvessző)	P legelő, nyílt területek (16)	0,06–0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	keverje össze egyenlő rész homokkal és áztassa 500 ppm gibberellinsavba 24 órán keresztül (11) különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (szerbtövis)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	25–61 (14, 29)		0(1): 5(29):		a csírázást a sötétség gátolhatja (1) áztassa meleg vízben 12 órán keresztül (29)	PRE & POST (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (szúrós szerbtövis)	A nyílt élőhelyek (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		sztratifikáció (14) különleges kezelést nem igényel (6)	PRE & POST (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (olasz szerbtövis)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		különleges kezelést nem igényel (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (réti kakukktorma)	P mezők, utak mente (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (réti kakukkszegfű)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	érlelésre lehet szükség (18) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 15, 22–26)	POST (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (fehér libatop)	A mezők széle, bolygatott területek (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	kezelés a mag színétől függően (19) nyugalmi állapot száraz tárolóban (19) a csírázást a sötétség gátolja (1, 18, 19) hideg sztratifikáció (18) különleges kezelést nem igényel (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (közönséges orbáncfű)	P mezők, szántóföldek, nyílt élőhelyek (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (borostyánlevelű hajnalka)	A utak mente, nyílt élőhelyek, kukoricaföldek (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (palka)	P szántóföldek, legelők, utak mente (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (szarvaskerep)	P füves területek, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	sztratifikáció (14, 19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (Cassia, sarlófű)	A nedves erdő (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		áztassa vízben 24 órán keresztül (9) sztratifikáció (14) a mag életképessége a színétől függően eltérő (1) különleges kezelést nem igényel (6)	POST (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (kender)	A öntéstalaj (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10–20 (9, 21)		áztassa vízben 24 órán keresztül (9) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (vöröshere)	P mezők, utak mente, szántófield (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	sztratifikáció (14, 18) érlelésre lehet szükség (19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1, 19) különleges kezelést nem igényel (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (szúrós gyöngyajak)	P nyílt területek (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		különleges kezelést nem igényel (4, 14)	POST (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (fodormenta)	P nedves területek (16)	2,21 (4)		0 (4)		különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	F	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (illatos macskamenta)	P bolygatott területek (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		különleges kezelést nem igényel (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (közönséges gyíkfü)	P szántók, füves területek, bolygatott területek (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) nagyobb magvak esetén jobb csírázás (1) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (orvosi tisztesfű)	P gyepek, mezsgyék (19)	14-18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (sárga selyemmályva)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	sztratifikáció (14) különleges kezelést nem igényel (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (indiai mályva)	A mezők, utak mente (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		sztratifikáció (14) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (mák)	A mezők, szántóföldek, bolygatott helyek (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció és szkarifikáció (1, 19, 32) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (cérnatippan)	pázsit, legelő (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 17–19) különleges kezelést nem igényel (10)	POST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (parlagi ecsetpázsit)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	szkarifikáció (14) kezelje 101 mg/l KNO ₃ -oldattal (14) meleg sztratifikáció (1) a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (vadzab)	A megművelt területek, nyílt élőhelyek (16)	7–37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	szkarifikáció (7, 32) a csírázást a sötétség gátolja (1) hideg sztratifikáció (1, 18) különleges kezelést nem igényel (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (fedélrozsok)	A mezők, utak mente, szántóföldek (16)	0,45–2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		érlelési periódus (1, 7, 32) a csírázást a fény gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (taréjos cincor)	P mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (19) különleges kezelést nem igényel (14, 29)	POST (5)	A	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (pirók-ujjasmuhar)	A mezők, gyepek, nyílt élőhelyek (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	szkarifikáció, hideg sztratifikáció és érlelés (1, 7, 14, 32) kezelje 101 mg/l KNO ₃ -oldattal (14) a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (közönséges kakaslábű)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		szkarifikáció (7, 32) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (észak-amerikai vadrozsa)	P parti, bolygatott területek (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14–28 (11)	különleges kezelést nem igényel (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (réti csenkesz)	P mezők, nedves területek (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	különleges kezelést nem igényel (10, 19)	POST (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (éves árpa)	A legelők, utak mente, nyílt élőhelyek (16)	3,28 (14)				meleg sztratifikáció (1) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1)	PRE (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (mezei komócsin)	P legelők, szántóföldek, bolygatott helyek (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	a csírázást a sötétség gátolja (19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (17) különleges kezelést nem igényel (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (szulák keserűfű)	A nyílt élőhelyek, utak mente (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		hideg sztratifikáció 4–8 hétig (1, 2, 4, 20, 29) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (lapulevelű keserűfű)	A nedves talaj (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) a csírázást a sötétség gátolja (18) hideg sztratifikáció (1) különleges kezelést nem igényel (5)	PRE & POST (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (pennsylvániai borsos keserűfű)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		hideg sztratifikáció 4 héten át 0–5 °C hőmérsékleten (1, 29) a csírázást a sötétség gátolja (1)	PRE (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (baracklevelű keserűfű)	A bolygatott területek, szántóföld (16, 19)	2,1-2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	szkarifikáció, hideg sztratifikáció, gibberelinsav-kezelés (14) hideg sztratifikáció, érlelés (17–19) a csírázást a sötétség gátolja (19) különleges kezelést nem igényel (13)	POST (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (bodros lórom)	P szántóföldek, utak mente, nyílt területek (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) érlelésre lehet szükség (18) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (mezei tikszem)	A szántók, nyílt területek, bolygatott területek (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció, gibberellinsav-kezelés (1, 14, 18, 19, 32) a csírázáshoz fényre van szükség (1) különleges kezelést nem igényel (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (réti boglárka)	P szántóföldek, utak mente, nyílt területek (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (erdei gyömbérgyökér)	P sövények, nedves területek (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) meleg sztratifikáció (1) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (ragadós galaj)	A szántók, nedves területek, bolygatott területek (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	hideg sztratifikáció (1, 18, 19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) a csírázást a fény gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (közönséges galaj)	P sövényfalak, nyílt területek (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (piros gyűszűvirág)	B, P sövények, nyílt területek (16, 19)	0.1-0.6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 17-19) különleges kezelést nem igényel (4, 22-26)	POST (4, 22-26)	D, G, F	

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ⁽¹⁾ és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ⁽²⁾	Ültetési mélység (mm) ⁽³⁾	Csírázási idő (nap) ⁽⁴⁾	Különleges kezelések ⁽⁵⁾	Toxicitási vizsgálat ⁽⁶⁾	Mag beszerzési források ⁽⁷⁾	Egyéb hivatkozások ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (perzsa veronika)	A szántók, nyílt területek, bolygatott területek (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19): 5 (96 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) hideg sztratifikáció (18) különleges kezelést nem igényel (14)	PRE & POST (28)	A	32

⁽¹⁾ A = Egynyári, B = Kétnyári, P = évelő.

⁽²⁾ A 11.,14. és 33. irodalom a csírázás kiváltásához szükséges fény (L) és sötétség (D) arányát mutatja be. A 3., 6., 9., 10., 13. és 20. irodalom az üvegházakban szükséges növekedési feltételeket mutatja be.

⁽³⁾ A 0 mm azt jelzi, hogy magokat a talaj felszínén vetették el vagy a magoknak fényre van szükségük a csírázáshoz.

⁽⁴⁾ A megadott számok a napok számát jelentik, amely alatt a magok egy adott százaléka kicsírázott a megadott irodalom szerint, pl. 3 nap (50 %) csírázás (19. irodalom).

⁽⁵⁾ Az érés és/vagy sztratifikáció időtartama nem mindig áll rendelkezésre. A hideg kezelésre vonatkozó követelmény kivételével a hőmérsékleti feltételek nincsenek meghatározva az üvegházi kísérletekben, mivel korlátozott a hőmérséklet-szabályozás lehetősége. A legtöbb mag kicsírázik az üvegházakban tapasztalható normál hőmérsékletingadozás mellett.

⁽⁶⁾ Azt jelzi, hogy a fajt csírázás előtti (PRE) és/vagy csírázás utáni (POST) herbicidekkel végzett növényi toxicitási vizsgálatban használták-e fel.

⁽⁷⁾ Példát (példákat) ad a kereskedelmi vetőmag-beszállítókra.

⁽⁸⁾ Megad két figyelembe vett alternatív irodalmat.

Hivatkozott vetőmag-beszállítók

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

IDÉZETT IRODALOM

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

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

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

4. függelék

Példák bizonyos terményfajok megfelelő növekedési feltételeire

Az alábbi feltételeket alkalmasnak találták 10 terményfaj esetében, és iránymutatásként lehet használni a növesztőkamrában végzett vizsgálatokhoz bizonyos egyéb fajok esetében is:

A szén-dioxid koncentrációja. 350 ± 50 ppm;

Relatív páratartalom: 70 ± 5 % a megvilágított időszakokban és 90 ± 5 % a sötét időszakokban;

Hőmérséklet: 25 ± 3 °C nappal, 20 ± 3 °C éjjel;

Megvilágítási időszak 16 óra megvilágítás/8 óra sötétség, 400–700 nm átlagos hullámhosszat feltételezve;

Fény: a fényerő 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, a növény tetején mérve.

A terményfajok a következők:

- paradicsom (*Solanum lycopersicon*);
 - uborka (*Cucumis sativus*);
 - saláta (*Lactuca sativa*);
 - szója (*Glycine max*);
 - káposzta (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
 - sárgarépa (*Daucus carota*);
 - zab (*Avena sativa*);
 - évelő perjemag (*Lolium perenne*);
 - kukorica (*Zea mays*);
 - vöröshagyma (*Allium cepa*).
-

C.32. TELEVÉNYFÉRGEK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 220. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A vizsgálat célja a vegyi anyagoknak az *Enchytraeus albidus* (Henle 1873) televényférgek reprodukciós teljesítményére a talajban kifejtett hatásának értékelése. A vizsgálat alapvetően az Umweltbundesamt, Németország által kifejlesztett módszeren alapul (1), amelyet körvizsgálattal ellenőriztek (2). A vegyi anyagok televényférgekre és földigilisztákra gyakorolt toxicitására vonatkozó egyéb vizsgálati módszereket is figyelembe vettek (3) (4) (5) (6) (7) (8).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Az *Enchytraeus* nemzetségbe tartozó talajlakó annelid férgek ökológiailag releváns fajok az ökotoxikológiai vizsgálatok szempontjából. Míg a televényférgek gyakran megtalálhatók földigilisztákat tartalmazó talajokban, gyakran bőségesen előfordulnak olyan talajokban is, ahonnan a földigiliszták hiányoznak. A televényférgeket laboratóriumi vizsgálatok, valamint feltéren- és terepvizsgálatok céljára is lehet használni. Gyakorlati szempontból számos *Enchytraeus* faj könnyen kezelhető és tenyészthető, és a generációs idejük lényegesen rövidebb, mint a földigilisztáké. A televényférgekkel végzett reprodukciós vizsgálat időtartama ezért csak 4–6 hét, míg a földigilisztákkal (*Eisenia fetida*) végzett vizsgálaté 8 hét.
3. A szárazföldi környezetben élő televényférgekre vonatkozó alapvető ökológia és ökotoxikológiai információk a (9) (10) (11) (12) szakirodalmi hivatkozásban található.

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Kifejlett televényférgeket teszünk ki a vizsgált vegyi anyag mesterséges talajba kevert koncentrációsorozatának. A vizsgálat két lépésből áll: a) dózisbehatóró vizsgálat (ha nem áll elegendő információ rendelkezésre), amelyben a kéthetes expozíció után mért mortalitás a fő végpont, illetve b) meghatározó szaporodásvizsgálat, amely során a szülő állat által nemzett összes utódot és a szülő állatok túlélési arányát értékelik. A meghatározó vizsgálat időtartama hat hét. Az első három hét után a kifejlett férgeket eltávolítjuk, és a morfológiai változásokat jegyzőkönyvezzük. Újabb három hét múlva megszámláljuk a kifejlett férgek által előállított bábokból kikelt utódokat. A vizsgált vegyi anyagnak kitett állatok reprodukciós teljesítményét összehasonlítjuk a kontrollcsoporttal (vagy -csoportokkal) i. az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és/vagy ii. az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) meghatározása érdekében. Ez utóbbinál regressziós modell segítségével becsüljük meg azt a koncentrációt, amely x %-kal csökkenti a reprodukciós teljesítményt. Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) értékének a vizsgálati koncentrációk által meghatározott tartományon belül kell elhelyezkednie annak érdekében, hogy az EC_x értéket extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. A vizsgált vegyi anyag vízben való oldhatóságának, $\log K_{ow}$ értékének, talaj-víz megoszlási hányadosának (pl. e melléklet C.18. vagy C19. fejezete) és gőznyomásának lehetőleg ismertnek kell lennie. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk, mint például a fotolízis és a hidrolízis sebessége.
6. Ez a vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYSÉGE

7. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:
 - a kifejlett férgek mortalitási aránya nem haladhatja meg a 20 %-ot a dózisbehatóró vizsgálat végén és a reprodukciós teszt első három hetében.
 - feltételezve, hogy edényenként 10 férget használunk a vizsgálat összeállításakor, edényenként átlagosan legalább 25 fiatal egyednek kell előállítani a vizsgálat végéig.
 - a fiatal egyedek átlagos számának relatív szórása nem haladhatja meg az 50 %-ot a reprodukciós vizsgálat végén.

Ha a vizsgálati nem felel meg a fenti érvényességi kritériumoknak, a vizsgálatot abba kell hagyni, kivéve, ha a vizsgálat folytatása megfelelően indokolható. Az indoklást a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

8. Szabályos időközönként vagy esetleg minden vizsgálat keretében tesztelni kell egy referencia-vegyianyagot annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz nem változott jelentősen az idő múlásával. Megfelelő referencia-vegyianyag a karbendazim, amelyről kimutatták, hogy befolyásolja a televényférgek túlélési arányát és reprodukcióját (13) (14), valamint egyéb olyan anyagokat is lehet használni, amelyek toxicitási adatai jól ismertek. A körvizsgálatban az AgrEvo Company (Frankfurt, Németország) által szállított, Derosal[™] kereskedelmi néven ismert karbendazim-készítményt használták, amely 360 g/l (32,18 %) hatóanyagot tartalmaz (2). A körvizsgálatban meghatározott reprodukciós EC₅₀ érték az 1,2 ± 0,8 mg hatóanyag (a.i.)/kg száraz tömeg tartományban helyezkedett el (2). Amennyiben a vizsgálati sorozat pozitív toxikus standardot is tartalmaz, egyetlen koncentrációt kell alkalmazni, és az ismétlések számának meg kell egyeznie a kontrolloknál használt ismétlésszámmal. A karbendazim esetében az 1,2 mg hatóanyag/kg száraz tömeg (folyékony készítményként) vizsgálatát ajánlott.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Berendezések

9. A vizsgálati edények üvegből vagy más, kémiaiilag semleges anyagból legyenek. Az üvegedények (pl. térfogat: 0,20–0,25 liter; átmérő: ≈ 6 cm) alkalmasak erre a célra. Az edényeket átlátszó (pl. üveg vagy polietilén) fedéllel kell lefedni, aminek célja, hogy csökkentse a víz elpárolgását, miközben lehetővé teszi a gázcserét a talaj és a légkör között. A fedélnek átlátszónak kell lennie, hogy átértesse a fényt.
10. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:
 - szárítószekrény;
 - sztereomikroszkóp;
 - pH-mérő és fotométer;
 - megfelelő pontos mérlegek;
 - megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;
 - megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeknek van fedele);
 - inkubátor vagy kis helyiség klímaberendezéssel;
 - csipeszek, horgok vagy hurkok;
 - fotótál.

A mesterséges talaj előkészítése

11. Ebben a vizsgálatban mesterséges talajt használunk (5) (7), amelynek összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on állandó tömegig szárítva):
 - 10 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2 ± 1 mm részecskeméret fogadható el); a vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott ellenőrizni, hogy a friss tőzegtétellel készített talaj alkalmas-e a férgek tenyésztésére;
 - 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinitartalommal);

- körülbelül 0,3–1,0 % kalcium-karbonát (CaCO_3 , porított, analitikai tisztaságú) $\text{pH} = 6,0 \pm 0,5$ eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ;
- körülbelül 70 % levegőn szárított kvarchomok (a CaCO_3 szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, a részecskék legalább 50 %-a 50–200 mikron között legyen.

A talaj meghatározó vizsgálatban való használata előtt célszerű igazolni, hogy a mesterséges talaj alkalmas a férgek tenyésztésére és a vizsgálat érvényességi kritériumainak teljesítésére. Különösen ajánlott ilyen ellenőrzést végezni annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálat elvégzése nem sérül, ha a mesterséges talaj szerves széntartalmát lecsökkentik, pl. a tőzegtartalom 4–5 %-ra való csökkentésével és a homoktartalom megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul. Kimutatták, hogy a fentebb említettnél alacsonyabb – például 2,7 % (15) – szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált *Enchytraeus albidus* esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és az eddigi – bár korlátozott – tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalmú mesterséges talajjal is elérhető.

Megjegyzés: Ha a további (pl. magasabb szintű) vizsgálatok során természetes talajt használunk, a talaj alkalmasságát és a vizsgálat érvényességi feltételeinek teljesítését is demonstrálni kell.

12. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). Ezt legalább egy héttel a vizsgálat megkezdése előtt kell megtenni. A kevert talajt két napig tárolni kell annak érdekében, hogy a savassága egyensúlyba kerüljön/stabilizálódjon. A pH-érték meghatározása céljából a talajból és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid (CaCl_2) oldatból készült 1:5 arányú keveréket használunk (lásd a (16) szakirodalmi hivatkozást és a 3. függelékét). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb (lásd a 11. pontot), a pH-t megfelelő mennyiségű CaCO_3 hozzáadásával lehet beállítani. Ha a talaj túl lúgos, a 11. pontban említett – CaCO_3 nélkül készített – keverék hozzáadásával lehet beállítani.
13. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni. Egy vagy két nappal a vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesítjük annyi ionmentesített víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom (a maximális víztartó képesség 40–60 %-a) körülbelül felét kapjuk. A vizsgálat kezdetén az előnedvesített talajt részekre kell osztani a vizsgálati koncentrációk (és adott esetben a referencia-vegyianyagok), illetve a vizsgálatban használt kontrollok számának megfelelően. A nedvességtartalmat a maximális WHC 40–60 %-ára kell beállítani a vizsgált vegyi anyag oldatának és/vagy desztillált vagy deionizált víz hozzáadásával (lásd a 19–21. pontot). A nedvességtartalmat a vizsgálat elején és végén is meg kell határozni (105 °C-on tömegállandóságig történő szárítással), és annak a férgek túléléséhez optimális tartományon belül kell lennie. A talaj nedvességtartalmának durva ellenőrzésére alkalmas módszer, ha enyhén megnyomjuk a talajt a kezünkben, és ha a nedvességtartalom megfelelő, kis vízcspekpek jelennek meg az ujjaink között.

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

14. Az ajánlott vizsgálati faj az *Enchytraeus albidus* (Henle 1837, fehér televényféreg), amely *Enchytraeidae* család tagja (*Oligochaeta* rend, *Annelida* törzs). Az *E. albidus* a televény férgek egyik legnagyobb méretű faja, már 35 mm hosszúságú példányokat is feljegyeztek (17) (18). Az *E. albidus* világszerte elterjedt és egyaránt megtalálható a tengeri, édesvízi és szárazföldi élőhelyeken, elsősorban bomló szerves anyagokban (moszat, komposzt), illetve ritkán réteken is (9). A faj széles ökológiai toleranciája és néhány morfológiai eltérés azt jelzi, hogy különböző fajtái létezhetnek.
15. Az *E. albidus* haleledelként kereskedelmi forgalomban kapható. Ellenőrizni kell, hogy a tenyészetben ne legyenek más, általában kisebb fajok (1) (19). A tenyészet ilyen szennyeződése esetén az összes férget át kell mosni vízzel egy Petri-csészében. Az *E. albidus* nagy kifejlett példányait kell ezután kiválasztani (sztereómikroszkóp segítségével) az új kultúra elindításához, a többi férget pedig ki kell dobni. Az *E. albidus* könnyen, sokféle szerves anyagban lehet tenyészteni (lásd a 4. függelékét). Az *E. albidus* életciklusa rövid, mivel a teljes érettséget 33 nap (18 °C-on) és 74 nap (12 °C-on) között éri el (1). Kizárólag a laboratóriumban legalább 5 hétig (egy generáción át) probléma nélkül tartott kultúrák használhatók fel a vizsgálatához.

16. Az *Enchytraeus* nemzetség más fajai is alkalmasak a vizsgálatra, pl. az *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) vagy az *E. crypticus* (Westheide & Graefe 1992) (lásd az 5. függelék). Más televényféreg fajok használata esetén a használt fajt egyértelműen azonosítani, a választást pedig indokolni kell a jegyzőkönyvben.
17. A vizsgálatban felhasznált állatok kifejlett férgek. Petéikkel (fehér foltok) kell rendelkezniük a clitellum régióban, és a méretüknek megközelítőleg azonosnak kell lennie (körülbelül 1 cm-es hosszúság). A tenyészkultúrát nem szükséges szinkronizálni.
18. Ha a televényféregket nem a végső vizsgálatához használt talajban és feltételek mellett tenyésztik (beleértve a táplálást), akkor legalább 24 órán keresztül, de legfeljebb három napig akklimatizálni kell őket. A vizsgálat elvégzéséhez szükséges mennyiségnél nagyobb számú kifejlett egyednek kell akklimatizálni, hogy lehetőség legyen a sérült, vagy más okból alkalmatlan példányok kizárására. Az akklimatizációs időszak végén csak a petéket tartalmazó és viselkedési rendellenességeket (pl. a féreg próbál kimenekülni a talajból) nem mutató féregket választjuk ki a vizsgálatához. A féregket ékszerészcsipesszel, horoggal vagy hurokkal óvatosan kell eltávolítani és kis mennyiségű friss vizet tartalmazó Petri-csészébe helyezni. Erre a célra az e melléklet C.20. fejezetében (*Daphnia magna* szaporodásának vizsgálata) javasolt mesterséges friss vizet kell előnyben részesíteni, mert az ionmentesített, ioncserélt vagy csapvíz káros lehet a férgekre. A féregket sztereomikroszkóp alatt meg kell vizsgálni, és a petéket nem tartalmazó féregket ki kell dobni. Ügyelni kell a kultúrákat esetleg megfertőző atkák vagy ugróvilások eltávolítására és kidobására. A vizsgálat során fel nem használt egészséges féregket vissza kell helyezni a törzstenyészetbe.

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált anyagból ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely az adott vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Javasolt a kívánt nedvességtartalom (azaz a maximum WHC 40–60 %-a) eléréséhez szükséges mennyiségű vizet használni (lásd a 13. pontot). A vizsgált vegyi anyag mindegyik oldatát alaposan össze kell keverni egy tétel előnedvesített talajjal a vizsgálati edénybe helyezés előtt.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. Vízben oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldódó vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani egy megfelelő hordozó (például aceton) lehető legkisebb mennyiségében. Csak illékony oldószereket szabad használni. A hordozót rápermetezzük vagy összekeverjük kis mennyiségű (például 2,5 g) finom kvarchomokkal. A hordozót elszívó fülkében legalább egy órán keresztül történő párologtatással eltávolítjuk. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadása után alaposan elkeverjük úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket a vizsgálati edényekbe töltjük.
21. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,5 g finomra őrölt kvarchomokot keverünk össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverjük megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást megismétljük minden egyes vizsgált koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítünk.
22. A vegyi anyagokat általában nem kell 1 000 mg/kg száraz talaj koncentrációt meghaladó koncentrációban vizsgálni. A magasabb koncentrációban történő vizsgálat azonban az adott vizsgálat céljainak függvényében szükséges lehet.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Vizsgálati csoportok és kontrollok

23. Minden vizsgálati koncentráció esetében 20 g száraz tömegnek megfelelő mennyiségű vizsgálati talajt töltünk a vizsgálati edénybe (lásd a 19–21. pontot). A vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó kontrollokat is készítünk. Táplálékot adunk minden egyes edényhez a 29. pontban leírt eljárásnak megfelelően. Minden vizsgálati edényhez tíz véletlenszerűen kiválasztott férget rendelünk. A féregket óvatosan helyezzük át a vizsgálati

edényekbe és a talaj felszínén helyezük el őket például ékszerészcsipesz, horog vagy hurok használatával. A vizsgált koncentrációk és a kontrollok ismétléseinek száma az alkalmazott vizsgálati tervtől függ (lásd a 34. pontot). A vizsgálati edényeket véletlenszerűen helyezük el a vizsgálati inkubátorban, és pozíciójukat hetente újra véletlenszerűen megváltoztatjuk.

24. Ha hordozót használunk a vizsgált vegyi anyag bevitelére, a vizsgálati sorozat mellett egy oldószerrel permetezett vagy összekevert kvarchomokot tartalmazó kontrollsorozatot is le kell futtatni. Az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációjának meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval. Egy többlet kvarchomokot (edényenként 2,5 g) tartalmazó kontrollsorozatot kell futtatni a 21. pontban leírt eljárás szerinti bevitt igénylet vegyi anyagok esetén.

Vizsgálati körülmények

25. A vizsgálati hőmérséklet 20 ± 2 °C. A férgek kedvét a talaj elhagyásától úgy lehet elvenni, ha a vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végezzük (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények területén.
26. A talajnedvesség ellenőrzése érdekében az edényeket a vizsgálat kezdetén, majd azt követően hetente egyszer lemérjük. A tömegvesztésüket megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadásával pótoljuk. Megjegyzendő, hogy a vízvesztés csökkenthető, ha a vizsgálati inkubátorban magas levegő-páratartalmat (> 80 %) tartunk fenn.
27. A nedvességtartalmat és a pH-t a dózisbehatároló vizsgálat és a meghatározó vizsgálat elején és végén egyaránt meg kell mérni. Méréseket kell végezni a kontroll- és a kezelt (minden koncentrációval) talajmintákon is, amelyeket ugyanúgy készítünk el és tartunk fenn, mint a vizsgált tenyészeteket, azonban férgeket nem tartalmaznak. Táplálékot csak a vizsgálat kezdetekor lehet ezekhez a talajmintákhoz adni a mikrobiális aktivitás elősegítése céljából. A hozzáadott táplálék mennyiségének a vizsgálati tenyészetekhez adott táplálék mennyiségével kell megegyeznie. Ezekhez az edényekhez a vizsgálat időtartama alatt nem szükséges további táplálékot hozzáadni.

Táplálás

28. A televényféreg populáció fenntartására alkalmas táplálék használható. A mikrobiológiai szennyeződés elkerülése érdekében a használat előtt lehetőleg autoklavozott (a felmelegítés is megfelelő) zabpelyhet megfelelő tápláléknak találták.
29. A táplálékot először a férgek behelyezése előtt adjuk hozzá úgy, hogy 50 mg őrölt zabpelyhet keverünk össze a talajjal minden edényben. Ezt követően hetente egyszer adunk táplálékot maximum a 21. napig. A 28. napon etetésre nem kerül sor, mivel a kifejlett egyedeket ebben a szakaszban már eltávolítottuk, és a fiatal férgeknek ezen a ponton túl viszonylag kevés további táplálékra van szüksége. A vizsgálat során az etetés abból áll, hogy a tartályban 25 mg őrölt zabpelyhet helyezünk el a talaj felszínén, vigyázva, nehogy megsebesítsük a férgeket. A gombák szaporodásának csökkentése érdekében a zabpelyhet kis mennyiségű talaj ráhelyezésével el kell temetni a talajban. Ha el nem fogyasztott táplálék marad meg, a fejadagot csökkenteni kell.

A dózisbehatároló vizsgálat terve

30. Szükség esetén dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni, például a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával (0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg (száraz talajtömeg)). Kezelésenként és kontrollonként elegendő egy ismétlés.
31. A dózisbehatároló vizsgálat időtartama két hét. A vizsgálat végén értékeljük a férgek mortalitási arányát. A férgeket elpusztultként jegyzőkönyvezzük, ha az anterior végére gyakorolt mechanikai ingerre nem reagál. A mortalitáson kívüli egyéb információk szintén hasznosak lehetnek annak eldöntésében, hogy milyen koncentrációtartomány használható a meghatározó vizsgálatban. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlanul fekvés a vizsgálati edény üvegfala mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek jelenléte) mutatózó elváltozásokat is fel kell ezért jegyezni a megjelenő fiatal egyedekkel együtt. Az utóbbit a 6. függelékben leírt festési módszerrel lehet meghatározni.

32. Az LC_{50} hozzávetőleges értékét meg lehet határozni a mortalitási adatok geometriai átlagának kiszámításával. A meghatározó vizsgálat koncentrációs tartományának megállapítása során a szaporodásra gyakorolt hatásról azt feltételezzük, hogy az LC_{50} -nél akár 10-szer alacsonyabb is lehet. Ez azonban egy empirikus kapcsolat, és a valóság a konkrét esetben ettől eltérő lehet. A dózisbehatároló vizsgálat során tett további megfigyelések, mint például a fiatal egyedek előfordulása, segíthet pontosítani a vizsgált vegyi anyagnak a meghatározó vizsgálatban használandó koncentrációtartományát.
33. Az LC_{50} pontos meghatározására érdekében ajánlott a vizsgálatot a vizsgált vegyi anyag valamennyi koncentrációja esetében legalább négy ismétlésben és annyi koncentrációban elvégezni, amennyi legalább négy statisztikailag szignifikánsan különböző átlagos választ idéz elő. Hasonló számú koncentrációt és a (ha szükséges) párhuzamos kontrollt használunk.

A meghatározó reprodukciós vizsgálat elrendezése

34. Három elrendezést javasolnak egy körvizsgálat ajánlása alapján (2).
- A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.
 - Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) meghatározásához legalább öt koncentrációt kell megvizsgálni, és a koncentrációknak körbe kell fogniuk az EC_x értékét annak érdekében, hogy az EC_x -et extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább négy ismétlést és négy kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.
 - Egy kombinált módszer lehetővé teszi mind a NOEC, mind az EC_x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.
35. Vizsgálati edényenként tíz kifejlett férget kell használni (lásd a 23. pontot). Eledelt a vizsgálati edénybe a vizsgálat kezdetekor, majd hetente egyszer adnak (lásd a 29. pontot) a 21. nappal bezárólag. A 21. napon a talajmintákat kézzel gondosan átvizsgálják, az élő kifejlett férgeket megfigyelik és megszámlálják, illetve a magatartásbeli (pl. a féreg képtelen beásni magát a talajba vagy mozdulatlanul fekszik a vizsgálati edény üvegfala mentén) és a morfológiai változásokat (pl. nyílt sebek) feljegyzik. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a vizsgálati edényből és a vizsgálati talajból. Az előállított bábokat tartalmazó vizsgálati talajt három további hétig inkubálják megegyező vizsgálati körülmények között, kivéve, hogy etetésre csak a 35. napon kerül sor (25 mg őrölt zabpehely edényenként).
36. Hat hét után megszámlálják a frissen kikelt férgeket. A bengálvörös festésen alapuló módszer (lásd a 6. mellékletet) ajánlott, bár más nedves (de hőt nem használó) extrakciós és lebegéses technikák (lásd a 6. mellékletet) is alkalmasnak bizonyultak (4) (10) (11) (20). A bengálvörös festés ajánlott, mivel a táptalajból történő nedves extrakciót nagyban gátolhatja a szuszpendált agyagrézecskek okozta zavarosság.

Határérték-vizsgálat

37. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg koncentrációban), a reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg használatával annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC nagyobb mint ez az érték.

Összegzés és a vizsgálat ütemterve

38. A vizsgálat lépései a következőképpen foglalhatók össze:

Időpont	Dózisbehatóró vizsgálat	Meghatározó vizsgálat
-7. nap vagy korábban	— a mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése)	— a mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése)
-5. nap	— a mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése — a talaj maximális WHC értékének mérése	— a mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése — a talaj maximális WHC értékének mérése
a -5. naptól a -3. napig	— a férgek kiválasztása az akklimatizációra	— a férgek kiválasztása az akklimatizációra
a -3. naptól a 0. napig	— a férgek akklimatizációja legalább 24 órán keresztül	— a férgek akklimatizációja legalább 24 órán keresztül
-1. nap	— a mesterséges talaj előnedvesítése és tételekre osztása	— a mesterséges talaj előnedvesítése és tételekre osztása
0. nap	— a törzsoldatok elkészítése — a vizsgált vegyi anyag alkalmazása — a vizsgálati szubsztrátum bemérése a vizsgálati edényekbe — az eledel bekeverése — a férgek bevitele — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése	— a törzsoldatok elkészítése — a vizsgált vegyi anyag alkalmazása — a vizsgálati szubsztrátum bemérése a vizsgálati edényekbe — az eledel bekeverése — a férgek bevitele — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése
7. nap	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
14. nap	— a kifejlett egyedek mortalitásának meghatározása — a fiatal egyedek számának becslése — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
21. nap		— a kifejlett egyedek viselkedésének megfigyelése — a kifejlett egyedek eltávolítása — a kifejlett egyedek mortalitásának meghatározása — a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
28. nap		— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — nincs etetés

Időpont	Dózisbehatóró vizsgálat	Meghatározó vizsgálat
35. nap		— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
42. nap		— a fiatal férgek megszámlálása — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

39. Bár a 7. függelék rövid áttekintést ad, ebben a vizsgálati módszerben nincs egyértelmű statisztikai iránymutatás megadva a vizsgálati eredmények elemzésére.
40. A dózisbehatóró vizsgálatban a fő végpont a mortalitás. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés a vizsgálati edény üvegfa mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatózó elváltozásokat is fel kell azonban jegyezni a fiatal egyedek jelenlétével együtt. Rendszerint probit analízist (21) vagy logisztikus regressziót kell alkalmazni az LC₅₀ meghatározására. Olyan esetekben azonban, ahol ez az elemzési módszer nem megfelelő (pl. ha kevesebb, mint három koncentráció áll rendelkezésre részleges pusztulással), alternatív módszereket lehet alkalmazni. Ezek közé a módszerek közé tartoznak a mozgóátlagok (22), a vágott Spearman-Kärber módszer (23) vagy az egyszerű interpoláció (pl. az LC₀ és LC₁₀₀ geometriai átlaga az LC₀ négyzetgyöke és az LC₁₀₀ szorzataként számítva).
41. A meghatározó vizsgálatban a végpont a fekunditás (azaz a nemzett fiatal egyedek száma). Ugyanakkor – a dózisbehatóró vizsgálat hoz hasonlóan – minden más káros jelet is fel kell tüntetni a végleges jelentésben. A statisztikai elemzés megköveteli a szaporodás számtani átlagának és szórásának kiszámítását kezelésként és kontrollonként.
42. Ha varianciaanalízist végeztek, a szórást (s) és a szabadságfokot (df) helyettesíteni lehet az ANOVA-ból nyert összevont varianciabecsléssel és annak szabadságfokával, amennyiben a variancia nem függ a koncentrációtól. Ebben az esetben a kontoll és a kezelések varianciáit kell használni. Ezeket az értékeket általában kereskedelmi statisztikai szoftver segítségével számítják ki, ismétlésként az edényenkénti eredményeket használva. Ha a negatív és oldószeres kontrollok esetében az adatok összevonása tűnik ésszerűnek, nem pedig az egyikükkel szembeni tesztelés, meg kell ezeket a kontrollokat vizsgálni, hogy nem különböznek-e szignifikáns mértékben (a megfelelő tesztekért lásd a 45. pontban és a 7. függelékben).
43. A további statisztikai vizsgálatok és következtetések attól függenek, hogy az ismétlések értékei normál eloszlást mutatnak és homogének-e, tekintettel azok varianciájára.

A NOEC becslése

44. A nagy statisztikai erővel bíró tesztekkel kell előnyben részesíteni. Fel kell használni a korábbi körvizsgálatok során szerzett az tapasztalatokból vagy egyéb történelmi adatokból leszűrt információkat annak megítélésére, hogy az adatok nagyjából normál eloszlásúak-e. A variancia homogenitása (homoszkedaszticitás) sokkal kritikusabb. A tapasztalat azt mutatja, hogy a szórás gyakran együtt növekszik az átlaggal. Ezekben az esetekben az adatok transzformációja vezethet el a homoszkedaszticitáshoz. Az ilyen transzformációnak azonban a vizsgált adatok helyett a történelmi adatokkal kapcsolatos tapasztalatokon kell alapulnia. A homogén adatokkal többféle vizsgálatot kell végezni, például a Williams-féle próbát ($\alpha = 0,05$, egyoldalas) (24) (25), vagy bizonyos esetekben a Dunnett-féle próbát (26) (27). Meg kell jegyezni, hogy egyenlőtlen replikáció esetében a táblázat t-értékeit a Dunnett és Williams által javasoltak szerint korrigálni kell. A nagy eltérések miatt időnként a válaszok nem növekednek/csökkennek szabályosan. A monotonitástól való ilyen erős eltérés esetében a Dunnett-féle próba megfelelőbb. Ha a homoszkedaszticitástól való eltérések figyelhetők meg, ésszerű lehet közelebbről megvizsgálni a varianciára gyakorolt lehetséges hatásokat annak eldöntésére, hogy a t-próbákat lehet-e a

statisztikai erő nagyobb mértékű elvesztése nélkül alkalmazni (28). Ehelyett többszörös U-próba, például a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próba (29), vagy ha az adatok heteroszkedaszticitást mutatnak ugyan, de egyébként mögöttes monoton dózis-válasszal jellemezhetők, egy másik nemparaméteres próba [pl. a Jonckheere–Terpstra- (30) (31) vagy a Shirley- (32) (33) próba] is alkalmazható, és általában előnyben kell ezeket részesíteni a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próbákkal szemben. (lásd még a 7. függelékben található sémát).

45. Ha a határérték-vizsgálat megtörtént, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, akkor a páros Student-féle t-próbát lehet használni, vagy egyébként a Mann–Whitney-féle U-próbát (29).

Az EC_x becslése

46. Bármely EC_x érték kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat használják a regressziós analízishez (lineáris vagy nem lineáris), miután felállították a megfelelő dózis-válasz függvényt. A férgek növekedésének – mint folyamatos válasznak – az EC_x értékei megfelelő regressziós analízis alkalmazásával becsülhetők (35). A kvantált adatok (mortalitás/túlélés és nemzett utódok száma) leírására alkalmas függvények között van a 2–4 paramétert tartalmazó normális szigmoid, logisztikai vagy Weibull-féle függvény, amelyek közül néhány hormetikus válaszok modellezésére is képes. Ha egy dózis-válasz függvényt lineáris regresszióanalízissel illesztettek, szignifikáns r^2 (determinációs együttható) értéket és/vagy meredekséget kell találni a regresszióanalízissel, mielőtt az EC_x becslésére kerülne sor, amelyet a kontroll átlaga x %-ának megfelelő értéknek a regresszióelemzéssel talált egyenletbe való behelyezésével végeznek el. 95 %-os megbízhatósági határokat Fieller szerint (hivatkozás: Finney (21)) vagy egyéb megfelelő modern módszerek segítségével kell kiszámítani.
47. Alternatív megoldásként a választ a modell paraméter százalékaként vagy arányaként modellezik, amelyet a kontroll átlagos válaszaként értelmeznek. Ezekben az esetekben a normál (logisztikai, Weibull) szigmoid görbe gyakran könnyen illeszthető az eredményekhez a probit regressziós eljárás alkalmazásával (21). Ezekben az esetekben a súlyozó függvényt ki kell igazítani a metrikus válaszokhoz a Christensen által megadottak szerint (36). Ha azonban hormetikus hatást figyeltek meg, a probitanalízist négyparaméteres logisztikai vagy Weibull-függvénnyel kell felváltani, amelyet nem lineáris regressziós eljárással illesztenek (36). Ha az adatokhoz nem illeszthető megfelelő dózis-válasz függvény, alternatív módszereket lehet használni az EC_x és megbízhatósági határai becslésére, mint például a Thompson-féle mozgóátlagokat (22) vagy a vágott Spearman–Karber eljárást (23).

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

48. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. vízben való oldhatóság, gőznyomás);
- a vizsgált anyag kémiai azonosítása az IUPAC nomenklatura szerint, CAS-szám, tételszám, szerkezeti képlet és tisztaság;
- a minta lejárati ideje.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

- felhasznált kísérleti állatok: faj, tudományos név, beszerzési forrás és tenyésztési körülmények.

Vizsgálati körülmények:

- a mesterséges talaj összetevői és előkészítése;
- a vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módszere;
- a vizsgálat feltételek leírása, beleértve a hőmérsékletet, nedvességtartalmat, pH-t, stb.;
- a kísérleti terv és eljárások teljes leírása.

Vizsgálati eredmények:

- a kifejelett férgek mortalitási aránya két hét után, valamint a fiatal egyedek száma a dózisbehatóró vizsgálat végén;
- a kifejelett férgek mortalitási aránya három hetes expozíció után, valamint a fiatal egyedek teljes feljegyzése a meghatározó vizsgálat végén;
- a vizsgált szervezetekben megfigyelt fizikai vagy kóros tünetek és viselkedésbeli változások;
- A reprodukciós LC₅₀, NOEC és/vagy EC_x (pl. EC₅₀, EC₁₀) érték, adott esetben konfidenciaintervallumokkal, a kiszámítására használt illesztett modell grafikonja, valamint minden olyan információ és megfigyelés, amely segítséget nyújthat az eredmények értelmezéséhez.

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) E melléklet C.8. fejezete: Földgilisztákra kifejtett toxicitás.
- (6) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földgilisztákra (*Eisenia fetida*). 1. rész: Az akut toxicitás meghatározása mesterséges talaj használatával, No. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földgilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, 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, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Ebben a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában vannak kifejezve.

LC₀ (nem letális koncentráció): a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely nem pusztítja el a kitett vizsgált szervezeteket egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC₅₀ (közepesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 50 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₅₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC₁₀₀ (teljesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 100 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₁₀₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$). Ebben a vizsgálatban a LOEC értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki. A LOEC értékét meghaladó valamennyi vizsgálati koncentrációnak rendszerint olyan hatást kell mutatnia, amely statisztikailag különbözik a kontroll hatásától. A LOEC fenti meghatározása tekintetében megállapítható bárminemű eltérést indokolni kell a vizsgálati jelentésben.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag közvetlenül a LOEC alatt elhelyezkedő azon legmagasabb koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Szaporodási sebesség: az előállított fiatal férgek átlagos számának és a felnőtt egyedek számának hányadosa a vizsgálati időszakban.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

*2. függelék***A maximális víztartó képesség meghatározása****A mesterséges talaj víztartó képességének meghatározása**

A következő módszert találták megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található.

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas eszköz (csigás cső, stb) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, és – miután megtöltötte vízzel – tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órá keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarchomokból készített ágyra kell helyezni egy zárt edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 ° C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% -ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

HIVATKOZÁSOK:

ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (Eisenia fetida). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

*3. függelék***A talaj pH-értékének meghatározása**

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 (Talajminőség. A pH meghatározása) szabványban található leírás alapján.

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid (CaCl_2) oldattal. A szuszpenziót ezután öt percig alaposan összerázzák. A rázás után a szuszpenziót legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megméri a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

HIVATKOZÁSOK:

ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

4. függelék

Az enchytraeus fajok tenyésztési körülményei

Az *Enchytraeus albidus* fajba (valamint más *Enchytraeus* fajokba) tartozó televényférgeket nagy (pl. 30 × 60 × 10 cm-es) műanyag dobozokban lehet tenyészteni, amelyek mesterséges talaj és természetes, fertőzésmentes kerti talaj 1:1 arányú keverékével vannak megtöltve. A komposzt kerülendő, mivel toxikus vegyi anyagokat, például nehézfémeket tartalmazhat. Használat előtt a faunát el kell távolítani a talajból (pl. mélyfagyasztással). Csak mesterséges talajt tartalmazó szubsztrátum is használható, de a reprodukciós sebesség alacsonyabb lehet, mint a kevert talajt tartalmazó szubsztrátum esetében. A tenyésztésre használt szubsztrátum pH-ja $6,0 \pm 0,5$ legyen.

A tenyészetet sötétben kell tárolni $15-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékleten. A 23 °C -ot meghaladó hőmérsékletek kerülendők. A talajt nyirkos, de nem nedves állapotban kell tartani. A talaj helyes nedvességtartalmát az jelzi, ha a talaj enyhe nyomásra kis vízcseppek jelennek meg az ujjaink között. Az oxigénhiányos körülményeket el kell kerülni, ezért gondoskodni kell arról, hogy a tenyészedények fedele lehetővé tegye a megfelelő gázcserét a légkörrel. A talajt minden héten gondosan fel kell törni a szellőzés megkönnyítése céljából.

A férgeket zabpehellyel lehet etetni. A zabpelyhet légmentesen zárt edényekben kell tárolni és használat előtt autoklávban kezelni, vagy felmelegíteni a lisztatka (például *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) vagy ragadozó atka (például *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) miles, *Gamasida*, *Acarina*) fertőzés elkerülése végett. A hőkezelést követően az edelt meg kell őrölni úgy, hogy az könnyen szétszórható legyen a talaj felszínén. Időről időre a zabpelyhet is ki lehet egészíteni vitaminok, tej és tőkehalmáj-olaj hozzáadásával. Más alkalmas eledel az élesztő és a »Tetramin« haleledel.

Etetésre körülbelül hetente kétszer kerül sor. Megfelelő mennyiségű zabpelyhet szórnak szét a talaj felszínén vagy kevernek bele óvatosan a szubsztrátumba, amikor a talajt a szellőzés megkönnyítése céljából feltörik. Az adott eledel abszolút mennyisége függ a szubsztrátumban jelen lévő férgek számától. Iránymutatásként, az eledel mennyiségét növelni kell, ha azt a beadástól számított egy napon belül a férgek maradéktalanul elfogyasztják. Ezzel szemben, ha a második etetés idején (egy héttel később) még maradt a korábbi eledelből a talaj felszínén, az adagot csökkenteni kell. A gombákkal szennyezett edelt el kell távolítani és ki kell cserélni. Három hónap után a férgeket át kell helyezni frissen készített szubsztrátumba.

A tenyésztési körülményeket kielégítőnek lehet tekinteni, ha a férgek: a) nem próbálják meg elhagyni a táptalajt, b) gyorsan mozognak a talajon keresztül, c) fényes testfelületűek hozzátapadt talajrészecskék nélkül, d) többé-kevésbé fehér színűek, e) különböző korosztályok figyelhetők meg a kultúrákban és f) folyamatosan szaporodnak.

5. függelék

A vizsgálat elvégzése más *enchytraeus* fajokkal

A fajok kiválasztása

Az *E. albidus*tól eltérő fajok is használhatók, de a vizsgálati eljárást és az érvényességi kritériumokat ennek megfelelően hozzá kell igazítani. Mivel sok *Enchytraeus*-faj áll rendelkezésre, amelyet laboratóriumban kielégítően fenn lehet tartani, az *E. albidus*tól eltérő fajok legfontosabb kiválasztási kritériuma az ökológiai relevancia és ezenkívül az összehasonlítható érzékenység. Formális oka is lehet más faj választásának. Például azokban az országokban, ahol az *E. albidus* nem fordul elő és importálni sem lehet (pl. karantén miatt), más *Enchytraeus* fajt kell használni.

Példák az alkalmas alternatív fajokra

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Az utóbbi években ezt a fajt a tenyésztés és a vizsgálat egyszerűsége miatt gyakran használták ökotoxikológiai vizsgálatok céljára. Azonban ez a faj kis testméretű, és ez a tény az *E. albidus* fajnál sokkal nehezebbé teszi a kezelését (különösen a festési módszer használata előtti fázisokban). Az *E. crypticus* fajról nem állapították meg teljes bizonyossággal, hogy jelen van a terepen, mivel csak földigiliszta-kultúrákban írták le. Az erre a fajra vonatkozó ökológiai követelményeknek ezért nem ismertek.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Ez a név valószínűleg közeli rokonságban álló fajok egész csoportjára vonatkozik, amelyek morfológiailag nehezen megkülönböztethetők. A vizsgálatokban történő használata nem javasolt, amíg a vizsgálatban használt egyedeket nem lehet egyetlen fajként azonosítani. Az *E. buchholzi* általában megtalálható réteken és bolygatott helyeken, illetve utak mentén.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Ez a faj eredetileg *E. »minusus«*, néven volt ismert, de a közelmúltban pontosan leírták (1). Először U. Graefe (Hamburg) találta meg egy réten, St. Peter-Ording közelében (Schleswig-Holstein, Németország). Az *E. luxuriosus* körülbelül fele akkora, mint az *E. albidus*, de nagyobb, mint a többi itt tárgyalt faj; ez az *E. albidus* jó alternatívájává teszi.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Erről a fajról eddig német és spanyol ásványi talajokon számoltak be, ahol gyakran, de általában nem túl nagy számban fordul elő. Az e nembe tartozó más kisméretű fajokkal összehasonlítva viszonylag könnyen azonosítható. Semmit nem tudunk a laboratóriumi vizsgálatokban való viselkedéséről és a vegyi anyagokkal szembeni érzékenységéről. Azt azonban megállapították, hogy könnyen tenyésztethető (E. Belotti, személyes közlés).

Tenyésztési körülmények

Az összes fentebb említett *Enchytraeus* faj tenyészthető az *E. albidus* esetében használt szubsztrátumban. Kisebb méretűk azzal jár, hogy a tenyésztőedények kisebbek lehetnek, és – bár ugyanazt az eledelt lehet használni – az adag méretét be kell állítani. E fajok életciklusa rövidebb, mint az *E. albidus* életciklusa, és gyakrabban kell etetni őket.

Vizsgálati körülmények

A vizsgálati körülmények általában megegyeznek az *E. albidus*ra vonatkozó körülményekkel, kivéve, hogy:

- a vizsgálati tartályok mérete kisebb lehet (de ez nem szükségszerű);
- a reprodukciós vizsgálat időtartama rövidebb lehet (de ez nem szükségszerű), azaz hat hét helyett négy hét; a dózisbehatóroló vizsgálat időtartamán azonban nem kell változtatni;
- tekintettel a fiatal férgek kis méretére, kifejezetten ajánlott festési módszert használni a számláláshoz;
- a »kontroll vizsgálati edényenkénti fiatal egyedek számával« kapcsolatos érvényességi feltételt »50«-re kell változtatni.

HIVATKOZÁSOK

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

6. függelék

Az extrakciós technikák részletes ismertetése

Bengálvörös festés

Ennek az eredetileg a limnikus ökológiában kifejlesztett módszernek (1) a fiatal televényférgek Enchytraeidae reprodukciós vizsgálat keretében történő megszámlálására való alkalmazását először W. de Coen (University of Ghent, Belgium) javasolta. Ettől függetlenül RIVM Bilthoven a módszer egy módosított változatát fejlesztette ki, amelyben a bengálvöröst etanol helyett formaldehiddel keverik (2) (3).

A meghatározó vizsgálat végén (azaz hat hét után) a vizsgálati edényekben található talajt átvisszük egy lapos edénybe. Erre a célra alkalmas egy Bellaplast-edény vagy egy bordázott aljú fotótál; ez utóbbi azért, mert a »bordák« a megfigyelési területen belülről korlátozzák a férgek mozgását. A fiatal egyedeket etanollal rögzítik (kb. 5 ml ismétlésenként). Az edényeket ezután vízzel feltöltik úgy, hogy a víz legfeljebb 1-2 cm-es réteget képezzen. Néhány csepp (200-300 µl) bengálvörös festéket (1 %-os etanos oldat) adnak hozzá (vagy alternatív megoldásként 0,5 % eoizint), és a két komponenst gondosan összekeverik. 12 óra múlva a férgeknek vöröses színnel meg kell festődniük és könnyű őket megszámlálni, mert a szubsztrátum felületén fognak feküdni. Alternatív módszerként a férgek megszámlálása előtt a szubsztrátum/alkohol elegyet át lehet mosni egy szitán (hálóméret: 0,250 mm). Ezzel az eljárással a kaolinit, a tőzeg, valamint a homok egy része ki fog mosódni, és ezáltal a vöröses színű férgek jobban láthatók lesznek és könnyebb lesz őket megszámlálni. Megvilágított lencsék (az objektív mérete legalább 100 × 75 mm, a nagyítás 2–3x) használata is megkönnyíti a számolást.

A festési technika edényenként néhány percre csökkenti a számolásra fordítandó időt, és iránymutatásként lehetővé kell tenni, hogy egy ember értékelje az egy vizsgálatból származó összes edényt legfeljebb két napon belül.

Nedves extrakció

A nedves extrakciót a vizsgálat végeztével azonnal meg kell kezdeni. A talajt az edényekből műanyag szitákra helyezik, amelyek hálómérete körülbelül 1 mm. A szitákat ezután egy műanyag tálakban felfüggesztettik, anélkül, hogy a sziták a tálak alját érintenék. A tálakat gondosan feltöltik vízzel, amíg a szitákon lévő minták teljesen a víz felszíne alá nem kerülnek. A jelenlévő férgek 90 %-ot meghaladó kinyerési aránya érdekében 3 napos extrakciós időtartamot kell használni 20 ± 2 °C-on. Az extrakciós időtartam végén a szitákat eltávolítják, és a vizet (egy kis mennyiség kivételével) lassan előntik, ügyelve arra, hogy ne zavarják a tálak alján található üledéket. A műanyag tálakat egy kicsit megrázzák, hogy az üledéket a felette lévő vízben szuszpendálják. A vizet átviszik egy Petri-csészébe, és – miután a talajrészecskék leülepedtek – a televényférgeket be lehet azonosítani, majd lágy acél csipesszel el lehet távolítani és sztereomikroszkóp segítségével meg lehet számolni.

Lebegés

A lebegésen alapuló módszert R. Kuperman írta le egy feljegyzésben (4). A vizsgálati edény tartalmának etanollal történő fixálása után a talajt elárasztják Ludoxszal (AM-30 kolloid szilícium-dioxid, 30 tömegszázalékos vizes szuszpenzió), amíg a talaj felszínét legfeljebb 10 és 15 mm-rel elfedi. Miután a talajt a flotációs anyaggal 2-3 percig alaposan elkeverték, a víz felszínén lebegő fiatal férgeket könnyen meg lehet számolni.

Hivatkozások

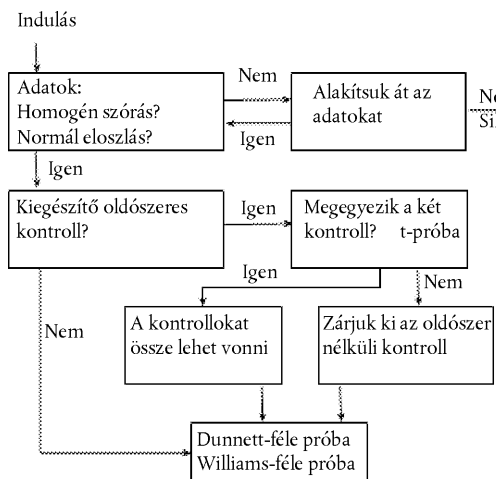
- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* **32**, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus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

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

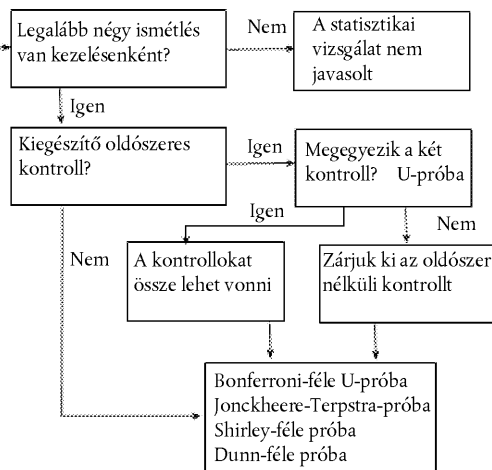
7. függelék

Az adatok statisztikai értékelésének áttekintése (a NOEC meghatározása)

Paraméteres próbák



Nemparaméteres próbák



C.33. FÖLDIGILISZTÁK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA (EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 222. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A vizsgálatot a talajban lévő vegyi anyagoknak az *Eisenia fetida* (Savigny 1826) vagy az *Eisenia andrei* (Andre 1963) földigiliszta faj reprodukciós teljesítményére (és egyéb szubletális végpontokra) gyakorolt hatásainak értékelésére tervezték (1) (2). A vizsgálatot körvizsgálattal ellenőrizték (3). Létezik egy vizsgálati módszer a földigiliszták akut toxicitási vizsgálatára (4). Számos egyéb nemzetközi és nemzeti iránymutatást tettek közzé a földigiliszták akut és krónikus vizsgálatára (5) (6) (7) (8).
2. Az *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* fajokat a talajfauna és különösen a földigiliszták tekintetében reprezentatív fajnak tekintik. A földigiliszták ökológiájára és ökotoxikológiai vizsgálatokban való használatukra vonatkozóan rendelkezésre állnak bizonyos háttérinformációk (7) (9) (10) (11) (12).

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Kifejlett férgeket teszünk ki a vizsgált vegyi anyag talajba kevert vagy – növényvédő szerek esetében – a vegyi anyag jellemző felhasználási módját tükröző eljárással a talajba bevitt vagy annak felszínére juttatott koncentrációsorozatának. A vegyi anyag bejuttatásának módja a vizsgálat céljától függ. A vizsgált koncentrációtartományt úgy választjuk ki, hogy az magában foglalja azokat a koncentrációkat, amelyek nyolc hét alatt várhatóan szubletális és letális hatásokat egyaránt okoznak. A kifejlett férgek mortalitási arányára és növekedésére gyakorolt hatásokat 4 hetes expozíció után határozzuk meg. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a talajból, és a szaporodásra gyakorolt hatásokat további 4 hét elteltével értékeljük a talajban jelen lévő utódok megszámlálásával. A vizsgált vegyi anyagnak kitett férgek reprodukciós teljesítményét összehasonlítjuk a kontrollcsoporttal (vagy csoportokkal) i. az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és/vagy ii. az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) meghatározása érdekében; ez utóbbinál regressziós modell segítségével becsljük meg azt a koncentrációt, amely x %-kal csökkenti a reprodukciós teljesítményt. Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) értékének a vizsgálati koncentrációk által meghatározott tartományon belül kell elhelyezkednie annak érdekében, hogy az EC_x értékét extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni (a fogalm meghatározásokat lásd az 1. függelékben).

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. Rendelkezésre kell állnia a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó alábbi információknak, amelyek segítik a megfelelő vizsgálati eljárások kidolgozását:
 - vízdékonyság;
 - $\log K_{ow}$;
 - gőznyomás;
 - valamint a vizsgált vegyi anyag környezeti sorsára és környezetben való viselkedésére vonatkozó információk, ahol lehetséges (pl. a fotolízis és a hidrolízis sebessége, ha a jellemző felhasználási mód miatt indokolt).
5. Ez a vizsgálati módszer minden vegyi anyag esetében alkalmazható, függetlenül annak vízdoldhatóságától. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.
6. E vizsgálati módszer nem számol a vizsgált vegyi anyag lehetséges lebomlásával a vizsgálati időszak során. Következésképpen nem lehet azt feltételezni, hogy az expozíciós koncentrációk kezdeti értékükön maradnak a vizsgálat során. Ebben az esetben a vizsgált vegyi anyag kémiai elemzése ajánlott a vizsgálat elején és végén.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. Meg kell határozni egy referencia-vegyianyag NOEC és/vagy EC_x értékét a megfelelő laboratóriumi vizsgálati körülmények garantálása érdekében, illetve annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz az idő múlásával statisztikailag nem változik. Referencia-vegyianyaggal legalább évente egyszer (vagy ha ennél ritkábban végzünk vizsgálatot, akkor a vizsgált vegyi anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan mindig) ajánlott vizsgálatot végezni. A karbendazim vagy a benomil alkalmas referencia-vegyianyagok, amelyeknek reprodukciót befolyásoló hatását kimutatták (3). Jelentős hatásokat kell megállapítani a) 1–5 mg hatóanyag (a.i.)/kg száraz tömeg vagy b) 250–500 g/ha vagy 25–50 mg/m² esetén. Amennyiben a vizsgálat-sorozat pozitív toxikus standardot is tartalmaz, egyetlen koncentrációt kell alkalmazni, és az ismétlések számának meg kell egyeznie a kontrollok esetében használt ismétlésszámmal.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

8. A kontrolloknak a következő kritériumoknak kell megfelelniük a vizsgálati eredmény érvényességéhez:
- minden ismétlésben (amely 10 kifejlett egyed tartalmaz) ≥ 30 fiatal egyed kell nemzeni a vizsgálat végéig;
 - a reprodukció relatív szórásának ≤ 30 %-nak kell lennie;
 - a kifejlett egyedek mortalitási arányának a vizsgálat első 4 hetében ≤ 10 %-nak kell lennie.
- Ha a vizsgálati nem felel meg a fenti érvényességi kritériumoknak, a vizsgálatot abba kell hagyni, kivéve, ha a vizsgálat folytatása megfelelően indokolható. Az indoklást szerepeltetni kell a jegyzőkönyvben.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Berendezések

9. Üvegből vagy más, kémiaileg semleges anyagból készült, körülbelül 1–2 liter kapacitású vizsgálati edényeket kell használni. Az edények keresztmetszeti területének körülbelül 200 cm²-nek kell lennie, hogy 500–600 g száraz tömegű szubsztrátum edénybe töltésével körülbelül 5–6 cm mélységű nedves szubsztrátumréteg legyen elérhető. Az edényt úgy kell kialakítani, hogy ne akadályozza a szubsztrátum és a légkör közötti gázcserét, valamint a fény bejutását (pl. perforált átlátszó fedéllel), de a férgek ne tudjanak kiszökni belőle. Ha a vizsgálati szubsztrátum mennyisége lényegesen meghaladja az 500–600 grammot edényenként, a férgek számát arányosan növelni kell.
10. Általános laboratóriumi felszerelés, így különösen a következők szükségesek:
- szárítószekrény;
 - sztereomikroszkóp;
 - pH-mérő és fotométer;
 - megfelelő pontos mérlegek;
 - megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;
 - megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeknek van fedele);
 - inkubátor vagy kis helyiség klímaberendezéssel;
 - csipeszek, horgok vagy hurkok;
 - vízfürdő.

A mesterséges talaj előkészítése

11. E vizsgálatban mesterséges talajt használunk (5) (7), amelynek összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on állandó tömegig szárítva):
- 10 % tőzegmoha (a lehető legközelebb a pH 5,5–6,0 értékhez, látható növényi maradványok nélkül, finomra őrölve, mért nedvességtartalomig szárítva);
 - 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinitartalommal);

- 0,3–1,0 % kalcium-karbonát (CaCO_3 , porított, analitikai tisztaságú) a $6,0 \pm 0,5$ kiindulási pH-érték eléréséhez.
- körülbelül 70 % levegőn szárított kvarchomok (a CaCO_3 szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, a részecskék legalább 50 %-a 50–200 mikron között legyen.

1. megjegyzés: A CaCO_3 szükséges mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ, beleértve az edelt is, és közvetlenül a vizsgálat előtt talaj alminták mérésével kell meghatározni. A pH-t vegyes mintában mérik 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy egy 0,01 mólos kalcium-klorid (CaCl_2) oldatban (13).

2. megjegyzés: A mesterséges talaj szerves széntartalmát csökkenteni lehet, pl. a tőzegtartalom 4-5 %-ra való csökkentésével és a homoktartalom megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul. Kimutatták, hogy az alacsonyabb – például 2,7 % (14) – szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált *Eisenia fetida* esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és a tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalommal rendelkező mesterséges talajjal is elérhető. Ezért az ilyen talajok meghatározó vizsgálatban történő használata előtt nem szükséges demonstrálni azt, hogy a mesterséges talaj lehetővé tudja tenni az érvényességi kritériumoknak való megfelelést, kivéve, ha a tőzegtartalom a fent meghatározottnál nagyobb mértékben csökken.

3. megjegyzés: Ha a további (pl. magasabb szintű) vizsgálatok során természetes talajt használnak, a talaj alkalmasságát és a vizsgálat érvényességi feltételeinek elérését is demonstrálni kell.

12. A talaj száraz összetevőit megfelelő szellőzésű helyen alaposan összekeverik (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesíteni kell annyi deionizált víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalomnak – amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-a (amely 50 ± 10 % víztartalomnak felel meg a száraz tömegre vetítve) – körülbelül felét lehessen elérni. Ez olyan szubsztrátumot eredményez, amelyben kézzel való összenyomás hatására nem mutatkozik álló vagy szabad víz. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében, az ISO 11274 (15) szabványban vagy az azzal egyenértékű EU-szabványban leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni.
13. Ha a vizsgált vegyi anyagot a talaj felületén vagy víz nélkül a talajba keverve alkalmazzák, a víz végső mennyiségét lehet a mesterséges talajba keverni a talaj elkészítése során. Ha a vizsgált vegyi anyagot kevés vízzel keverik a talajba, a többlet vizet együtt lehet adni a vizsgált vegyi anyaggal (lásd a 19. pontot).
14. A talaj nedvességtartalmát a vizsgálat elején és végén az ISO 11465 (16) szabványnak vagy azzal egyenértékű EU-szabványnak megfelelően, a talaj pH értékét pedig a 3. függelék, az ISO 10390 (13) szabvány vagy azzal egyenértékű EU-szabvány szerint határozzák meg. Ezeket a meghatározásokat a kontroll talaj egy mintájában, illetve minden egyes vizsgálati koncentráció talajmintájában is el kell végezni. A talaj pH-értéke nem módosítható, ha savas vagy lúgos vegyi anyagot tesztelnek. A nedvességtartalmat az egész vizsgálat során ellenőrizni kell az edények időközönként történő mérlegelése útján (lásd a 26. és 30. pontot).

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

15. A vizsgálatban használt faj az *Eisenia fetida* vagy az *Eisenia andrei* (1) (2). A vizsgálat elindításához kifejlett, két hónap és egy év közötti korú, clitellummal rendelkező férgekre van szükség. A férgeket egy viszonylag homogén korstruktúrájú, szinkronizált kultúrából kell kiválasztani (4. függelék). Az egy vizsgálati csoportba tartozó egyedek életkora között nem lehet 4 hétnél nagyobb különbség.
16. A kiválasztott férgeket legalább egy napig szoktatni kell a vizsgálatához használt mesterséges talajszubsztrátum típusához. Ebben az időszakban a férgeket ugyanazzal az edellel kell etetni, mint amelyet a vizsgálatához fognak használni (lásd a 31–33. pontot).
17. A vizsgálat elején 10 féregből álló csoportokat kell egyénileg lemérni, majd a csoportokat véletlenszerűen hozzárendelni a vizsgálati edényekhez. A férgeket a mérés előtt lemosás (ionmentesített vízzel), majd a felesleges vizet a férgek rövid időre szűrőpapírra helyezésével eltávolítják. Az egyes férgek nedves tömegének 250 és 600 mg között kell lennie.

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

18. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának két módszere használható: a vizsgált vegyi anyag bekeverése a talajba (lásd a 19–21. pontot), vagy a talaj felületén történő alkalmazás (lásd a 22–24. pontot). A megfelelő módszer kiválasztása a vizsgálat céljától függ. Általánosságban a vizsgált anyag a talajba való bekeverése ajánlott. Olyan alkalmazási eljárásokra lehet azonban szükség, amelyek összhangban vannak a hagyományos mezőgazdasági gyakorlattal (például a folyékony készítmény permetezése vagy speciális növényvédőszer készítmények alkalmazása, mint például a granulátumok vagy csávázószer). A talajnak a vizsgált vegyi anyaggal való kezelését elősegítő oldószer kiválasztásakor a földigilisztákra gyakorolt csekély toxicitásból kell kiindulni, és a vizsgálati elrendezésnek megfelelő oldószerkontrollt is tartalmaznia kell (lásd a 27. pontot).

A vizsgált vegyi anyag talajba keverése

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált vegyi anyagból közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely egy vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Egy társoldószerre lehet szükség, hogy megkönnyítsék a vizsgálati oldat elkészítését. Célszerű akkora mennyiségű oldatot készíteni, amennyi a végső nedvességtartalom (a maximális víztartó képesség 40–60 %-a) eléréséhez szükséges. Az oldatot alaposan összekeverik a talajszubsztrátummal, mielőtt betöltenék azt a vizsgálati edénybe.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. A vizsgált vegyi anyagot megfelelő szerves oldószer (például acetone) kis térfogatában feloldják, majd rápermetezik vagy elkeverik kis mennyiségű finom kvarchomokban. Az oldószert elszívó fülkében legalább néhány perccel keresztül történő párologtatással eltávolítják. A kezelt homokot ezután alaposan összekeverik az előnedvesített mesterséges talajjal. Ezután akkora mennyiségű ionmentesített vizet adnak hozzá a talajhoz, amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-ának megfelelő a végső nedvességtartalmat eredményez. A talaj ezután készen áll a vizsgálati edényekbe való behelyezésre. Ügyelni kell arra, hogy egyes oldószer méregzők lehetnek a földigilisztákra.

Vízben oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok és szerves oldószer

21. 10 g finomra őrölt ipari kvarchomokból és a vizsgált vegyi anyag olyan mennyiségéből, amely a vizsgálati koncentráció talajban való eléréséhez szükséges, keveréket készítenek. A keveréket ezután alaposan összekeverik az előnedvesített mesterséges talajjal. Ezután akkora mennyiségű ionmentesített vizet adnak hozzá a talajhoz, amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-ának megfelelő a végső nedvességtartalmat eredményez. A talaj ezután készen áll a vizsgálati edényekbe való behelyezésre.

A vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása

22. A talajt a férgek hozzáadása után kezelik. A vizsgálati edényeket először megtöltik nedvesített talajszubsztrátummal, majd a lemért férgeket ráhelyezik a talaj felületére. Az egészséges férgek általában azonnal beássák magukat a szubsztrátumba, következésképpen a 15 perc után a felületen maradt férgeket sérültnek kell tekinteni és ki kell cserélni. Ha a férgeket helyettesítik, az új és a lecserélt férgeket egyaránt meg kell mérni, hogy ismert legyen az expozíciós féregcsoport teljes élőszáma és a férgeket tartalmazó edény teljes súlya a vizsgálat megkezdésekor.
23. A vizsgált vegyi anyagot alkalmazzák. A vizsgált vegyi anyagot nem szabad hozzáadni a talajhoz a férgek elhelyezésétől számított fél órán belül (vagy ha férgek vannak jelen a talaj felszínén), hogy elkerülhető legyen a vizsgált vegyi anyag bőrrel való bármilyen közvetlen érintkezése. Ha a vizsgált vegyi anyag növényvédőszer, helyénvaló lehet azt a talaj felületére való permetezéssel bejuttatni. A vizsgált vegyi anyagot a talaj felszínén lehetőleg egyenletesen kell alkalmazni megfelelő laboratóriumi méretű permetező eszközzel, jelképezve a terepen történő permetezést. Az alkalmazás előtt a vizsgálati edény fedelét el kell távolítani és egy béléssel kell helyettesíteni, amely megvédi az edény oldalfalait a permettől. A bélés készülhet egy vizsgálati edényből, amelynek eltávolították az alját. Az alkalmazást a 20 ± 2 °C szórású hőmérsékleti tartományon belül kell elvégezni, vizes oldatok, emulziók vagy diszperziók esetében 600 és 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$ közötti vízal alkalmazási arányban. Az arányt megfelelő kalibrációs technikával kell hitelesíteni. A különleges készítményeket, mint a granulátumokat vagy csávázószerkeket, a mezőgazdasági felhasználással megegyező módon kell alkalmazni.

24. A vizsgálati edényeket egy óras időszakra fedetlenül kell hagyni, hogy a vizsgált vegyi anyag alkalmazással kapcsolatos bármely illékony oldószer elpárologhasson. Ügyelni kell arra, hogy ez idő alatt a férgek ne tudjanak elmenekülni a vizsgálati edényekből.

AZ ELJÁRÁS

Vizsgálati csoportok és kontrollok

25. 10 földgiliszta behelyezése ajánlott 500–600 g száraz tömegű mesterséges talajba (azaz 50–60 g talaj férgenként). Ha nagyobb mennyiségű talajt használnak, például amikor különleges alkalmazási módú növényvédő szereket (például csávázószereket) vizsgálnak, a férgenkénti 50–60 g talaj arányt a férgek számának növelésével fenn kell tartani. Tíz férget készítenek elő minden kontroll és kezelt edényhez. A férgeket vízzel lemossák, megtörlik, majd rövid időre nedvszívó papírra helyezik, hogy a felesleges víz elfolyjon.
26. A férgek vizsgálati edényekben való szétosztása során előforduló szisztematikus hibák elkerülése érdekében a vizsgálati populáció homogenitását a vizsgálathoz használt férgek forrásául számító populációból véletlenszerűen kiválasztott 20 féreg tömegének egyénileg történő megméréseivel meg kell határozni. A homogenitás ellenőrzése után féregtételeket kell választani, majd ezeket meg kell mérni és randomizálási eljárás segítségével szét kell osztani a vizsgálati edények között. A vizsgálati férgek hozzáadása után a vizsgálati edények tömegét meg kell mérni, hogy rendelkezésre álljon egy kiindulási tömeg, amelyet alapul lehet venni, amikor a vizsgálat során a talaj nedvességtartalmát ellenőrzik a 30. pontban leírtak szerint. A vizsgálati edényeket ezután a 9. pontban leírtaknak megfelelően lefedik, és elhelyezik a vizsgálati kamrában.
27. Megfelelő kontrollokat készítenek a vizsgált vegyi anyag alkalmazására szolgáló, a 18-24. pontban leírt minden módszerhez. A korábban leírt vonatkozó eljárásokat követik a kontrollok elkészítése során is, kivéve, hogy a vizsgált vegyi anyagot nem adják hozzá. Így adott esetben szerves oldószereket, kvarchomokot vagy más hordozókat alkalmaznak a kontrollok esetében is a kezelt csoportoknak megfelelő koncentrációban/mennyiségben. Ha oldószert vagy egyéb hordozót használnak a vizsgált vegyi anyag hozzáadásához, további kontrollt kell készíteni, amely nem tartalmazza a hordozót és a vizsgált vegyi anyagot, és meg kell vizsgálni, hogy a hordozó befolyásolja-e az eredményt.

Vizsgálati körülmények

28. A vizsgálati hőmérséklet 20 ± 2 °C. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végzik (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények területén.
29. A vizsgálati edényeket nem levegőztetik a vizsgálat során, de a vizsgálati edények fedeleinek kialakítása lehetőséget kell biztosítson a gázcserére, korlátozva ugyanakkor a nedvesség elpárolgását (lásd a 9. pontot).
30. A táptalajt víztartalmát a vizsgálati edényekben az egész vizsgálat alatt úgy tartják fenn, hogy rendszeres időközönként újra lemérik a vizsgálati edényeket (fedelek nélkül). A veszteségeket szükség esetén desztillált vízzel pótolják. A víztartalom nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat kezdetekor mért értékhez viszonyítva.

Táplálás

31. Bármilyen eledelt, amelyről kimutatták, hogy alkalmas a férgek tömegének legalább szinten tartására a vizsgálat alatt, elfogadhatónak tekintenek. A tapasztalat azt mutatja, hogy a zabpehely, a tehén- vagy lótrágya megfelelő eledel. Ellenőrizni kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, nematicidekkel vagy hasonló állatgyógyászati készítményekkel, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a vizsgálat során. A saját gyűjtésű tehéntrágya használata ajánlott, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható, kerti trágyaként használt tehéntrágya káros hatással lehet a férgekre. A trágyát levegőn meg kell szárítani, finomra kell őrölni és pasztőrözni kell használat előtt.
32. Az eledelt minden friss tételét a vizsgálatban történő felhasználás előtt először egy nem vizsgált féregkultúrával kell etetni, hogy meg lehessen győződni az adott tétel megfelelő minőségéről. A férgek növekedése és a bábok termelése nem csökkenhet az eledel új tételét nem tartalmazó szubsztrátumban tartott férgekhez képest (a C.8 vizsgálati módszerben ismertetett feltételek (4)).

33. Eledelt először egy nappal a férgek hozzáadása és a vizsgált vegyi anyagnak a talajon való alkalmazása után adnak. Körülbelül 5 g eledelt szétterítenek az edényekben lévő talaj felszínén és ionmentesített vízzel megnedvesítik (körülbelül 5–6 ml vízzel edényenként). Ezt követően hetente egyszer adnak eledelt a férgeknek a 4 hetes vizsgálati időszak alatt. Ha el nem fogyasztott eledel marad vissza, a fejadagot csökkenteni kell, hogy elkerüljék a gombák szaporodását vagy a penészedést. A kifejlett egyedeket a vizsgálat 28. napján eltávolítják a talajból. Ezután további 5 g eledelt adnak minden vizsgálati edényhez. A vizsgálat hátralévő 4 hetében további etetésre nem kerül sor.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

34. A vizsgált vegyi anyag toxicitásának előzetes ismerete segít a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában, pl. egy akut vizsgálatból (4) és/vagy dózisbehatóró vizsgálatokból. Ha szükséges, dózisbehatóró vizsgálatot kell végezni, például öt vizsgálati koncentrációval: 0,1, 1,0, 10, 100, és 1 000 mg/kg (talaj száraz tömeg). Kezelésként és kontrollonként egy ismétlés elegendő. A dózisbehatóró vizsgálat időtartama két hét, a mortalitást a vizsgálat végén értékelik.

Kísérleti elrendezés

35. Mivel egyetlen összefoglaló statisztika nem írható elő a vizsgálatához, ez a vizsgálati módszer a NOEC és az EC_x meghatározásáról rendelkezik. A NOEC alkalmazását a szabályozó hatóságok a belátható jövőben valószínűleg meg fogják követelni. A közeljövőben – statisztikai és ökológiai szempontok miatt – elfogadhatják az EC_x szélesebb körű használatát. Ezért egy televényférgék szaporodására alapuló vizsgálati módszer körvizsgálatából származó ajánlások alapján három elrendezést javasolnak (17).
36. A koncentrációk meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:
- A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt/tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 2,0-nél nagyobb.
 - Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) meghatározásához ajánlott a vizsgálatot legalább annyi koncentráción elvégezni, amennyi legalább négy statisztikailag szignifikánsan különböző átlagos választ idéz elő ezeken a koncentrációkon. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább két ismétlést és hat kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.
 - Egy kombinált módszer lehetővé teszi mint a NOEC, mind az EC_x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

A teszt időtartama és a mérések

37. A 28. napon az élő kifejlett férgeket megfigyelik és megszámlálják. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatózó elváltozásokat is feljegyzik. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a vizsgálati edényből, majd megszámlálják és megmériük őket. Az értékelés előtt a férgeket tartalmazó talaj áthelyezése egy tiszta tálcára megkönnyítheti a kifejlett egyedek megkeresését. A talajból eltávolított férgeket mérés előtt le kell mosni (ionmentesített vízzel), és a felesleges vizet a férgeket rövid időre szűrőpapírra helyezve el kell távolítani. Az ebben az időben fel nem lelhető férgeket elhullottnak kell tekinteni, mivel abból kell kiindulni, hogy az ilyen férgek az értékelés előtt elpusztultak és lebomlottak.
38. Ha a talajt eltávolították az edényekből, ezután visszatöltik oda (mínusz a kifejlett férgek, de tartalmazva az előállított bábokat). A talajt ezután további négy hétig inkubálják megegyező vizsgálati körülmények között, kivéve, hogy etetésre csak egyszer kerül sor ennek a vizsgálati fázisnak az elején (lásd a 33. pontot).

39. A második 4 hetes időszak végén az 5. függelékben leírt eljárások segítségével meghatározzák a vizsgálati talajban található bábokból kikelt fiatal egyedek számát, valamint a bábok számát. A férgek károsodásának vagy sérülésének jeleit is fel kell jegyezni az egész vizsgálati időszakban.

Határérték-vizsgálat

40. Ha a dózisbehataroló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg koncentrációban), a reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg vizsgálati koncentráció használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget nyújt annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC magasabb a határérték-koncentrációnál, miközben minimálisra csökkenthető a vizsgálatnál használt férgek száma. Nyolc ismétlést kell használni mind a kezelt talaj, mind a kontroll esetében.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

41. Bár a 6. függelék rövid áttekintést ad, ebben a vizsgálati módszerben nincs egyértelmű statisztikai iránymutatás megadva a vizsgálati eredmények elemzésére.
42. Az egyik végpont a mortalitás. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés a vizsgálati edény üvegfala mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatkozó elváltozásokat is fel kell azonban jegyezni a fiatal egyedek jelenlétével együtt. Rendszerint probit analízist (18) vagy logisztikus regressziót kell alkalmazni az LC_{50} meghatározására. Olyan esetekben azonban, ahol ez az elemzési módszer nem megfelelő (pl. ha kevesebb, mint három koncentráció áll rendelkezésre részleges pusztulással), alternatív módszereket lehet alkalmazni. Ezek közé a módszerek közé tartoznak a mozgóátlagok (19), a vágott Spearman–Karber módszer (20) vagy az egyszerű interpoláció (pl. az LC_0 és LC_{100} geometriai átlaga az LC_0 négyzetgyöke és az LC_{100} szorzataként számítva).
43. A másik végpont a fekunditás (azaz a nemzett fiatal egyedek száma). Ugyanakkor – a dózisbehataroló vizsgálatához hasonlóan – minden más káros jelet is fel kell tüntetni a végleges jelentésben. A statisztikai elemzés megköveteli a szaporodás kezelésenkénti és kontrollonkénti számtani átlagának \bar{x} és szórásának kiszámítását.
44. Ha varianciaanalízist végeztünk, a szórás (s) és a szabadságfokot (df) helyettesíteni lehet az ANOVA-ból nyert összevont varianciabecsléssel, illetve annak szabadságfokával, amennyiben a variancia nem függ a koncentrációtól. Ebben az esetben a kontroll és a kezelések varianciáit kell használni. Ezeket az értékeket általában kereskedelmi statisztikai szoftver segítségével számítják ki, ismétlésként az edényenkénti eredményeket használva. Ha a negatív és oldószeres kontrollok esetében az adatok összevonása tűnik ésszerűnek, nem pedig az egyikükkel szembeni tesztelés, meg kell ezeket a kontrollokat vizsgálni, hogy nem különböznek-e szignifikáns mértékben (a megfelelő tesztekért lásd a 47. pontban és a 6. függelékben).
45. A további statisztikai vizsgálatok és következtetések attól függenek, hogy az ismétlések értékei normál eloszlást mutatnak-e és a szórásnégyzetek tekintetében homogének-e.

A NOEC becslése

46. A nagy statisztikai erejű tesztekkel kell előnyben részesíteni. Fel kell használni a korábbi körvizsgálatok során szerzett tapasztalatokból vagy egyéb történelmi adatokból leszűrt információkat annak megítélésére, hogy az adatok nagyjából normál eloszlásúak-e. A variancia homogenitása (homoszkedaszticitás) sokkal kritikusabb. A tapasztalat azt mutatja, hogy a szórás gyakran együtt növekszik az átlaggal. Ezekben az esetekben az adatok transzformációja vezethet el a homoszkedaszticitáshoz. Az ilyen transzformációnak azonban a vizsgált adatok helyett a történelmi adatokkal kapcsolatos tapasztalatokon kell alapulnia. A homogén adatokkal többféle vizsgálatot kell végezni, például a Williams-féle próbát ($\alpha = 0,05$, egyoldalas) (21) (22), vagy bizonyos esetekben a Dunnett-féle próbát (23) (24). Meg kell jegyezni, hogy egyenlőtlen replikáció esetében a táblázat t-értékeit a Dunnett és Williams által javasoltak szerint korrigálni kell. A nagy eltérések miatt időnként a válaszok nem növekednek/csökkennek szabályosan. A monotonitástól való ilyen jelentős eltérés esetében a Dunnett-féle próba megfelelőbb. Ha a homoszkedaszticitástól való eltérések figyelhetők meg, ésszerű lehet közelebbről megvizsgálni a varianciára gyakorolt lehetséges hatásokat annak eldöntésére, hogy a t-próbákat lehet-e a statisztikai erő

nagyobb mértékű elvesztése nélkül alkalmazni (25). Ehelyett többszörös U-próba, például a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próba (26), vagy ha az adatok heteroszkedaszticitást mutatnak ugyan, de egyébként mögöttes monoton dózis-válasszal jellemezhetőek, más nemparaméteres próba (pl. a Jonckheere–Terpstra- (27) (28) vagy a Shirley-próba (29) (30)) is alkalmazható, és általában előnyben kell ezeket részesíteni a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próbákkal szemben. (lásd még a 6. függelékben található sémát).

47. Ha a határérték-vizsgálat megtörtént, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, akkor a páros Student-féle t-próbát lehet használni, egyébként pedig a Mann–Whitney-féle U-próbát (31).

Az EC_x becslése

48. Bármely EC_x érték kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat használják a regressziós analízishez (lineáris vagy nem lineáris), miután felállították a megfelelő dózis-válasz függvényt. A férgek növekedésének – mint folyamatos válasznak – az EC_x értékei megfelelő regressziós analízis alkalmazásával becsülhetőek (32). A kvantált adatok (mortalitás/túlélés) és a nemzett utódok számának leírására alkalmas függvények között van a 2–4 paramétert tartalmazó normális szigmoid, logisztikai vagy Weibull-féle függvény, amelyek közül néhány hormetikus válaszok modellezésére is képes. Ha egy dózis-válasz függvényt lineáris regresszióanalízissel illesztettek, szignifikáns r^2 (determinációs együttható) értéket és/vagy meredekséget kell találni a regresszióanalízissel, mielőtt az EC_x becslésére kerülne sor, amelyet a kontroll átlaga x %-ának megfelelő értéknek a regresszióelemzéssel talált egyenletbe való behelyezésével végeznek el. 95 %-os megbízhatósági határokat Fieller szerint (hivatkozás: Finney (18)) vagy egyéb megfelelő modern módszerek segítségével kell kiszámítani.
49. Alternatív megoldásként a választ a modell paraméter százalékaként vagy arányaként modellezik, amelyet a kontroll átlagos válaszként értelmeznek. Ezekben az esetekben a normál (logisztikai, Weibull) szigmoid görbe gyakran könnyen illeszthető az eredményekhez a probit regressziós eljárás alkalmazásával (18). Ezekben az esetekben a súlyozó függvényt ki kell igazítani a metrikus válaszokhoz a Christensen által megadottak szerint (33). Ha azonban hormetikus hatást figyeltek meg, a probitanalízist négyparaméteres logisztikai vagy Weibull-függvénnyel kell felváltani, amelyet nem lineáris regressziós eljárással illesztenek (34). Ha az adatokhoz nem illeszthető megfelelő dózis-válasz függvény, alternatív módszereket lehet használni az EC_x és megbízhatósági határai becslésére, mint például a Thompson-féle mozgóátlagokat (19) vagy a vágott Spearman-Kärber eljárást (20).

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- a vizsgált vegyi anyag meghatározó leírása, tételszám, CAS-szám, tisztaság;
- a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log Kow, vízoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H) és a vizsgált vegyi anyag sorsára és viselkedésére vonatkozó információk);

A vizsgált élő szervezetek:

- felhasznált kísérleti állatok: faj, tudományos név, beszerzési forrás és tenyésztési körülmények;
- vizsgált élő szervezetek kor és méret(tömeg) tartománya.

Vizsgálati körülmények

- a vizsgálati talaj előkészítésére vonatkozó adatok;
- a talaj maximális víztartó képessége;
- a vizsgált anyag talajba történő bejuttatására szolgáló technika ismertetése;
- a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt kiegészítő vegyi anyagokra vonatkozó részletek;
- a permétező eszköz kalibrációs adatai, ha szükséges;
- a kísérleti terv és eljárások leírása.
- a vizsgálati edények mérete és a vizsgálati talaj mennyisége;
- vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;

- az etetési rend leírása, a a vizsgálatban használt eledel típusa és mennyisége, etetési dátumok;
- a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat elején és végén.

Vizsgálati eredmények:

- a kifejelett egyedek mortalitása (%) vizsgálati edényenként a vizsgálat első 4 hetének végén;
- a kifejelett egyedek teljes tömege a vizsgálat elején az egyes vizsgálati edényekben;
- az élő kifejelett egyedek testtömegének változása (a kiindulási tömeg %-ában) az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat első négy hetében;
- az előállított fiatal egyedek száma az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;
- a nyilvánvaló vagy kóros tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;
- a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;
- a reprodukciós LC_{50} , NOEC és/vagy EC_x (pl. EC_{50} , EC_{10}) érték, adott esetben konfidenciaintervallumokkal, a kiszámítására használt illesztett modell grafikonja, valamint minden olyan információ és megfigyelés, amely segítséget nyújthat az eredmények értelmezéséhez;
- a dózis-válasz kapcsolat ábrázolása;
- az egyes vizsgálati edényekre vonatkozó eredmények;

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

- (1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 – 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, p. 50-82.
- (4) E melléklet C.8. fejezete: Földigiliszták akut toxicitási vizsgálata.
- (5) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigiliszta (Eisenia fetida). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.
- (6) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigiliszta (Eisenia fetida). 1. rész: Az akut toxicitás meghatározása mesterséges talaj használatával, No. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). *Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00)*. United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). *Lombriciens de France, Ecologie et systématique*. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.

- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). *Talajminőség. A pH meghatározása*, No. 10390. ISO, Genf.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): *Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests*. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1992). *Talajminőség. A vízvisszatartási jellemzők meghatározása – Laboratóriumi módszerek*, No. 11274. ISO, Genf.
- (16) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). *Talajminőség. A szárazanyag és a víztartalom meghatározása tömeg alapján – Gravimetriás módszer*, No. 11465. ISO, Genf.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). *Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; *Correction Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). *A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control*. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett C. W. (1964). *New tables for multiple comparisons with a control*. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). *Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?* *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): *A simple sequentially rejective multiple test procedure*. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); *A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives*, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); *The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking*, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); *The comparison of treatment to control group means in toxicology studies*, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); *A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control*, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (33) Christensen, E.R., (1984). *Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model*. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). *Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present*. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Ebben a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában vannak kifejezve.

LC₀ (nem letális koncentráció): a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely nem pusztítja el a kitett vizsgált szervezeteket egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC₅₀ (közepesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 50 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₅₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC₁₀₀ (teljesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 100 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC₁₀₀ értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$). Ebben a vizsgálatban a LOEC értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki. A LOEC értékét meghaladó valamennyi vizsgálati koncentrációnak rendszerint olyan hatást kell mutatnia, amely statisztikailag különbözik a kontroll hatásától. A LOEC fenti meghatározása tekintetében megállapítható bárminemű eltérést indokolni kell a vizsgálati jelentésben.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag közvetlenül a LOEC alatt elhelyezkedő azon legmagasabb koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Szaporodási sebesség: az előállított fiatal férgek átlagos számának és a felnőtt egyedek számának hányadosa a vizsgálati időszakban.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

A talaj maximális víztartó képességének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének meghatározására szolgáló alábbi módszert találták megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található (1).

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas mintavételi eszköz (csigás cső, stb.) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, töltsse meg vízzel, majd tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órán keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarchomokból készített ágyra kell helyezni egy fedett edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% -ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

HIVATKOZÁSOK:

- (1) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földgilisztára (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

*3. függelék***A talaj pH-értékének meghatározása**

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 »Talajminőség. A pH meghatározása« szabványban (1) található leíráson alapul.

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid (CaCl_2) oldattal. A szuszpenziót öt percig alaposan rázzák, majd legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megméri a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

HIVATKOZÁSOK:

- (1) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

4. függelék

Az *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* tenyésztése

A tenyésztést lehetőleg klímakamrában, $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ -on kell végezni. Ezen a hőmérsékleten és elegendő táplálék biztosításával a férgek körülbelül 2–3 hónap után éretté válnak.

Mindkét faj állati eredetű trágyák széles körében tenyészthető. Az ajánlott tenyésztőközeg ló- vagy szarvasmarhatrágya és tőzeg 50:50 arányú keveréke. Ellenőrizni kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, nematicidekkel vagy hasonló állatgyógyászati készítményekkel, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a vizsgálat során. Saját gyűjtésű, »organikus« forrásból származó trágya használata ajánlott, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható, kerti trágyaként használt trágya káros hatással lehet a férgekre. A közegnek körülbelül pH 6–7 értékkel (kalcium-karbonáttal beállítva) és alacsony ionos vezetőképességgel (6 mS/cm alatt vagy 0,5 %-nál alacsonyabb sókoncentrációval) kell rendelkeznie, valamint nem szabad ammóniával vagy állati vizelettel túlságosan szennyezettnek lennie. A szubsztrátumnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. A 10–50 literes tenyésztődobozok megfelelőek.

Ahhoz, hogy szabványos életkorú és méretű (tömegű) giliszták álljanak a rendelkezésünkre, a legcélszerűbb bábokból kezdeni a tenyésztést. A kultúrát létrehozása után úgy tartják fenn, hogy kifejlett férgeket helyeznek friss szubsztrátumot tartalmazó tenyésztődobozba 14–28 napra, lehetővé téve új bábok előállítását. A kifejlett egyedeket ezután eltávolítják, és a bábokból előállított fiatal férgeket a következő kultúra alapjául használják. A férgeket folyamatosan etetik állati hulladékkal, és időről időre friss szubsztrátumba helyezik át őket. A tapasztalat azt mutatja, hogy a levegőn szárított finomra őrölt tehén- vagy lótrágya, illetve a zabpehely megfelelő eledel. Biztosítani kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a hosszútávú tenyésztés során. A bábokból kikelték férgeket a vizsgálatok elvégzésére használják, ha azok 2–12 hónapos korúak és kifejlettnek tekinthetők.

A férgeket egészségesnek lehet tekinteni, ha azok mozognak a szubsztrátumban, nem próbálják elhagyni a szubsztrátumot, és folyamatosan szaporodnak. A szubsztrátum kimerülését jelzi, ha a férgek nagyon lassan haladnak, és posterior végük sárga színű. Ebben az esetben ajánlott friss szubsztrátum biztosítása és/vagy a betelepítési egyedsűrűség csökkentése.

5. függelék

A bábokból kikelt fiatal férgek megszámlálásának technikái

A férgek kézi kiválogatása a talajszubsztrátumból nagyon időigényes. Ezért két alternatív módszer ajánlott:

- a) A vizsgálati edényeket vízfürdőbe helyezik, kezdetben 40 °C hőmérsékleten, amely 60 °C-ra emelkedik. Körülbelül 20 perc után a fiatal férgeknek meg kell jelennie a talaj felszínén, ahonnan könnyen el lehet távolítani és meg lehet számolni őket.
- b) A vizsgálati talajt át lehet mosni szitán a van Gestel és munkatársai által kifejlesztett módszerrel (1), feltéve, hogy a talajhoz adott tőzeg és trágya vagy zabpehely finom porrá lett őrölve. Két 0,5 mm lyukbőségű szitát (átmérő: 30 cm) helyeznek egymás tetejére. A vizsgálati edény tartalmát erőteljes sugarú csapvízzel átmoszák a szitákon, és a fiatal férgek és a bábok fennakadnak, főleg a felső szitán. Fontos megjegyezni, hogy a felső szita teljes felületét nedvesen kell tartani a művelet során, hogy a fiatal férgek egy vízrétegen ússzanak, ami megakadályozza, hogy átkússzanak a szita pórusain. A legjobb eredményeket akkor lehet kapni, ha zuhanyrózsát használnak.

Miután az egész táptalajt átmosták a szitán, a fiatal férgeseket és a bábokat a felső szitából egy tálba lehet öblíteni. A tál tartalmát ezután állni hagyják, ami lehetővé teszi, hogy az üres bábok a víz felszínén lebegjenek, a teli bábok és a fiatal férgek pedig lesüllyedjenek a tál aljára. A vizet ezután leöntik, és a fiatal férgeseket és bábokat áthelyezik egy kevés vizet tartalmazó Petri-csészébe. A férgeseket megszámlálás céljából tűvel vagy csipesszel lehet eltávolítani.

A tapasztalat azt mutatja, hogy az a) módszer jobban megfelel a fiatal férgek extrakciójára, mivel azok még egy 0,5 mm-es szitán is átmosódhatnak.

A férgek (és adott esetben a bábok) talajszubsztrátumból való eltávolítására használt módszer hatékonyságát mindig meg kell határozni. Ha a fiatal férgeseket kézi válogatásos módszerrel gyűjtik össze, célszerű a műveletet kétszer elvégezni az összes mintán.

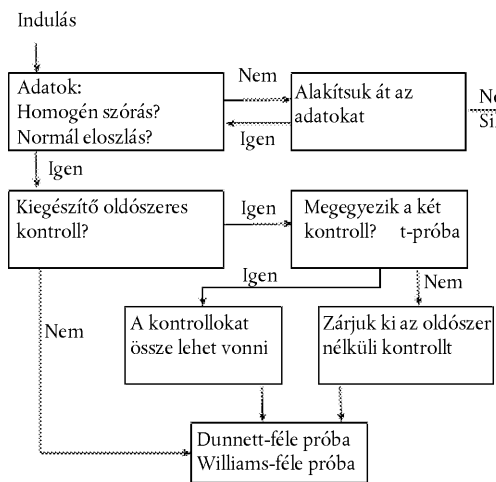
Hivatkozások:

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

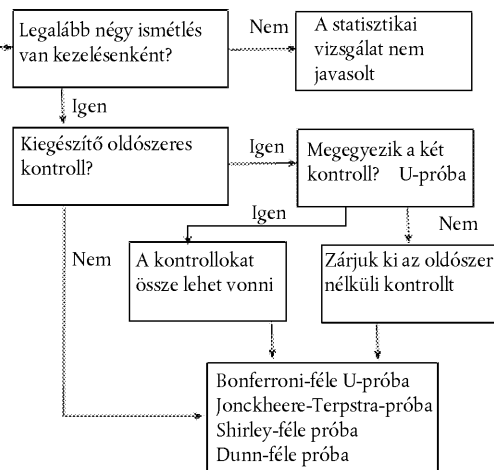
6. függelék

Az adatok statisztikai értékelésének áttekintése (a NOEC meghatározása)

Paraméteres próbák



Nemparaméteres próbák



C.34. AZ ANAEROB BAKTÉRIUMAKTIVITÁS GÁTLÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA – AZ ANAEROB EMÉSZTÉSŰ (SZENNYVÍZ) ISZAP GÁZTERMELÉSÉNEK CSÖKKENTÉSE

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 224. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. A vízi környezetbe engedett vegyi anyagok aerob és anaerob zónákon egyaránt áthaladnak, ahol lebomolhatnak és/vagy gátolhatják a bakteriális tevékenységet; néhány esetben évtizedekig vagy hosszabb ideig zavartalanul az anaerob övezetekben maradhatnak. A szennyvízkezelés első szakasza – amely elsődlegesen ülepedést jelent – aerob folyamat a felülülő folyadékban és anaerob az alulülő iszapban. Ezt a második szakaszban egy aerob zóna követi az eleveniszapos levegőztető tartályban és egy anaerob zóna az alulülő iszapban a másodlagos üleptető tartályban. A két szakaszból származó iszapot általában metán és szén-dioxid képződésével járó anaerob kezelésnek vetik alá, amelyeket általában villamos energia előállítására használnak. A tágabb környezetben az öblök, folyótorkolatok és tengerek üledékét elérő vegyi anyagok valószínűleg ezekben az anaerob zónákban maradnak a végtelenségig, hacsak biológiailag nem lebonthatók. Egyes vegyi anyagok nagyobb hányada általában eléri ezeket a zónákat fizikai tulajdonságainak köszönhetően, mint például az alacsony vízoldhatóság, a szuszpendált szilárd anyagokhoz való nagyfokú adszorpció, valamint az aerob biológiai lebomlásra való képesség hiánya.
2. Bár kívánatos, hogy a környezetbe kibocsátott vegyi anyagok mind aerob, mind anaerob körülmények között biológiailag lebonthatók legyenek, elengedhetetlen, hogy az ilyen vegyi anyagok ne gátolják a mikroorganizmusok aktivitását egyik zónában sem. Az Egyesült Királyságban már előfordult néhány eset, amikor például az ipar által kibocsátott pentaklórfenol a metánképződés teljes gátlását okozta, ami azt eredményezte, hogy a gátolt iszapot igen nagy költséggel át kellett szállítani a rothasztóból »biztonságos« helyekre, és egészséges rothasztó iszapot kellett behozni a szomszédos létesítményekből. De már előfordult számos olyan eset is, amelyben több más vegyi anyag a rothasztás kevésbé súlyos zavarát okozta – beleértve az alifás halogén-szénhidrogéneket (vegytisztítás) és a mosószereket –, ami a rothasztó hatékonyságának jelentős károsodásához vezetett.
3. Csak egyetlen vizsgálati módszer, a C.11 (1) foglalkozik a baktériumaktivitás gátlásával (az eleveniszap légzése), amely a vizsgált vegyi anyagoknak az oxigénfelvétel sebességére gyakorolt hatását értékeli szubsztrátum jelenlétében. A módszert széles körben használják, hogy korai figyelmeztetést adjon a vegyi anyagoknak a szennyvíz aerob kezelésére gyakorolt lehetséges káros hatásairól, valamint hogy megadja a vizsgált vegyi anyagoknak a különböző biológiai lebonthatósági vizsgálatok során használandó nem gátló koncentrációit. A C.43 vizsgálati módszer (2) korlátozott lehetőséget kínál a vizsgált vegyi anyagnak az anaerob iszap gáztermelésére gyakorolt toxicitásának meghatározására, amelyet szokásos szilárd anyag koncentrációjának egytizedére hígítanak ahhoz, hogy lehetővé tegye a kívánt pontosságot a százalékos biológiai lebomlás értékelése során. Mivel a hígított iszap érzékenyebb lehet a gátló vegyi anyagokkal szemben, az ISO-csoport úgy döntött, hogy összeállít egy hígítatlan iszapot tartalmazó módszert. Legalább három szöveget vizsgáltak meg (Dániából, Németországból és az Egyesült Királyságból), és végül két ISO szabványt készítettek, az egyik hígítatlan iszapot használ (ISO 13 641-1 (3)), a másik pedig századrésze hígított iszapot (ISO 13 641-2 (4)), amely a kis baktérium populációval rendelkező sarakat és üledékeket testesíti meg. Mindkét módszert körvizsgálatnak vetették alá (5); az 1. rész elfogadható szabványként megerősítést nyert, de nem volt egyetértés a 2. rész tekintetében. Az Egyesült Királyság úgy vélte, hogy mivel a résztvevők jelentős része nagyon kevés gáztermeléséről számolt be vagy egyáltalán nem volt gáztermelés, részben azért, mert a százalékos gáztér túl magas volt az optimális érzékenységhöz (75 %), az eljárás további vizsgálatot igényel.
4. Az Egyesült Királyságban korábban egy 500 ml-es palackokban hígítatlan emésztő iszapot és szubsztrátumként nyers szennyvíziszapot használó manometrikus módszert írtak le (6) (7); a készülék használata nehézkes volt, a nyers iszap bűze pedig kellemetlen. Később Shelton és Tiedje (8) kompaktabb és kényelmes készülékét, amelyet Battersby és Wilson (9) fejlesztett tovább, Wilson és munkatársai sikeresen alkalmazták. (10). Kawahara és munkatársai (11) szabványosabb iszapokat készítettek a laboratóriumban, amelyek számos vegyi anyag anaerob biológiai lebonthatóságának és gátlásának vizsgálatára használhatók. Továbbá, a szubsztrátumként használt nyers iszapot a vizsgálatokban egy századára hígított anaerob iszappal vagy alacsony bakteriális tevékenységű sárral, üledékekkel stb. váltották fel.
5. Ez a módszer hasznos információkat nyújthat a vizsgált vegyi anyag anaerob rothasztók gáztermelésére gyakorolt várható hatásának előrejelzésében. Azonban csak a működő rothasztókat jobban modellező hosszabb vizsgálatok mutathatják ki azt, hogy előfordulhat-e a mikroorganizmusok alkalmazkodása a vizsgált anyaghoz, vagy hogy a valószínűleg felszívódó vagy az iszap által adszorbeálódó vegyi anyagok toxikus koncentrációt alakíthatnak-e ki az ebben a vizsgálatban megengedtnél hosszabb idő alatt.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Anaerob rothasztó iszap (20 g/l és 40 g/l összes szilárd anyag) és egy lebomló szubsztrátum oldat keverékének alikvotjait inkubálják önmagában és a vizsgált vegyi anyag koncentrációsorozatával egyidejűleg, lezárt edényekben, legfeljebb 3 napig. Az előállított gáz mennyiségét (metán plusz szén-dioxid) a palackokban lévő nyomás (Pa) növekedése révén mérik. A gáztermelésnek a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi által előidézett százalékos gátlását a megfelelő vizsgálati és kontroll palackokban előállított gáz mennyiségből számítják. Az EC_{50} értékét és az egyéb hatáskonzentrációkat a vizsgált vegyi anyagok koncentrációjának – vagy ami általánosabb, a koncentráció logaritmusának – függvényében megnyilvánuló százalékos gátlási grafikonkból számítják.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A vizsgált vegyi anyagokat általában a könnyen hozzáférhető legtisztább formájukban kell használni, mivel egyes vegyi anyagok szennyeződései, például a klór-fenolok, sokkal mérgezőbbek lehetnek, mint maga a vizsgált vegyi anyag. Mindazonáltal meg kell fontolni, hogy a vizsgált vegyület abban a formájukban kell vizsgálni, amelyben azokat előállították/kereskedelmi forgalomba hozták. A formulázott készítmények használata nem szokásos, de a rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetében a formulázott anyagok használata megfelelő lehet. A vizsgált vegyi anyag tulajdonságaira vonatkozó információk közül rendelkezésre kell állnia a vízben és egyes szerves oldószerekben oldhatóságnak, a gőznyomásnak, az adszorpciós koefficiensnek, a hidrolízisnek és az anaerob körülmények közötti biológiai lebonthatóságnak.

A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

8. A vizsgálat vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagokra alkalmazható, beleértve az illékony vegyi anyagokat is. De különös figyelemmel kell eljárni a kevésbé oldódó (lásd a (12) irodalmat) és a nagy illékonyosságú anyagok esetében. Továbbá, más anaerob helyekről – például sár, telített talajok, üledékek – származó oltóanyagokat is lehet használni. Az anaerob bakteriális rendszereket, amelyek korábban már ki voltak téve mérgező vegyi anyagoknak, alkalmassá lehet tenni arra, hogy aktivitásukat xenobiotikus vegyi anyagok jelenlétében is fenntartsák. Az alkalmazkodott bakteriális rendszerekből származó oltóanyagok nagyobb toleranciát mutatnak a vizsgált vegyi anyagokkal szemben a nem adaptált rendszerekből nyert oltóanyagokhoz képest.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. Az eljárás ellenőrzése céljából egy referencia-vegyianyagot is vizsgálnak a normál vizsgálati futtatások részeként felállított megfelelő párhuzamos edények útján; a 3,5-diklór-fenolról kimutatták, hogy az anaerob gáztermelés, valamint az eleveniszap oxigén-felhasználása és egyéb biokémiai reakciók következetes inhibitora. Két másik vegyszerről kimutatták, hogy jobban gátolják a metántermelést, mint a 3,5-diklór-fenol, nevezetesen a metilén-bisz-tiocianátról és a pentaklór-fenolról, de a velük elért eredményeket nem validálták. A pentaklór nem ajánlott, mivel nem érhető el könnyen tiszta formában.

AZ EREDMÉNYEK REPRODUKÁLHATÓSÁGA

10. Egy nemzetközi körvizsgálatban (5) a 3,5-diklór-fenol és a 2-bróm-etán-szulfonsav esetében az EC_{50} -érték 10 részt vevő laboratórium közötti reprodukálhatósága csak közepes mértékű volt. (Az előbbi koncentrációtartomány 32–502 mg/l volt, az utóbbié pedig 220–2 190 mg/l.)

Laboratóriumok száma	mg/l			mg/g iszap		
	középérték	s.d.	cv (%)	középérték	s.d.	cv (%)
	3,5-diklór-fenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bróm-etán-szulfonsav					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC₅₀ adatok a körvizsgálatból – hígíthatlan iszap

11. A laboratóriumok közötti nagy variációs együtthatók jelentős mértékben az iszap mikroorganizmusok érzékenységében mutatkozó különbségeket tükrözik, amelyek akár a vizsgált vegyi anyaggal vagy más, kémiai rokon vegyülettel történt korábbi expozíció miatt, vagy annak hiányában alakulhattak ki. A pontosság, amellyel az iszap-koncentráción alapuló EC₅₀ értéket meghatározták, alig volt jobb, mint a »térfogati« érték (mg/l). A három laboratórium, amely megadta a 3,5-diklór-fenol EC₅₀-értékek a pontosságát, sokkal kisebb variációs együtthatót mutatott (22, 9 és 18 % az EC₅₀ mg/g esetében), mint a tíz laboratórium átlagai. A három laboratórium átlaga 3,1, 3,2 és 2,8 mg/g volt. A laboratóriumon belüli alacsonyabb, elfogadható variációs együtthatók és a laboratóriumok értékei közötti sokkal magasabb együtthatók – azaz 9–22 % és 92 % – összehasonlítása azt jelzi, hogy jelentős különbségek vannak az egyes iszapok tulajdonságai között.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

12. A szokásos laboratóriumi berendezéseket, illetve a következő eszközöket kell használni:

- a) Inkubátor – szikramentes és 35 °C ± 2 °C-on tartott;
- b) Nyomásálló üveg vizsgálati edények: megfelelő névleges méretű edények ⁽¹⁾, amelyek mindegyike olyan légmentesen záró bevont szeptummal van felszerelve, amely képes mintegy 2 bar vagy 2 × 10⁵ Pa nyomást megtartani (a bevonat pl. PTFE = politetrafluoretilénből készüljön). 125 ml névleges térfogatú üveg szérumpalackok ajánlottak, amelyek tényleges térfogata 160 ml és szérumszeptumokkal ⁽²⁾ és peremezett alumínium gyűrűkkel vannak lezárva; de a 0,1–1 liter közötti teljes térfogatú palackok is sikeresen alkalmazhatók;
- c) Precíziós nyomásmérő ⁽³⁾ és tűcsatlakozó
- A teljes gáztermelést (metán plusz szén-dioxid) olyan nyomásmérő segítségével mérik, amely úgy lett kialakítva, hogy lehetővé tegye a termelt gáz mérését és kiszellőztetését. A megfelelő eszközök egyik példája a fecskendőtükhöz csatlakoztatott kézi precíziós nyomásmérő; egy háromutas légmentesen záró szelep teszi lehetővé a túlnyomás kiengedését (1. függelék). A nyomásérzékelő cső és szelep belső térfogatát a lehető legalacsonyabban kell tartani, hogy a készülék térfogatának figyelmen kívül hagyása által okozott hibák elhanyagolhatóak legyenek;
- d) Szigetelt edények a rothasztó iszap szállításához;
- e) Háromutas szelepek;
- f) Szita, 1 mm²-es lyukbősséggel;
- g) Tároló, a rothasztó iszaphoz, üveg- vagy nagy sűrűségű polietilén palack, kapacitása körülbelül 5 liter, keverővel és a nitrogéngáz fejtéren történő áthaladásához szükséges eszközökkel ellátott (lásd a 13. pontot);
- h) membránszűrők (0,2 μm) a szubsztrátum sterilizálására;

⁽¹⁾ Az ajánlott méret 0,1–1 liter.

⁽²⁾ Légmentesen záró szilikonszeptumok használata ajánlott. Ajánlott továbbá megvizsgálni a sapkák, és különösen a butilkaucsukból készült szeptumokgázbiztonságát, mert számos, a kereskedelmi forgalomban kapható szeptum nem eléggé légmentes a metánnal szemben, és egyes szeptumok nem maradnak stabilan rögzülve, ha a vizsgálat körülményei között túlvel átszűrják.

— A légmentesen záró bevont szeptumok ajánlottak, és illékony vegyi anyagok esetében kötelező ezeket használni (egyes kereskedelemben kapható szeptumok viszonylag vékonyak, kevesebb mint 0,5 cm vastagságúak, és nem maradnak gáztömörek az injekciós túlvel történő átszúrás után);

— A butilkaucsukból készült szeptumok (körülbelül 1 cm) akkor ajánlottak, ha a vizsgálati anyag nem illékony (ezek általában légmentesen záróak maradnak az átszúrás után).

— A vizsgálat megkezdése előtt ajánlott a szeptumokat gondosan átvizsgálni abból a szempontból, hogy képesek-e légmentesen záróak maradni az átszúrás után.

⁽³⁾ A mérőt a gyártó utasításai szerint rendszeres időközönként használni és kalibrálni kell. Ha az előírt minőségű nyomásmérőt használják (pl. acél membrán tokkal), nincs szükség kalibrálásra a laboratóriumban. Engedéllyel rendelkező intézetnek kell kalibrálnia az ajánlott időközönként. A kalibrálás pontosságát a laboratóriumban 1 × 10⁵ Pa nyomáson mechanikus kijelzővel ellátott nyomásmérő ellenében végzett egypontos méréssel lehet ellenőrizni. Ha ezt a pontot pontosan mérik, a linearitás is változatlan lesz. Ha egyéb mérési eszközöket használnak (a gyártó által hitelesített kalibráció nélkül), rendszeres időközönként konverziót ajánlott végezni a teljes tartományban (2. függelék).

- i) mikrofecskendők, a nyomásérzékelőnek (lásd a 12. c) pontot) a palackok fejteréhez (lásd a 12. b) pontot) való légmentesen záró csatlakoztatásához; továbbá az oldhatatlan folyékony vizsgálati anyagok palackokba történő beadagolásához;
- j) kesztyűs manipulátor, opcionális, de ajánlott, enyhe pozitív nitrogénnyomással.

Reagensek

13. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket használjunk. Mindvégig nagy tisztaságú, 5 µl/l-nél kisebb oxigéntartalmú nitrogéngázt kell használni.

Víz

14. Ha bármely szakaszban hígítás szükséges, előzőleg légtelenített ionmentesített vizet használjon. Ezen a vízen analitikai vizsgálatokat nem szükséges végezni, de gondoskodjon az ionmentesítő berendezés rendszeres karbantartásáról. A törzsoldatok készítéséhez is ionmentesített vizet használjon. Mielőtt anaerob oltóanyagot adna bármely oldathoz vagy a vizsgálati anyag bármely hígításához, ellenőrizze, hogy azok oxigénmentesek-e. Ezt vagy nitrogéngáznak a hígító vízen (vagy a hígításokon) – az oltóanyag hozzáadása előtt – 1 órán keresztül történő átfúvásával, vagy alternatívaként a hígító víznek oxigénmentes atmoszférában forráspontig történő melegítésével és szobahőmérsékletre való hűtésével lehet elvégezni.

Rothasztott iszap

15. Gyűjtson aktívan emésztő iszapot egy szennyvíztisztító telep rothasztójából, vagy pedig egy laboratóriumi fermentorból, amely túlnyomórészt háztartási szennyvízből származó iszapot kezel. A laboratóriumi fermentorból származó iszapra vonatkozó gyakorlati tájékoztatást más forrásokban találhat (11). Ha adaptált oltóanyagot szándékoznak használni, az ipari szennyvíztisztító üzemből származó rothasztó iszapot meg lehet fontolni. Tágulásra képes nagy sűrűségű polietilénből vagy hasonló anyagból készült széles nyakú palackokat használjon az iszapgyűjtéshez. Annyi iszapot töltsön a mintavevő palackokba, hogy a palackokat a tetejétől körülbelül 1 cm-ig megtöltse, zárja le őket szorosan, lehetőleg egy biztonsági szeleppel (12. e) pont), majd helyezze szigetelt tartályokba (12. d) pont) a hőmérsékleti sokk minimalizálása érdekében, amíg átkerülnek a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékletű inkubátorba. A palackok kinyitásakor vigyázzon, hogy kiengedje a felesleges gáznyomást, akár óvatosan meglazítva a kupakot, vagy háromutas nyomáscsökkentő szelep segítségével (12. e) pont). Előnyös az iszapot a gyűjtéstől számított néhány órán belül felhasználni, egyébként $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékleten nitrogénnel töltött fejtér alatt tárolja legfeljebb 3 napig, amikor kismértékű aktivitásvesztés általában előfordul.

Figyelem – a rothasztó iszap gyúlékony gázokat képez, amelyek tűz- és robbanásveszélyt okoznak; potenciálisan kórokozó mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért megfelelő óvintézkedéseket kell tenni az iszappal való munka során. Biztonsági okokból ne használjon üvegedényeket az iszap gyűjtésére.

Oltóanyag

16. Közvetlenül a felhasználás előtt keverje össze az iszapot enyhe keveréssel, majd öntse át egy 1 mm² lyukbőségű szitán (12. f) pont) egy megfelelő üvegbe (12. g) pont), amelynek fejterén nitrogént kell keresztülvezetni. Tegye félre egy mintát az összes száraz szilárd anyag koncentrációjának mérése céljából (lásd pl. ISO 11 923 (13) vagy azzal egyenértékű EU-szabvány). Az iszapot általában hígítás nélkül használja. A szilárd anyagok koncentrációja általában 2 % és 4 % között van (w/v). Ellenőrizze az iszap pH-értékét, és ha szükséges, állítsa be $7 \pm 0,5$ értékre.

Vizsgálati szubsztrátum

17. Oldjon fel 10 g táplevest (pl. Oxoid), 10 g élesztőkivonatot és 10 g D-glükózt ionmentesített vízben, és hígítsa 100 ml-re. Sterilizálja egy 0,2 µm-es membránszűrőn át történő szűréssel (12. h) pont), és azonnal használja fel vagy 4 °C-on legfeljebb 1 napig tárolja.

Vizsgált vegyi anyag

18. Készítsen külön törzsoldatot minden vízben oldódó vizsgált vegyi anyagból, amely például 10 g/l vegyi anyagot tartalmazzon oxigénmentes hígító vízben (14). Használja ezeknek az oldatoknak megfelelő mennyiségét a koncentráció gradienseket tartalmazó reakciókeverékek elkészítéséhez. Alternatív megoldásként készítsen egy hígítási sort minden egyes törzsoldatból úgy, hogy a vizsgálati palackokhoz adott térfogat azonos legyen minden előírt végső koncentráció esetében. A törzsoldatok pH-értékét $7 \pm 0,2$ értékre kell beállítani, ha szükséges.

19. A vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetében forduljon az ISO 10 634 szabványhoz (12) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványhoz. Ha szerves oldószer használata szükséges, kerülje el az olyan oldószereket, mint a kloroform és a szén-tetraklorid, amelyekről ismert, hogy erősen gátolják a metántermelést. Készítsen megfelelő koncentrációjú oldatot a vízben oldhatatlan vegyi anyagból egy alkalmas illékony oldószerben, például acetonban vagy dietil-éterben. Adja hozzá a kívánt térfogatú oldószer oldatot az üres vizsgálati palackokhoz (12. b) pont), majd az iszap hozzáadása előtt párologtassa el az oldószert. Az egyéb kezelések esetében használja az ISO 10 634 szabványt (12) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványt, de tartsa szem előtt, hogy az emulziók előállításához használt felületaktív anyagok gátolhatják az anaerob gáztermelést. Ha úgy véli, hogy a szerves oldószerek és emulgeálószeres jelenléte műtermékek kialakulását okozza, a vizsgált vegyi anyagot porként vagy folyadékként közvetlenül a vizsgálati keverékhez is hozzá lehet adni. Az illékony vegyi anyagokat és a vízben nem oldódó folyadék halmazállapotú vizsgált vegyi anyagokat a beoltott szérumpalackokba is be lehet injektálni mikrofecskendő használatával (12. i) pont).
20. Adja a vizsgált vegyi anyagokat a palackokhoz úgy, hogy a koncentrációk egy mértani sorozatot alkossanak, például 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l és 15,6 mg/l. Ha a toxicitási tartomány a hasonló vegyi anyagok alapján nem ismert, először végezzen előzetes dózisbehatóroló vizsgálatot 1 000 mg/l, 100 mg/l és 10 mg/l koncentrációval, hogy behatórolja a megfelelő tartományt.

Referencia-vegyianyag

21. Készítsen vizes oldatot 3,5-diklór-fenolból (10 g/l) minimális mennyiségű 5 mol/l-es nátrium-hidroxid oldatnak a szilárd anyaghoz rázás közben való fokozatos hozzáadásával, amíg az feloldódik. Ezután adjon hozzá oxigénmentes hígítóvizet (14), hogy elérje az előírt térfogatot; az ultrahangos kezelés elősegítheti az oldódást. Egyéb referencia-vegyianyagokat is lehet alkalmazni, ha az EC₅₀ átlagos tartományát különböző (különböző forrásból vagy különböző gyűjtési időpontokból származó) oltóanyagokkal végzett legalább három vizsgálatban megállapították.

INTERFERENCIA/HIBÁK

22. Az iszap néhány összetevője feltehetően reagál a potenciális gátlóanyagokkal, elérhetetlenné téve azokat a mikroorganizmusok számára, ami alacsonyabb gátlást vagy a gátlás hiányát eredményezi. Továbbá, ha a iszap már tartalmaz gátló hatású vegyi anyagot, hibás eredmények adódhatnak a vegyi anyag vizsgálata során. Ezeket a lehetőségeken kívül van még számos egyéb azonosított tényező, amely hamis eredményekhez vezethet. Ezeket a 3. függelék sorolja fel, a hibák megszüntetésére vagy legalább csökkentésére szolgáló módszerekkel együtt.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

23. A szükséges ismétlések száma a gátlási indexekhez előírt pontosság fokától függ. Ha a palacktömítések eléggé légmentesen záróak a vizsgálat időtartama alatt, csak egy tételt hozzon létre (legalább hármas ismétlésben) a vizsgálati palackokból minden előírt koncentráción. Hasonlóképpen hozzon létre egy palacktételt a referencia-vegyianyaggal, valamint egy kontroll tételt. Ha azonban a palackok tömítései csak egy vagy néhány átszűrásig megbízhatóak, hozzon létre egy tételt (pl. hármas ismétlésben) a vizsgálati palackokból minden intervallumhoz (t) – amelyek tekintetében eredményt szeretne kapni – a vizsgálandó vegyi anyag valamennyi koncentrációján. Hasonlóképpen hozzon létre »t« palacktégeket a referencia-vegyianyagot tartalmazó, illetve a kontrollcsoportban.
24. Ajánlott a kesztyűs manipulátor (12. j) pont) használata. Legalább 30 perccel a vizsgálat megkezdése előtt indítsa el a gázáramlást a kesztyűs manipulátoron keresztül, amely minden szükséges berendezést tartalmaz. Gondoskodjon róla, hogy az iszap hőmérséklete a 35 °C ± 2 °C tartományon belül legyen a palackok kezelése és lezárása alatt.

Előzetes vizsgálat

25. Ha az iszap aktivitása nem ismert, ajánlott előzetes vizsgálatot végezni. Hozzon létre kontrollokat, például 10 g/l, 20 g/l és 40 g/l szilárd anyag koncentrációval plusz szubsztrátummal, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Továbbá, különböző térfogatú reakciókeverékeket használjon abból a célból, hogy a fejtér és a folyadék térfogatának három vagy négy különböző arányát alakítsa ki. A különböző időtartamok alatt előállított gázmennyiségekből megállapíthatók azok a legmegfelelőbb feltételek, amelyek jelentős mennyiségű gázt eredményeznek és lehetővé teszik a napi kétszeri mérést, valamint lehetővé teszik a nyomás naponta történő felengedését optimális érzékenység mellett ⁽¹⁾ és robbanásveszély nélkül.

⁽¹⁾ Ez arra a kísérleti összeállításra és azokra a kísérleti feltételekre vonatkozik, amelyek alapján a termelt gáz térfogatát – az üres kontrollokból és a 70–80 % gátlást mutató edényekből – elfogadható hibahatárral meg lehet becsülni.

A vizsgált vegyi anyagok hozzáadása

26. A vízben oldódó vizsgált anyagokat üres vizsgálati palackokhoz adja (12. b) pont) vizes oldat formájában (18). Használjon legalább három palackot minden koncentrációhoz (20. pont). Oldhatatlan és gyengén oldódó vizsgált vegyi anyag esetében fecskendezze mikrofecskendővel ezek szerves oldószerekkel készített oldatait üres palackokba, hogy a vizsgált vegyi anyag mind az öt koncentrációjához ismétléseket készíthessen. Párolgassa el az oldószert nitrogéngáznak a vizsgált palackokban található oldatok felszíne felett történő átfűvésével. Alternatív megoldásként adjon hozzá oldhatatlan szilárd vegyi anyagokat a szilárd anyag kimért mennyiségében közvetlenül a vizsgálati palackokhoz.
27. Ha az oldhatatlan vagy vízben rosszul oldódó folyadék állapotú vizsgált vegyi anyagokat nem oldószert alkalmazásával adja hozzá, közvetlenül adja hozzá őket a vizsgálati palackokhoz mikrofecskendő használatával az oltóanyag és a vizsgálati szubsztrátum hozzáadása után (lásd a 30. pontot). Az illékony vizsgált vegyi anyagokat is hozzá lehet adni ilyen módon.

Az oltóanyag és a szubsztrátum hozzáadása

28. Keverjen meg megfelelő mennyiségű szűrt rothasztó iszapot (lásd a 16. pontot) egy 5 literes üvegben (12. g) pont), miközben nitrogéngáz halad át a fejtéren. Öblítse át a vizsgált vegyületek vizes oldatait vagy elpárolgott oldószeres oldatait tartalmazó palackokat nitrogéngázzal körülbelül két percig, hogy eltávolítsa a levegőt. Ossza szét a jól kevert iszap alikvotjait (pl. 100 ml) a vizsgálati palackokba nagy hegyű pipettával vagy mérőhengerrel. Lényeges, hogy a pipettát egy lépésben töltsse fel a pontos előírt iszaptérfogatra, mivel az iszap szilárd anyagai könnyen leülepsznek. Ha többet szívott fel, ürítse ki a pipettát, és kezdje újra.
29. Ezután adjon hozzá elegendő szubsztrátum oldatot (17. pont), hogy a tápveles, az élesztőkivonat és a D-glükóz egyaránt 2 g/l koncentrációt adjon a keverékben, miközben nitrogén továbbra is átáramlik a palackokon. A következőkben egy példát mutatunk be a vizsgálati tételekre.

A vizsgált anyag végleges tömegkoncentrációja vizsgálati palackokban (mg/l)	A vizsgált vegyi anyag térfogata (ml)		Reagensok és közegek (ml)		
	Törzsoldat a) 10 g/l 18. pont	Törzsoldat b) 1 g/l 18. pont	Hígítóvíz 14. pont	Oltóanyag 16. pont	Szubsztrátum 17. pont
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

Az üveg összes térfogata = 160 ml. A folyadék térfogata = 103 ml

Gáztérfogat = 57 ml, illetve az összes térfogat 35,6 %-a.

30. Hasonlóan öblítsen ki nitrogéngázzal megfelelő számú üres vizsgálati palackot az illékony és nem oldódó folyadék állapotú vizsgált vegyi anyagok számára (lásd a 27. pontot).

Kontrollok és referencia-vegyianyagok

31. Hozzon létre legalább hármas ismétléseket csak iszapot és szubsztrátumot tartalmazó palackokból, amelyek kontrollként funkcionálnak. Hozzon létre további ismétléseket, amelyek iszapot, szubsztrátumot és a referencia-vegyianyag, a 3,5-diklór-fenol (21. pont) elegendő törzsoldatát tartalmazzák, hogy 150 mg/l végső koncentrációt eredményezzen. Ennek a koncentrációnak 50 %-kal kell gátolnia a gáztermelést. Alternatív megoldásként hozza létre a referencia-vegyianyag koncentrációsorozatát. Ezen kívül hozzon létre négy extra palackot a pH-mérés céljára, amelyek iszapot, oxigénmentesített vizet és szubsztrátumot tartalmaznak. Adjon hozzá vizsgált vegyi anyagot két palackhoz a legmagasabb vizsgált koncentrációban, és adjon oxigénmentesített vizet a fennmaradó két palackhoz.

32. Gondoskodjon róla, hogy minden palack (vizsgált és referencia-vegyianyagok és kontrollok) azonos térfogatú (V_R) folyadékot tartalmazzon; szükség esetén adjon hozzá oxigénmentesített ionmentesített vizet (14) a térfogat kiegészítése céljából. A fejtér a palack térfogatának 10–40 %-a legyen; a tényleges értéket az előzetes vizsgálatból kapott adatok alapján kell kiválasztani. Miután minden alkotórészt hozzáadott a palackokhoz, húzza ki a gázt szolgáltató tűt, majd gumidugóval és alumínium kupakkal zárja le a palackokat (12. b) pont), a dugót egy csepp ionmentesített vízzel megnedvesítve, ami segíti a behelyezést. Keverjük össze a palackok tartalmát rázással.

A palackok inkubálása

33. Helyezze át a palackokat a szabályozott hőmérsékletű, lehetőleg rázókészülékkel felszerelt inkubátorba, és tartsa fenn a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékletet. A palackokat sötétben kell inkubálni. Mintegy 1 óra elteltével, egyenlítse ki a palackokban lévő nyomást az atmoszferikus nyomással a nyomásmérőhöz csatlakoztatott fecskendőtütnel (12. c) pont) az egyes palackok tömítésén keresztül történő beszúrásával, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, majd végül zárja el a szelepet. A tűt mintegy 45° -os szögben kell beszúrni, hogy megakadályozható legyen a gáz elszivárgása a palackokból. Ha a palackokat rázóberendezés nélkül inkubálják, a teljes inkubálási időszak alatt naponta kétszer kézzel meg kell rázni őket a rendszer egyensúlyba hozása érdekében. Inkubálja a palackokat és fordítsa meg őket, hogy megelőzze a gáz elvesztését a szeptumon keresztül. A megfordítás azonban nem megfelelő azokban az esetekben, amelyekben az oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok a palack aljára tapadhatnak.

A nyomás mérése

34. Ha a palackok elérték a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékletet, mérje meg és jegyezze fel az erre a célra létrehozott négy palack közül kettő tartalmának pH értékét, és öntse ki a tartalmat; folytassa a megmaradó palackok sötétben történő inkubálását. A következő 48–72 órában naponta két alkalommal mérje meg és jegyezze fel a palackokban uralkodó nyomást a nyomásmérő tűjének az egyes palackok tömítésén keresztül történő beszúrásával, a tűt a mérések között megszáritva. A palackok valamennyi részét tartsa inkubációs hőmérsékleten a mérés során, amelyet a lehető leggyorsabban kell elvégezni. Várja meg, amíg a leolvasott nyomásérték stabilizálódik, majd jegyezze fel. Ezután nyissa ki a szelepet a szellőzéshez, és akkor zárja be, amikor a nyomás nullát mutat. A vizsgálatot még általában a nyomás első kiegyenlítésétől (»0. időpont«) számított 48 órán át folytatni kell. A leolvasások és a szellőztetések számát illékony vegyi anyagok esetében egyre (az inkubáció végén) vagy kettőre kell korlátozni a vizsgált anyag elvesztésének minimalizálása érdekében (10).
35. Ha a leolvasott nyomás negatív, ne nyissa ki a szelepet. Néha nedvesség gyűlik össze a fecskendőtütnel és a csövekben, amit enyhén negatív nyomásérték jelez. Ebben az esetben húzza ki a tűt, rázza meg a csövet, szárítsa meg egy kendővel, és helyezzen fel egy új tűt.

A pH mérése

36. Mérje meg és jegyezze fel az egyes palackok tartalmának pH értékét az utolsó nyomásmérés után.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények megadása

37. Az egyes ismétlésekhez tartozó palackokra számítsa ki az egyes időpontokban rögzített nyomásértékek összegét és átlagát, és határozza meg az egyes időpontokban az egyes ismétlésekhez tartozó palackokra az átlagos kumulatív bruttó gáznyomást. Ábrázolja a átlagos kumulatív gáztermelés (P_a) görbéit az idő függvényében a kontroll, a vizsgálati és a referencia palackok esetében. Válasszon ki egy időpontot a görbe lineáris részén, általában a 48 órát, és minden koncentrációnál számítsa ki a százalékos gátlást (I) az [1] egyenlet alapján:

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

ahol

I = a százalékos gátlás % -ban;

P_t = a vizsgált anyaggal előállított gáz nyomása a kijelölt időpontban, Pascal (Pa);

P_c = a kontroll által termelt gáz nyomása ugyanabban az időpontban, Pascal (Pa).

Tanácsos mindkét görbét felrajzolni, azaz I-t a koncentrációval szemben és a koncentráció logaritmusával szemben is ábrázolni, és a linearitáshoz közelebb álló görbét választani. Az EC_{50} (mg/l) értékét vizuálisan vagy a linearitáshoz közelebbi görbe regressziós elemzése alapján becsülje meg. Az összehasonlítás céljából hasznosabb lehet, ha a vegyi anyag koncentrációját mg vegyi anyag/g összes száraz szilárd anyag formában fejezi ki. E koncentráció kiszámításához ossza el a térfogati koncentrációt (mg/l) az iszap száraz szilárd anyagainak térfogati koncentrációjával (g/l) (16).

38. Számítsa ki az alkalmazott referencia-vegyianyag egyetlen koncentrációja által elért százalékos gátlást vagy az EC_{50} értékét, ha elegendő számú koncentrációt vizsgáltak.
39. A nyomásmérő kalibrációs görbéje (2. függelék) alapján konvertálja át a kontroll által termelt gáz átlagos nyomását – P_c (Pa) – térfogatra, és ebből számítsa ki a gázhozamot a 100 ml hígítatlan iszaptól 2–4 % (20–40 g/l) szilárdanyag koncentráció mellett 48 óra alatt előállított térfogatban kifejezve.

Érvényességi feltételek

40. Az ISO laboratóriumok közötti vizsgálat eredményei (5) azt mutatták, hogy a referencia-vegyianyag (3,5-diklórfenol) a gáztermelés 50 %-os gátlását okozta a 32 mg/l-től 510 mg/l-ig terjedő koncentrációsorozatban, amelynek átlaga 153 mg/l volt (10. pont). Ez a tartomány olyan széles, hogy a gátlás szigorú határértékeit nem lehet egyértelműen érvényességi kritériumként megszabni; ez akkor lesz lehetséges, amikor a fejlemények megmutatják, hogyan kell konzisztensebb oltóanyagot előállítani. A kontroll palackokban a 48 óra alatt termelt gáz térfogata 21 ml/g iszap szárazanyag és 149 ml/g között volt (átlagosan 72 ml/g). Nem volt egyértelmű összefüggés a termelt gáz mennyisége és a megfelelő EC_{50} érték között. A végső pH-érték 6,1 és 7,5 között változott.
41. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha 20 %-ot meghaladó gátlást kapnak a referencia kontrollban, amely 150 mg/l 3,5-diklórfenolt tartalmaz, több mint 50 ml gáz per gramm száraz anyag keletkezik a vak kontrollban, és a pH-érték a vizsgálat végén a 6,2–7,5 tartományon belül van.

Mérési jegyzőkönyv

42. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

- közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok;
- a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége).

Vizsgálati körülmények

- a folyadéktartalmak és a fejterek térfogata a vizsgálati edényekben;
- a vizsgálati edények és a gázmérés leírása (pl. nyomásmérő típusa);
- a vizsgált vegyi anyag és a referencia-vegyianyag beadása a vizsgálati rendszerbe, az alkalmazott vizsgálati koncentrációk és a felhasznált oldószerek;
- az alkalmazott oltóanyag részletei: a szennyvíztisztító telep neve, a vizsgálat során kezelt szennyvíz forrásának leírása (pl. működési hőmérséklet, az iszap retenciós ideje, túlnyomórészt háztartási szennyvíz vagy ipari hulladék, stb.), a szilárd anyagok koncentrációja, az anaerob rothasztó gáztermelési aktivitása, korábbi kitétség vagy esetleges előzetes adaptáció mérgező vegyi anyagokhoz, illetve a sár, üledék gyűjtésének helye stb.;
- inkubációs hőmérséklet és idő;
- az ismétlések száma.

Eredmények

- pH-értékek a vizsgálat végén;
- adott esetben a vizsgálati, üres és referencia-vegyianyag kontroll edényekből gyűjtött összes mért adat (pl. a nyomás Pa-ban vagy millibarban), táblázatos formában;
- a százalékos gátlás a vizsgálati és referencia palackokban, és a gátlás-koncentráció görbék;
- az EC₅₀-értékek kiszámítása, mg/l és mg/g mértékegységben kifejezve;
- az 1 g iszapra jutó gáztermelés 48 óra alatt;
- a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka,
- az eredmények megvitatása, beleértve az e vizsgálati módszertől való esetleges eltéréseket, a vizsgálati eredményekben a várható eredményektől az interferenciák és hibák miatt kialakuló esetleges eltérések megvitatása;
- ki kell térni arra is, hogy a vizsgálat célja a korábbi expozíciónak kitett vagy nem kitett mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás mérése volt-e.

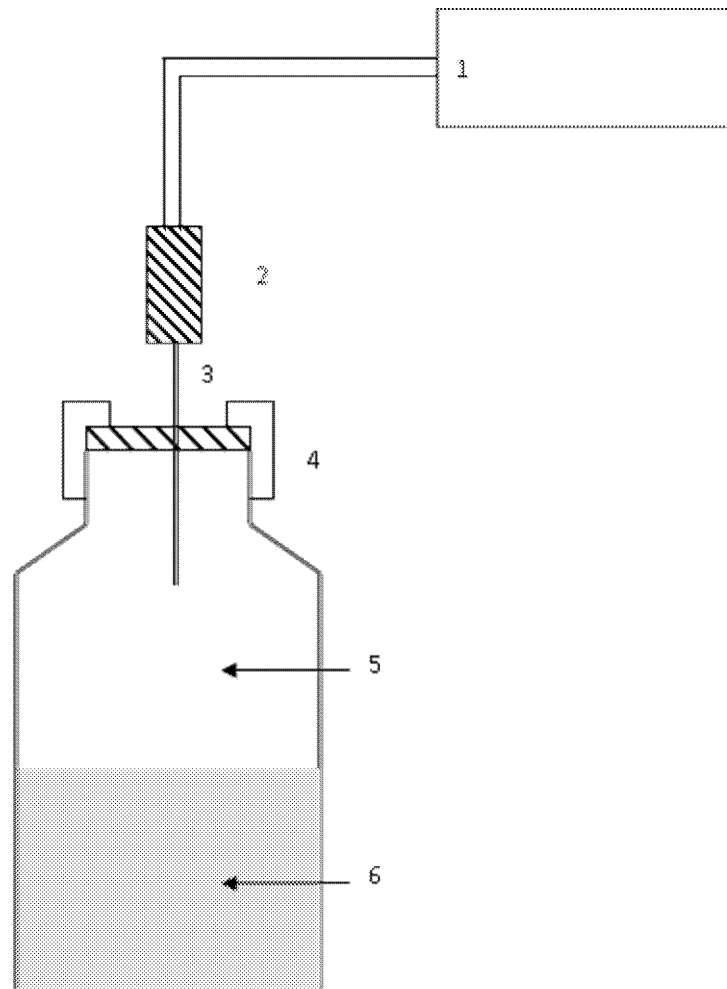
IRODALOM

- (1) E melléklet C.11. fejezete: Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata.
- (2) E melléklet C.43. fejezete: Szerves vegyületek anaerob biológiai lebonthatósága rothasztott iszapban: a gáztermelés mérésén alapuló módszer.
- (3) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (2003) ISO 13 641-1 Vízhőesség. Az anaerob baktériumok gáztermelésének gátlása – 1. rész: Általános vizsgálat.
- (4) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (2003) ISO 13 641-2 Vízhőesség. Az anaerob baktériumok gáztermelésének gátlása – 2. rész: Az alacsony élőtömeg-koncentrációk vizsgálata.
- (5) ISO (2000) Az ISO 13 641-1 és az ISO 13 641-2 körvizsgálata. Az anaerob baktériumaktivitás gátlásának meghatározása. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 7, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
 - (12) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1995) ISO 10 634 Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítéséhez és kezeléséhez a vizes közegben történő biológiai lebomlásuk későbbi értékelése céljából.
 - (13) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1997) ISO 11 923 Vízminőség. A szuszpendált szilárd anyagok meghatározása üvegszálás szűrőn keresztül történő szűréssel.
-

1. függelék

Példa a biogáztermelést a gáznyomás segítségével mérő készülékre



Jelmagyarázat:

- 1 – Nyomásmérő
- 2 – Háromutas légmentesen záró szelep
- 3 – Injekciós tű
- 4 – Légmentesen záró tömítéslezárás (peremezett sapka és szeptum)
- 5 – Fejtér
- 6 – Rothasztott iszap oltóanyag

Vizsgálati edények $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ környezetben

*2. függelék***A nyomásmérés átszámítása**

A nyomásmérőről leolvasott értékeket egy standard görbe segítségével összefüggésbe lehet hozni gázmennyiségekkel, és ebből ki lehet számítani az egy gramm száraz iszap által 48 óra alatt termelt gáz térfogatát. Ezt az aktivitási indexet a vizsgálati eredmények érvényességének vizsgálata során az egyik kritériumként használják. A kalibrációs görbét úgy állítják elő, hogy ismert mennyiségű gázt injektálnak $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékleten a reakcióeleggyel megegyező térfogatú vizet tartalmazó szérumpalackokba, V_R ;

- Adagoljon $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékleten tartott V_R ml alikvot vizet öt szérumpalackba. Zárja le a palackokat és helyezze $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékletű vízfürdőbe 1 óra időtartamra, hogy egyensúlyba kerüljenek;
- Kapcsolja be a nyomásmérőt, hagyja stabilizálódni, és állítsa nullára;
- Vezesse át a fecskendőtüőt az egyik palack tömítésén, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, és zárja el a szelepet;
- Ezt az eljárást meg kell ismételni a többi palackkal is;
- Fecskendezzen 1 ml $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékletű levegőt minden palackba. Szűrje át a tüőt (a mérőn) az egyik palack tömítésén, és várja meg, amíg a nyomásérték stabilizálódik. Jegyezze fel a nyomást, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomás nullát nem mutat, majd zárja el a szelepet;
- Ezt az eljárást meg kell ismételni a többi palackkal is;
- Ismételje meg a teljes eljárást 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, és 50 ml levegő használatával;
- Vegye fel a beadott gázmennyiség (ml) függvényében ábrázolt nyomás (Pa) konverziós görbét. Az eszköz válasza lineáris a 0 Pa és 70 000 Pa közötti tartományban és 0–50 ml gáztermelés esetén.

3. függelék

A hamis eredményekhez vezető tényezők meghatározásaa) *A palackkupakok minősége*

A szérumpalackokhoz különböző típusú szeptumok vannak kereskedelmi forgalomban; ezek közül vizsgálati körülmények között több – beleértve a butilgumit is – elveszíti a tömörségét tűvel való átszúrás esetén. Néha a nyomás nagyon lassan esik a szeptum injekciós tűvel való átszúrása után. A szivárgás megelőzése érdekében légmentesen záró szeptumok használata ajánlott (12. b) pont).

b) *Nedvesség az injekciós tűben*

Néha nedvesség gyűlik össze az injekciós tűben és a csövekben, amit enyhén negatív nyomásérték jelez. A helyzet megoldása érdekében húzza ki a tűt, rázza meg a csövet, törölje szárazra egy kendővel, és helyezzen fel egy új tűt (12. c) és 35. pont).

c) *Oxigénszennyeződés*

Az anaerob módszerek ki vannak téve az oxigénszennyeződés okozta hibáknak, ami csökkentheti a gáztermelést. Ebben az eljárásban ezt a lehetőséget szigorúan anaerob technikák használatával kell minimalizálni, ideértve a kesztyűs manipulátort.

d) *Nagyméretű szubsztrátumok az iszapban*

Az anaerob gáztermelést és az iszap érzékenységét befolyásolják a szubsztrátumok, amelyek az oltóanyaggal kerülnek át a vizsgálati palackokba. A háztartási anaerob rothasztókból származó rothasztott iszapok még gyakran tartalmaznak felismerhető anyagokat, például hajat és cellulóztartalmú növényi maradványokat, amelyek megnehezíthetik a reprezentatív mintavételt. Az iszap szitálásával a nagyméretű oldhatatlan anyagokat el lehet távolítani, ami valószínűbbé teszi a reprezentatív mintavételt (16).

e) *Illékony vizsgált vegyi anyagok*

Az illékony vizsgált vegyi anyagok meg fognak jelenni a vizsgálati palackok fejterében. Ez a vizsgált anyag egy részének a rendszerből való elvesztését eredményezheti a nyomásmérés utáni szellőztetés alatt, így tévesen magas EC₅₀-értékek adódhatnak. A fejtértérfogat és a folyadéktérfogat arányának megfelelő megválasztásával, valamint a nyomásmérés utáni szellőztetés elhagyásával a hiba csökkenthető (10).

f) *Nem lineáris gáztermelés*

Ha az inkubációs idő függvényében ábrázolt átlagos kumulatív gáztermelés közelítőleg nem lineáris a 48 órás időtartam alatt, a vizsgálat pontossága csökkenhet. Ennek kezelése érdekében tanácsos lehet másik forrásból származó rothasztott iszapot használni és/vagy a vizsgálati szubsztrátum (tápleves, élesztőkivonat és glükóz) megnövelt koncentrációját hozzáadni (29).

4. függelék

Alkalmazás alacsony élőanyag-koncentrációjú környezeti minták esetén – anaerob sarak, üledékek, stb.

BEVEZETÉS

- A.1. A természetben előforduló anaerob sarak, üledékek, talajok, stb. fajlagos mikrobiális aktivitása (az egy gramm száraz szilárd anyag által termelt gáz térfogata) általában sokkal alacsonyabb, mint a szennyvízből származó anaerob iszapoké. Emiatt amikor vegyi anyagoknak az ilyen kevésbé aktív mintákra kifejtett gátló hatását kell mérni, bizonyos kísérleti feltételeket módosítani kell. Az ilyen kevésbé aktív minták esetén két általános eljárás lehetséges:
- a) Végezzen módosított előzetes vizsgálatot (25. pont) a hígítatlan sár, talaj, stb. mintával $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ hőmérsékleten vagy a mintagyűjtés helyén tapasztalt hőmérsékleten a pontosabb modellezés érdekében (mint az ISO 13 641 szabvány 1. részében);
- b) Vagy végezze el a vizsgálatot hígított (1:100) rothasztó iszappal a környezeti mintától várható alacsony aktivitás modellezése érdekében, de a hőmérsékletet $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ értéken tartva (mint az ISO 13 641 szabvány 2. részében).
- A.2. Az a) opciót az itt leírt módszer szerint lehet megvalósítani (egyenértékű az ISO 13 641 szabvány 1. részével), de előzetes vizsgálatot kell végezni (25. pont) az optimális körülmények megállapítására, kivéve, ha ezek a korábbi vizsgálatokból már ismertek. A sár- vagy üledékmintát alaposan össze kell keverni, pl. turmixgépben, és ha szükséges, kis mennyiségű levegőtlenített hígítóvízzel (14) fel kell hígítani úgy, hogy elegendő mértékben mobil legyen ahhoz, hogy át lehessen vinni egy durva végű pipettával vagy mérőhenggerrel. Ha úgy vélik, hogy egyes tápanyagok hiányozhatnak, a sármintát le lehet centrifugálni (anaerob körülmények között) és újra lehet szuszpendálni élesztő kivonatot tartalmazó ásványi közegben (A.11).
- A.3. b) opció. Ez a módszer nagyjából utánozza a környezeti minták alacsony aktivitását, de hiányzik belőle ezeknek a mintáknak a magas szuszpendált szilárd anyag koncentrációja. Ezeknek a szilárd anyagoknak a gátlásban betöltött szerepe nem ismert, de lehetséges, hogy a vizsgált vegyi anyagok és a sár összetevői közötti reakció, illetve a vizsgált vegyi anyagoknak a szilárd anyagokhoz történő adszorpciója a vizsgált vegyi anyag toxicitásának csökkenését eredményezheti.
- A.4. A hőmérséklet szintén fontos tényező: a pontos modellezés érdekében a vizsgálatokat a mintavétel helyszínén uralkodó hőmérsékleten kell elvégezni, hiszen a metántermelő baktériumok különböző csoportjairól ismert, hogy különböző hőmérsékleti tartományokban működnek, azaz vannak termofilek ($\sim 30\text{--}35\text{ °C}$), mezofilek ($20\text{--}25\text{ °C}$) és pszichofilek ($<20\text{ °C}$), amelyek különböző gátlási mintákat mutathatnak.
- A.5. Időtartam. A hígítatlan iszapot használó általános vizsgálatban (1. rész) a 2–4 nap alatti gáztermelés mindig elegendő volt, míg a 2. részben a századrészére hígított iszap elégtelen gázt termelt – ha termelt egyáltalán – ez alatt az időszak alatt a körvizsgálatban. Madsen és munkatársai (1996) ez utóbbi vizsgálat leírásában legalább 7 napot tartanak kívánatosnak.

Vizsgálat alacsony élőanyag-koncentrációval (b. opció)

Az alábbi változásokat és módosításokat kell végrehajtani, kiegészítve vagy helyettesítve a fő szöveg néhány meglévő pontját és alpontját.

- A.6. A 6. pont a következőkkel egészül ki: A vizsgálat elve;
- »Ez a technika 1:100 arányban hígított anaerob iszappal használható, részben azért, hogy modellezze a sarak és üledékek alacsony aktivitását. Az inkubációs hőmérséklet lehet 35 °C , vagy az a hőmérséklet, amely a mintavétel helyszínén uralkodik. Mivel a bakteriális aktivitás sokkal kisebb mértékű, mint a hígítatlan iszapban, az inkubációs időt legalább 7 napra kell növelni.«
- A.7. A 12. a) pont a következőkkel egészül ki:
- »az inkubátornak alkalmasnak kell lennie arra, hogy 15 °C alsó hőmérsékletig működjön.«

A.8. A 13. pont után a szöveg egy extra reagenssel egészül ki:

»Foszforsav (H_3PO_4), 85 tömeg % vízben.«

A.9. A 16. pont vége a következőkkel egészül ki:

»Használjon $0,20 \pm 0,05$ g/l összes száraz szilárd anyag végső koncentrációt a vizsgálatban.«

A.10. 17. pont Vizsgálati szubsztrátum

Ezt szubsztrátumot nem lehet használni, a helyébe egy élesztőkivonat lép (lásd a 17. pontot; A.11, A.12, A.13).

A.11. Egy nyomelemeket is tartalmazó ásványi közegre van szükség az anaerob iszap hígításához, és az egyszerűség kedvéért a szerves szubsztrátumot – az élesztőkivonatot – is hozzáadják ehhez a közeghez.

A (17) pont után a szöveg a következőkkel egészül ki:

»a) Vizsgálati ásványi közeg, élesztőkivonattal.

Ezt 10-szeres töménységű vizsgálati közegből (17. b) pont; A.12) állítják elő egy nyomelemoldattal (17. c) pont; A.13). Használjon frissen beszerzett nátrium-szulfid nonahidrátot (17. b) pont; A.12), vagy mossa és szárítsa meg használat előtt, hogy elegendő redukációs kapacitása legyen. Ha a vizsgálatot kesztyűs manipulátor (12. j) pont) nélkül végzik, a nátrium-szulfid koncentrációját a törzsoldatban 2 g/l értékre kell növelni (1 g/l-ről). A nátrium-szulfidot egy megfelelő törzsoldatból is hozzá lehet adni a zárt vizsgálati palackok szeptumán keresztül (ez az eljárás csökkenti az oxidáció kockázatát), hogy 0,2 g/l végső koncentrációt kapjunk. Alternatív megoldásként titán(III)-citrát (17. b) pont) is alkalmazható. Adja be a zárt vizsgálati palackok szeptumán keresztül 0,8–1,0 mmol/l végső koncentrációban. A titán(III)-citrát egy rendkívül hatékony és alacsony toxicitású redukáló szer, amely a következőképpen állítható elő: Oldjon fel 2,94 g trinátrium-citrát-dihidrátot 50 ml oxigénmentes hígítóvízben (14. pont) (ami 200 mmol/l oldatot eredményez), és adjon hozzá 5 ml titán(III)-klorid oldatot (15 g/100 ml hígítóvíz). Semlegesítse pH $7 \pm 0,5$ értékre nátrium-karbonáttal, és adja hozzá egy megfelelő szérumpalackhoz áramló nitrogéngáz alatt. A titán(III)-citrát koncentrációja ebben törzsoldatban 164 mmol/l. A vizsgálati közeget azonnal használja fel vagy 4 °C-on tárolja legfeljebb 1 napig.

A.12. b) Tízszeresére koncentrált vizsgálati közeg, amely a következő anyagokkal készíthető:

vízmentes kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	2,7 g
dinátrium-hidrogénfoszfát (Na_2HPO_4)	4,4 g
(vagy 11,2 g dodekahidrát)	5,3 g
ammónium-klorid (NH_4Cl)	
kalcium-klorid-dihidrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
magnézium-szulfát-heptahidrát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
vas(II)-klorid-tetrahidrát ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
rezaurin (redox indikátor)	0,01 g
nátrium-szulfid-nonahidrát ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(vagy titán(III)-citrát) végső koncentráció	0,8–1,0 mmol/l
nyomelemoldat (lásd a 17. c) pontot; A.13)	10,0 ml
élesztőkivonat	100 g
Oldjuk fel hígítóvízben (14. pont), és egészítse ki:	1 000 ml

A.13. c) Nyomelemoldat, amely a következő anyagokkal készíthető:

mangán(II)-klorid-tetrahidrát ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
ortobórsav (H_3BO_3)	0,05 g

cink-klorid (ZnCl ₂)	0,05 g
réz(II)-klorid (CuCl ₂)	0,03 g
nátrium-molibdát-dihidrát (Na ₂ MoO ₄ ·9H ₂ O)	0,01 g
kobalt(II)-klorid-hexahidrát (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	1,0 g
nikkel(II)-klorid-hexahidrát (NiCl ₂ ·6H ₂ O)	0,1 g
dinátrium-szelenit (Na ₂ SeO ₃)	0,05 g
Oldjuk fel hígítóvízben (14. pont), és egészítse ki:	1 000 ml«

A.14. 25. pont: Előzetes vizsgálat

Alapvető fontosságú, hogy az előzetes vizsgálatot a 24. pontban leírtak szerint végezzék el, kivéve, hogy az iszap szilárd anyag koncentrációja egy százalaka legyen a megadott koncentrációknak, azaz 0,1 g/l, 0,2 g/l és 0,4 g/l. Az inkubálás időtartama legyen legalább 7 nap.

Megjegyzés: A körvizsgálatban (5) a gáztér térfogata túl magas volt (a teljes térfogat 75 %-a); az ajánlott tartományban (10–40 %) kell lennie. A döntő szempont az, hogy a körülbelül 80 %-os gátlásnál termelt gáz mennyisége elfogadható pontossággal mérhető legyen (pl. ± 5–10 %).

A.15. 26–30. pont: A vizsgált vegyi anyag, az oltóanyag és a szubsztrátum hozzáadása.

A hozzáadás az e pontokban leírt módon történik, de a szubsztrátumoldatot (17. pont) a vizsgálati közeg plusz élesztőkivonat szubsztrátum váltja fel (A.11).

Továbbá, az iszap száraz szilárd anyagainak végső koncentrációja 2–4 g/l-ről 0,2 ± 0,05 g/l-re csökken (A.9). Az A.1 táblázat – amely a 29. pontban található táblázat helyébe lép – megad két példát a komponensek vizsgálati keverékhez való hozzáadására.

A.16. 33. pont: A palackok inkubálása

A várható alacsonyabb mértékű gáztermelés miatt az inkubáció legalább 7 napig tart.

A.17. 34. pont: Nyomásmérés

A 34. pontban leírttal megegyező eljárást használják a palackok fejterében lévő nyomás mérésére, ha a gázfázisban lévő mennyiségek meghatározására van szükség. Ha a CO₂ és a CH₄ összesített mennyiségét kell mérni, a folyékony fázis pH-ját körülbelül pH = 2-re csökkentik úgy, hogy H₃PO₄-at injektálnak minden releváns palackba, és a vizsgálati hőmérsékleten történő 30 perces rázás után megméri a nyomást. Több információt lehet azonban kapni az inokulum minőségéről, ha minden palackban megméri a nyomást a savasítás előtt és után. Például amikor a CO₂-termelés aránya sokkal nagyobb, mint a metántermelésé, a vizsgált anyag megváltoztathatja a fermentáló baktériumok érzékenységét és/vagy előnyösen befolyásolhatja a metanogén baktériumokat.

A.18. 36. pont: pH-mérés

Ha H₃PO₄-at kell használni, néhány extra palackot kell létrehozni a pH-mérés céljára, amelyekhez nem adnak H₃PO₄-at.

Hivatkozás:

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

A.1 táblázat

Példák a vizsgálati tételek összeállítására

A reakcióelegy összetevői	1. példa	2. példa	Normális hozzáadási sorrend
Az elkészített oltóanyag koncentrációja (g/l)	0,42	2,1	-
A hozzáadott oltóanyag térfogata (ml)	45	9	4
Az oltóanyag koncentrációja a vizsgálati palackokban (g/l)	0,20	0,20	—
A hozzáadott vizsgálati közeg térfogata (ml)	9	9	2
A hozzáadott hígítóvíz térfogata (ml)	36	72	3
Az élesztő kivonat koncentrációja a vizsgálati palackokban (g/l)	9,7	9,7	—
A vizsgált vegyi anyag törzsoldatának térfogata (ml)	3	3	1
Összes folyadéktérfogat (ml)	93	93	-

*5. függelék***Fogalommeghatározások**

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

C.35. ÜLEDÉKBEN ÉS VÍZBEN ÉLŐ LUMBRICULUS TOXICITÁSI VIZSGÁLATA SZENNYEZETT ÜLEDÉKBEN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 225. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az üledékfogyasztó endobentikus állatok potenciálisan nagymértékben ki vannak téve az üledékben kötött vegyi anyagoknak és ezért kiemelt figyelemben kell ezeket részesíteni, pl. (1), (2), (3). Ezek közül az üledékfogyasztók közül a vízi oligochaeták fontos szerepet játszanak a vízi rendszerek üledékeiben. Az üledék bioturbációja révén és a ragadozók zsákmányállataként ezek az állatok nagy hatással lehetnek az ilyen vegyi anyagok más élőlények, például bentivör halak számára való biológiai elérhetőségére. Az epibentikus szervezetekkel szemben az endobentikus vízi oligochaeták (pl. *Lumbriculus variegatus*) beássák magukat az üledékbe, és az üledék felszíne alatt fogyasztják az üledékrészecskéket. Ez minden lehetséges felvételi útvonalon keresztül biztosítja a vizsgált szervezetek expozícióját a vizsgált anyaggal szemben (pl. érintkezés, szennyezett üledékrészecskék lenyelése, de a porúsvízen és a fedővízen keresztül is).
2. E vizsgálati módszer célja, hogy értékelje az endobentikus oligochaeta *Lumbriculus variegatus* (Müller) üledékkel kapcsolatba hozható vegyi anyagokkal való tartós expozíciójának hatását. A módszer a meglévő üledéktoxicitási és bioakkumulációs vizsgálati protokollokon alapul, pl. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). A módszert statikus tesztelési körülményekhez írták le. Az e vizsgálati módszerben alkalmazott expozíciós forgatókönyv az üledék szennyezése a vizsgált anyaggal. A szennyezett üledék hivatott modellezni a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledéket.
3. A vegyi anyagok, amelyek üledéklakó szervezetekre gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó szervezetek többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól és az állatban bekövetkező végső sorsától függ. Az erősen adszorbeálódó (például $\log K_{ow} > 5$) vagy az üledékbe kovalens kötással beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezett táplálék elfogyasztása. Annak érdekében, hogy ne becsüljék alá az ilyen vegyi anyagok toxicitását, a vizsgált szervezetek szaporodásához és növekedéséhez szükséges táplálékot a vizsgált vegyi anyag alkalmazása előtt adják hozzá az üledékhez (11). A leírt vizsgálati módszer a vizsgálat elvégzéséhez kellően részletes, de egyúttal lehetővé teszi a kísérleti terv kiigazítását is az egyes laboratóriumok körülményeitől és a vizsgált vegyi anyagok változatos jellemzőitől függően.
4. A vizsgálati módszer célja, hogy meghatározza a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgált szervezetek szaporodására és élőanyag-tömegére kifejtett hatásait. A mért biológiai paraméterek az összes túlélő féreg száma és az élőanyag-tömeg (száraz tömeg) az expozíció végén. Ezeket az adatokat vagy regressziós modell használatával elemzik az x % hatást okozó koncentráció (pl. EC_{50} , EC_{25} , és EC_{10}) becslése érdekében, vagy statisztikai hipotézis-vizsgálattal, hogy meghatározzák az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (LOEC).
5. E melléklet »Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett üledék használatával« című C.27. fejezete (6) sok lényeges és hasznos adatot nyújt a bemutatott üledék toxicitási vizsgálati módszer teljesítményével kapcsolatban. Ezért e dokumentum alapján dolgozták ki azokat a módosításokat, amelyek az üledék toxicitási vizsgálat *Lumbriculus variegatus* fajjal való elvégzéséhez voltak szükségesek. További hivatkozott dokumentumok például az ASTM Szabványos iránymutatás az üledékekhez kapcsolódó szennyeződések fenéklakó gerinctelenekben való bioakkumulációjának meghatározására c. kiadványa (3), az US EPA Módszerek az üledékekhez kapcsolódó szennyeződések toxicitásának és bioakkumulációjának édesvízi gerinctelenekben történő mérésére c. kiadványa (7), valamint az ASTM Iránymutatás az üledékek toxikológiai vizsgálat céljából történő gyűjtéséhez, tárolásához, jellemzéséhez és feldolgozásához, valamint a fenéklakó gerinctelenek gyűjtésére használt mintavevők kiválasztásához (12). Emellett a vizsgálati módszer körvizsgálata során szerzett gyakorlati tapasztalatok ((13), körvizsgálati jelentés) és a szakirodalmi adatok is fő információforrásként szolgáltak e dokumentum elkészítése során.

ELŐFELTÉTELEK ÉS IRÁNYMUTATÓ INFORMÁCIÓK

6. A vizsgált vegyi anyagra vonatkozó információkat (például a biztonsági előírásokat, a megfelelő tárolási körülményeket és az analitikai módszereket) a vizsgálat megkezdése előtt össze kell gyűjteni. A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozóan a (14) szakirodalom nyújt további tájékoztatást.

7. Az alábbi információkat kell ismerni a vizsgált vegyi anyagról a vizsgálat elvégzése előtt:
 - közönséges név, kémiai név (lehetőleg az IUPAC név), szerkezeti képlet, CAS nyilvántartási szám, tisztaság;
 - gőznyomás;
 - oldhatóság vízben;
8. A következő kiegészítő információkat hasznosnak tekintik a vizsgálat megkezdése előtt:
 - oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow});
 - szerves szén-víz megoszlási hányados, K_{oc} formában kifejezve;
 - hidrolízis;
 - fototranszformáció vízben;
 - biológiai lebonthatóság;
 - felületi feszültség.
9. Az alkalmazandó üledék bizonyos jellemzőire vonatkozó információkat a vizsgálat kezdete előtt be kell szerezni (7). A részleteket lásd a 22–25. pontban;

A VIZSGÁLAT ELVE

10. Hasonló fiziológiai állapotú (az 5. függelékben leírtak szerint szinkronizált) férgek tesznek ki egy mérgező anyag olyan koncentrációsorozatának, amelyet az üledék-víz rendszer üledékfázisán alkalmaznak. Közékként mesterséges üledéket és mesterséges vizet kell használni. A vizsgálati edények, amelyekhez nem adnak a vizsgált vegyi anyagot, kontrollként szolgálnak. Az üledéket ömlesztve szennyezik be a vizsgált vegyi anyaggal minden koncentrációsztint esetében, hogy lecsökkentsék az egyes koncentrációk ismétlései közötti variabilitást, és a vizsgált szervezeteket ezt követően vizsik be a vizsgálati edényekbe, amelyekben az üledék- és vízkoncentrációkat egyensúlyba hozták (lásd a 29. pontot). A vizsgálati állatok 28 napig vannak kitéve az üledék-víz rendszereknek. Tekintettel a mesterséges üledék alacsony tápanyagtartalmára, az üledéket ki kell egészíteni egy táplálékforrással (lásd a 22–23. pontot és a 4. mellékletet) annak érdekében, hogy a férgek növekedjenek és szaporodjanak a kontroll körülmények között. Ily módon biztosítható, hogy a vizsgált állatok ki legyenek téve a vegyi anyagnak a vízben és az üledékben, valamint a táplálékon keresztül is.
11. Az ilyen típusú vizsgálatok preferált végpontja az EC_x (például EC_{50} , EC_{25} és EC_{10} ; hatáskoncentráció, amely a vizsgálati szervezetek x %-át érinti) a reprodukcióra és az élőanyag-tömegre, a kontrollal összehasonlítva. Meg kell azonban jegyezni, hogy figyelembe véve a rendkívül magas 95 %-os megbízhatósági határokkal rendelkező (pl. (15)) alacsony EC_x (például EC_{10} , EC_{25}) értékek magas bizonytalanságát és a hipotézisvizsgálat során számított statisztikai erőt, az EC_{50} tekinthető a legerősebb végpontnak. Ezen kívül az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) kiszámítható az élőanyag-tömegre és a szaporodásra, ha a vizsgálati elrendezés és az adatok támogatják ezeket a számításokat (lásd a 34–38. pontot). A vizsgálat célja, vagyis hogy az EC_x vagy a NOEC értékét akárják-e kiszámítani, meghatározza a vizsgálati elrendezést.

REFERENCIA VIZSGÁLAT

12. A kontroll szervezetek teljesítménye várhatóan kellőképpen demonstrálja a laboratóriumi képességét a vizsgálat elvégzésére, és ha rendelkezésre állnak történeti adatok, a vizsgálat megismételhetőségét is. Ezen túlmenően, rendszeres időközönként referencia toxicitási vizsgálatokat lehet végezni egy referencia toxikus anyag használatával a vizsgálati szervezetek érzékenységének értékelése céljából. A vízben végzett 96 órás referencia toxikológiai vizsgálatok csak a vizsgált állatok érzékenységének és állapotának megfelelő demonstrálására lehetnek alkalmasak (4) (7). A pentaklorofenol (PCP) teljes vizsgálatban (28 napos expozíció szennyezett üledékben) mutatott toxicitására vonatkozó információt a 6. függelék és a vizsgálati módszer körvizsgálatáról készített jelentés tartalmazza (13). A PCP akut, csak vízi toxicitását pl. a (16) irodalom írja le. Ez az információ a vizsgálati organizmusok érzékenységének összehasonlítására használható a referencia toxikus anyagként PCP-t használó referencia vizsgálatokban. A kálium-kloridot (KCl) és a réz-szulfátot ($CuSO_4$) is javasolták referencia toxikus anyagként az *L. variegatus* fajjal végzett vizsgálatokhoz (4) (7). A mai napig bonyolult a KCl-re vonatkozó minőségi kritériumok meghatározása a toxicitási adatok alapján, mivel hiányoznak a szakirodalmi adatok a *L. variegatus* fajjal kapcsolatban. A réz *L. variegatus* fajra kifejtett toxicitására vonatkozó információ megtalálható a (17)–(21) szakirodalmi hivatkozásban.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

13. A vizsgálat érvényességéhez a következő követelményeknek kell teljesülniük:
- A körvizsgálat (13) kimutatta, hogy a *Lumbriculus variegatus* esetében a kontrollokban az élő férgek ismétlésenkénti átlagos számának legalább 1,8-as faktoriall kell magasabbnak lennie az expozíció végén a férgek expozíció kezdetén tapasztalt ismétlésenkénti számához viszonyítva.
 - A fedővíz pH értékének 6 és 9 között kell lennie az egész vizsgálat során.
 - A fedővíz oxigénkoncentrációja nem lehet kisebb, mint a levegő telítettségi érték (ASV) 30 %-a a vizsgálati hőmérsékleten a vizsgálat időtartama alatt.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati elrendezés

14. A fedővíz megújítása nélküli statikus rendszerek használata javasolt. Ha az üledék-víz arány (lásd a 15. pontot) megfelelő, a gyenge levegőztetés általában elegendő, hogy a víz minősége elfogadható szinten maradjon a vizsgálati szervezetek számára (pl. maximalizálja az oldott oxigén szintjét, minimalizálja a kiválasztási termékek felgyülemelését). A fedővíz szakaszos vagy folyamatos megújításával járó félstatikus vagy állandó áramlású rendszerek csak kivételes esetekben alkalmazhatók, mivel a fedővíz rendszeres megújítása várhatóan befolyásolja a kémiai egyensúlyt (pl. vizsgált vegyi anyag veszteség a vizsgálati rendszerből).

Vizsgálati edények és készülékek

15. Az expozíciót pl. 250 ml-es űrtartalmú és 6 cm átmérőjű üveglombikokban kell végezni. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő üvegedények is alkalmazhatók. Minden edénynek egy kb. 1,5–3 cm mélységű formulázott üledékréteget kell kapnia. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. Az edények a betelepítési aránynak – azaz az üledék egy tömegegységére jutó vizsgálati férgek számának – megfelelő térfogatúak legyenek (lásd még a 39. pontot).
16. A vizsgálati oldatokkal érintkezésbe kerülő vizsgálati edényeknek és egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más, kémiailag inert anyagból kell készülniük. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot, vagy amelyekből más vegyi anyagok mosódhatnak ki, és ártalmasak lehetnek a vizsgálatához használt állatokra. Politetrafluoroeetilént (PTFE), rozsdamentes acélt és/vagy üveget kell használni azokban a berendezésekben, amelyek érintkeznek a vizsgálati közeggel. Az üvegbe közismerten felszívódó szerves vegyi anyagok esetében szilanizált üveg használata szükséges. Ilyen esetekben a felszerelést használat után el kell dobni.

A vizsgálatához használt fajok

17. Az ilyen típusú vizsgálatokban használt faj az édesvízi oligochaeta *Lumbriculus variegatus* (Müller). Ez a faj sokféle üledéktípust tolerál, és széles körben használják az üledékek toxicitási és bioakkumulációs vizsgálataihoz [pl. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. A vizsgálatához használt állatok beszerzési forrását, a faj azonosságának igazolását (pl. (36)), valamint a tenyésztési körülményeket jegyzőkönyvezni kell. A fajmeghatározást nem szükséges minden vizsgálat előtt elvégezni, ha a példányok saját tenyészetből származnak.

A vizsgálatához használt organizmusok tenyésztése

18. Annak érdekében, hogy elegendő számú féreg álljon rendelkezésre az üledék toxicitási vizsgálatok lefolytatásához, a férgeseket célszerű állandó laboratóriumi tenyészetben tartani. A *Lumbriculus variegatus* laboratóriumi tenyésztési módszereivel kapcsolatos iránymutatás és a starterkultúrák beszerzési forrásai az 5. függelékben található. A faj tenyésztésének részleteit lásd a (3), (7) és (27) szakirodalmi hivatkozásban.
19. Annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálatot ugyanazon fajhoz tartozó állatokkal végezzék, erősen ajánlott egyetlen fajból álló tenyészeteket létesíteni. Győződjön meg arról, hogy a tenyészetek és különösen a vizsgálatok során felhasznált férgek mentesek a látható betegségektől és rendellenességektől.

Víz

20. Az e melléklet C.1. fejezete szerinti mesterséges víz (37) használata ajánlott fedővízként a vizsgálatokban; ezt a vizet a férgek laboratóriumi tenyészeiben is lehet használni (elkészítését lásd a 2. függelékben). Ha szükséges, a természetes víz használható. A vizsgálathoz olyan minőségű vizet kell választani, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt faj növekedését és szaporodását az alkalmazkodási és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes külső megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A *Lumbricus variegatus* fajról kimutatták, hogy túléli, növekszik és szaporodik az ilyen típusú vízben (30), és biztosított a vizsgálati és tenyésztési körülmények maximális szabványosítása. Ha a mesterséges vizet használnak, annak összetételét jegyzőkönyvezni kell, és a vizet használat előtt legalább a pH, az oxigéntartalom, és a keménység (CaCO₃ mg/l formájában kifejezve) tekintetében jellemezni kell. A víz használat előtt elemzése mikroszkopikus szennyező anyagokra hasznos információkat nyújthat (lásd például a 3. függelékét).
21. A fedővíz pH-értékének a 6,0–9,0 tartományban kell lennie (lásd a 13. pontot). Ha fokozott ammóniaképződés várható, hasznosnak tekintik a pH 6,0 és 8,0 között tartását. Például gyenge szerves savak vizsgálata esetén ajánlatos a pH-t a vizsgálat során használandó víz pufferelésével beállítani, pl. a (16) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint. A vizsgálathoz használandó víz teljes keménységének 90–300 mg CaCO₃/liter természetes víz között kell lennie. A 3. függelék összefoglalja az elfogadható hígítóvíz további kritériumait az OECD 210. iránymutatása szerint (38).

Üledék

22. Mivel nem biztos, hogy az egy meghatározott forrásból származó nem szennyezett természetes üledékek egész évben rendelkezésre állnak, illetve az őshonos élőlények, valamint a mikroszennyezők jelenléte befolyásolhatja a vizsgálatot, formulázott üledék (más néven rekonstituált, mesterséges vagy szintetikus üledék) használata ajánlott. A formulázott üledék használata minimalizálja a vizsgálati feltételek változékonyságát, valamint az őshonos fauna bejutásának veszélyét. A következő formulázott üledék a (6), (39) és (40) szerinti mesterséges üledéken alapul. Használata ajánlott az ilyen típusú vizsgálatokban ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzegmoha; fontos, hogy a tőzeget por formában kell használni, lebomlás foka: »közepes«, finomra őrölt (szemcseméret ≤ 0,5 mm), csak levegőn szárított.
 - b) 20 ± 1 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinitartalommal).
 - c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (finom homok, szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 µm tartományban legyen).
 - d) Ionmentesített víz, az üledék száraz tömeg 30–50 %-a, a száraz üledékkomponenseken felül.
 - e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonátot (CaCO₃) adnak hozzá.
 - f) A végtermékként kapott keveréknek 2 % (± 0,5 %) szerves széntartalommal (TOC) kell rendelkeznie az üledék száraz tömegéhez viszonyítva, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával kell beállítani.
 - g) Táplálék, pl. a nagy csalán (*Urtica* sp., a gyógyszertári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra porított levelei, vagy az *Urtica* sp. porított levelei és alfa-cellulóz keveréke (1:1), az üledék száraz tömegének 0,4–0,5 %-ában, a száraz üledékkomponenseken felül; a részleteket lásd a 4. függelékben.
23. A tőzeg, kaolin agyag, táplálékanyagok és homok beszerzési forrását ismerni kell. A g) ponton kívül e melléklet C.27. fejezete (6) felsorolja az alternatív táplálékforrásként használandó növényi anyagokat: dehidratált eperfa (*Morus alba*), fehér lóhere (*Trifolium repens*), spenót (*Spinacia oleracea*) levelek, vagy gabonafű.
24. A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. A kiválasztott táplálékforrásnak legalább elfogadható mértékű szaporodást kell lehetővé tennie a kontrollokban. A mesterséges üledékben vagy összetevőiben található mikroszennyező anyagok felhasználás

előtti analízise hasznos információkkal szolgáltathat. A formulázott üledék elkészítésének egy példáját a 4. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionálták (lásd még a 25. pontot és a 4. függelékét). A mesterséges üledéket legalább az összetevők eredete, a szemcseméret eloszlása (homok, iszap és agyag százaléka), az összes szerves szén tartalom (TOC), a víztartalom és a pH tekintetében jellemezni kell. A redoxpotenciál mérése opcionális.

25. Ha szükséges, például specifikus vizsgálatok céljából, nem szennyezett területekről származó természetes üledékek is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztő üledékként (3). Ha azonban természetes üledéket alkalmaznak, akkor azt legalább az eredetével (a gyűjtés helye), a porusvíz pH-értékével és ammóniatartalmával, összes szerves szén tartalmával (TOC) és nitrogéntartalmával, részecskeméret-eloszlásával (homok, iszap, és agyag százaléka), valamint százalékos víztartalmával kell jellemezni (7), és mentesnek kell lennie mindennemű szennyeződéstől és egyéb élőlényektől, amelyek versenyezhetnek a vizsgált szervezetekkel vagy elfogyaszthatják azokat. A redoxpotenciál és a kationcserélő kapacitás mérése opcionális. Az vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezés előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E kondicionáló időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni.
26. A vizsgálathoz olyan minőségű üledéket kell használni, amely lehetővé teszi a kontroll organizmusok túlélését és szaporodását az expozíciós időszak alatt anélkül, hogy rendellenes külső megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A kontroll férgeknek be kell ásniuk magokat az üledékbe, és el kell fogyasztaniuk az üledéket. A kontrollok szaporodásának meg kellene felelnie legalább a 13. pontban leírt érvényességi feltételeknek. A székletpelletek jelenlétét vagy hiányát az üledék felszínén – ami azt jelzi, hogy az üledéket a férgek elfogyasztották-e – fel kell jegyezni, mert ez az információ hasznos lehet a vizsgálati eredmények expozíciós útvonal tekintetében való értelmezése során. Az üledék elfogyasztásával kapcsolatos további információkat lehet nyerni a (24), (25), (44) és (45) szakirodalmi hivatkozásban leírt módszerek alkalmazásával, amelyek meghatározzák az üledék elfogyasztását vagy a részecskék kiválasztását a vizsgálati szervezetekben.
27. A természetes üledékek használat előtti laboratóriumi manipulációs eljárásait a (3), (7) és (12) irodalom írja le. A *Lumbriculus* vizsgálatban használni ajánlott mesterséges üledék elkészítését és tárolását a 4. függelék írja le.

A vizsgált vegyi anyag bevitelle

28. A vizsgált vegyi anyaggal be kell szennyezni az üledéket. Mivel a legtöbb vizsgált vegyi anyagnak várhatóan alacsony a vízben való oldhatósága, a lehető legkisebb térfogatban fel kell őket oldani egy alkalmas szerves oldószerben (pl. aceton, n-hexán, ciklohexán) törzsoldat készítése érdekében. A törzsoldatot ugyanazzal az oldószerral kell hígítani a vizsgálati oldatok elkészítéséhez. Az oldódást segítő megfelelő szer kiválasztásának fő szempontjai az oldószer toxikus hatása és illékonyága, valamint a vizsgált vegyi anyag választott oldószerben való oldhatósága. Minden egyes koncentrációszinthez a megfelelő oldat azonos térfogatát kell használni. Az üledéket ömlesztve kell szennyezni minden koncentrációszint esetében annak érdekében, hogy minimalizálni lehessen a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának ismétlések közötti variabilitását. Ezután a vizsgálati oldatokat összekeverik kvarchomokkal a 22. pontban leírtak szerint (azaz 10 g kvarchomok vizsgálati edényenként). A kvarchomok teljesen átáztatásához a 0,20–0,25 ml oldat/g homok arányt elegendőnek találták. Ezt követően az oldószert szárazsáig el kell párolni. A vizsgált vegyi anyag együttes elpárolgása miatt (pl. a vegyi anyag gőznyomása függvényében) fellépő veszteségek minimalizálása érdekében a bevont homokot szárítás után azonnal fel kell használni. A száraz homokot összekeverik a megfelelő mennyiségű formulázott üledékkel a megfelelő koncentrációszinten. Az üledék elkészítése során a vizsgált vegyi anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni). Nagy előnye ennek az eljárásnak, hogy az oldószer gyakorlatilag nem kerül bele az üledékbe (7). Alternatív megoldásként, például terepről származó üledékek esetében, a vizsgált vegyi anyagot az üledék egy kiszáritott és apróra őrölt részének szennyezésével is hozzá lehet adni a kvarchomok esetében fentebb leírt módon, vagy a vizsgált vegyi anyagnak a nedves üledékbe történő bekeverésével és a használt oldódást segítő szer későbbi elpárologtatásával. Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált vegyi anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Szükség esetén részmintákat lehet elemezni a célkoncentrációknak az üledékben történő igazolása céljából, valamint a homogenitás meghatározása érdekében. A vizsgálati oldatok részmintáinak elemzése is hasznos lehet, hogy megerősítsék a célkoncentrációk elérését az üledékben. Mivel oldószert használnak a kvarchomok vizsgált vegyi anyaggal való bevonására, egy oldószer kontrollt is használni kell, amelyet ugyanakkora mennyiségű oldószerral készítenek, mint amelyet a vizsgálati üledékek esetében használtak. Az alkalmazott szennyezési módszert, valamint a fent leírt szennyezési eljárástól eltérő módszer választásának okait jegyzőkönyvezni kell. A szennyezési módszert hozzá lehet igazítani a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaihoz, pl. a szennyezés vagy kiegyenlítés során fellépő párolgás miatti veszteségek elkerülése érdekében. A szennyezési eljárásokkal kapcsolatos további iránymutatást az Environment Canada (1995) nyújt (46).

29. A szennyezett üledék elkészítése, a párhuzamos vizsgálati edények közötti szétosztása, és vizsgálati vízzel való feltöltése után lehetővé kell tenni a vizsgált vegyi anyagnak az üledékből a vizes fázisba történő szétoszlását (pl. (3) (7) (9)). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A megfelelő ekvibrációs idő az üledéktől és a vegyi anyagtól függ, tartama néhány órától több napig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet. Ebben a vizsgálatban az egyensúly beállását nem várják meg, hanem 48 óra és 7 nap közötti hosszúságú kiegyenlítődési időszakot javasolnak. Így a vizsgált vegyi anyag lebomlására rendelkezésre álló idő minimalizálható. A vizsgálat céljától függően, például ha utánozni kell a környezeti feltételeket, a szennyezett üledéket hosszabb ideig is lehet ekvibrálni vagy érlelni.
30. Az ekvibrációs periódus végén a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának elemzéséhez mintákat kell venni legalább a fedővízből és az ömlesztett üledékből, mégpedig legalább a legmagasabb és egy alacsonyabb koncentráción. Ezek a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömegegyensúly kiszámítását és az eredmények mért kiindulási koncentrációk alapján történő kifejezését. A mintavételezés általában megzavarja vagy elpusztítja az üledék-víz rendszert. Ezért általában nem lehet ugyanazt az ismétlést használni az üledék és a férgek mintavételezéséhez. További megfelelő méretű »analitikai«, biológiai megfigyelésekhez nem használt edényeket kell létrehozni, amelyeket azonos módon kell kezelni (beleértve a vizsgálati szervezetek jelenlétét). Az edényméreteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítani tudják az analitikai módszer által megkívánt mennyiségű mintát. A mintavételezést részletesen az 53. pont ismerteti.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Előzetes vizsgálat

31. Ha nem áll rendelkezésre információ a vizsgált vegyi anyag *Lumbriculus variegatus* fajjal szembeni toxicitásáról, hasznos lehet előzetes vizsgálatot végezni annak érdekében, hogy meghatározzák a meghatározó vizsgálatban alkalmazandó koncentrációkat, és optimalizálják a meghatározó vizsgálat vizsgálati feltételeit. E célra a vizsgált vegyi anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. A férgek annyi ideig (pl. 28 napig, mint a meghatározó vizsgálatban) vannak kitéve a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinak, amennyi lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését; ismétlésekre nincs szükség. Az előzetes vizsgálat során meg kell figyelni és fel kell jegyezni a férgek minden olyan viselkedését (például az üledék elkerülése), amelyet a vizsgált vegyi anyag és/vagy az üledék válthat ki. Az 1 000 mg/kg üledék száraz tömeg koncentrációt meghaladó koncentrációkat nem kell vizsgálni az előzetes vizsgálat során.

Meghatározó vizsgálat

32. A meghatározó vizsgálatban legalább öt koncentrációt kell használni, amelyeket pl. az előzetes dózisbehatóró vizsgálat (31. pont) eredménye alapján és a 35., 36., 37. és 38. pontban leírtak szerint kell kiválasztani.
33. Egy kontrollt (az ismétlésekkel kapcsolatban lásd a 36., 37. és 38. pontot) futtatnak a vizsgálati sorozat mellett, amely az összes összetevőt tartalmazza, kivéve a vizsgált vegyi anyagot. Ha oldódást segítő szert használnak a vizsgált vegyi anyag alkalmazásához, annak nem lehet olyan jelentős hatása a vizsgálati szervezetre, amelyet egy további oldószer kontroll ki tudna mutatni.

A vizsgálat megtervezése

34. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a férgek edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Az EC_x becslésének, a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálat lebonyolításának elrendezését a 35., 36., 37. és 38. pont írja le.
35. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált vegyi anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. El kell kerülni a vizsgálati szervezetre ható legkisebb koncentrációnál jóval alacsonyabb, illetve a legnagyobb vizsgált koncentráció feletti extrapolálást. Ha – kivételes esetben – ilyen extrapolálást végeznek, arra teljes körű magyarázatot kell adni a jelentésben.

36. Ha az EC_{50} értékét kell becsülni, legalább öt koncentrációt és minden koncentráción legalább három ismétlést kell vizsgálni; hat ismétlést javasolnak a kontroll vagy (ha van) az oldószer kontroll esetében annak érdekében, hogy javítsák a kontroll variabilitásának becslését. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a koncentráció-válasz görbe lapos). Az 5–95 % tartományban elhelyezkedő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidenciaintervallum csökkenéséhez vezet.
37. Ha a LOEC/NOEC értékeket kell megbecsülni, legalább öt kísérleti koncentrációt kell használni legalább négy ismétlésben (hat ismétlés ajánlott a kontroll, illetve – ha van – az oldószer kontroll esetében annak érdekében, hogy javítsák a kontroll variabilitásának becslését) és a koncentrációk közötti szorzószám nem lehet nagyobb, mint kettő. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.
38. Ha nem várható hatás az 1 000 mg/kg üledék száraz tömeg koncentrációig (pl. az előzetes dózisbehatároló vizsgálat alapján), vagy ha egyetlen koncentráció vizsgálata elegendő az érdeklődésre számot tartó NOEC-érték megerősítéséhez, határérték-vizsgálatot lehet végezni (egy vizsgálati koncentráció és a kontrollok használatával). Az utóbbi esetben a vizsgálati jelentésben részletesen meg kell indokolni a határérték-koncentráció kiválasztását. A határérték-vizsgálat célja annak a koncentrációnak a meghatározása, amely elég nagy ahhoz, hogy az elvégzett vizsgálat lehetővé tegye a döntéshozók számára a vizsgált vegyi anyag lehetséges toxikus hatásainak a kizárását, és annak a határértéknek a megállapítását, amelyen túli koncentrációknak az előfordulása semmilyen esetben sem várható. Az ajánlott koncentráció 1 000 mg/kg (száraz tömeg). Általában mind a kezelés, mind a kontrollok esetében legalább hat ismétlés szükséges. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.

Expozíciós körülmények

A vizsgálathoz használt organizmusok

39. A vizsgálatot legalább 10 féreggel végzik a biológiai paraméterek meghatározására használt ismétlések esetében. A férgek száma körülbelül 50–100 mg nedves élőanyagnak felel meg. 17,1 % szárazanyag-tartalmat feltételezve (48) ez edényenként körülbelül 9–17 mg száraz élőanyagot eredményez. Az US EPA (2000) (7) az 1:50 értéket (száraz élőanyag-tömeg: TOC) nem meghaladó feltöltési arányt ajánl. A 22. pontban leírt formulázott üledék esetében ez a 10 férgegre körülbelül 43 g üledéknek (száraz tömeg) felel meg 2,0 % TOC-tartalommal a száraz üledékben. Azokban az esetekben, ahol edényenként több mint 10 férget használnak, az üledék és a fedővíz mennyiségét megfelelően módosítani kell.
40. Az egy vizsgálatban használt férgeknek ugyanabból a forrásból kell származniuk, és hasonló fiziológiai állapotban kell lenniük (lásd az 5. függelékét). Hasonló méretű férgeket kell kiválasztani (lásd a 39. pontot). Ajánlott az átlagtömeg becslése érdekében a vizsgálat előtt a férgetétel vagy -populáció egy részmintáját lemérni.
41. A vizsgálatban használandó férgeket eltávolítják a tenyészetből (a részleteket lásd az 5. függelékben). A közelmúltban bekövetkezett fragmentáció jelét nem mutató nagy (felnőtt) állatokat tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (pl. Petri-csészékbe) helyezik át. Ezt követően az állatokat az 5. függelékében leírtak szerint szinkronizálják. Egy 10–14 napos regenerációs időszak után az enyhe mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutató, hasonló méretű, ép, teljes férgeteket kell felhasználni a vizsgálathoz. Ha a vizsgálati feltételek eltérnek a tenyésztési körülményektől (pl. a hőmérséklet, fényviszonyok és fedővíz szempontjából), egy pl. 24 órás, a vizsgálati feltételekkel megegyező hőmérsékleten, fényviszonyokkal és fedővízzel végzett akklimatizációs szakasznak elegendőnek kell lennie, hogy a férgek alkalmazkodjanak a vizsgálati körülményekhez. Az adaptálódott oligochaetákat véletlenszerűen kell elosztani a vizsgálati edények között.

Táplálás

42. Mivel a táplálékot a vizsgált vegyi anyag alkalmazása előtt (vagy alatt) adják hozzá az üledékhez, a férgek a vizsgálat alatt nem kapnak további táplálékot.

Fény és hőmérséklet

43. A kultúrában és a vizsgálatban alkalmazott megvilágítási időszak általában 16 óra (3), (7). A fényerőt az üledék felszínén fennálló természetes körülmények utánzása érdekében alacsonyan kell tartani (pl. 100–500 lux), és legalább egy alkalommal meg kell mérni az expozíciós idő alatt. A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani. Egy adott mérési időpontban a vizsgálati edények hőmérsékletének különbsége nem haladhatja meg a ± 1 °C-ot. A vizsgálati edényeket randomizált módon kell elhelyezni a vizsgálati inkubátorban vagy a vizsgálati területen, pl. annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsék a szaporodásnak az edény elhelyezkedése miatti torzítását.

Levegőztetés

44. A vizsgálati edényekben lévő fedővizet óvatosan levegőztetni kell (pl. 2–4 buborék másodpercenként) egy Pasteur-pipettán keresztül, amelyet kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett kell elhelyezni az üledék zavarásának minimalizálása érdekében. Ügyelni kell arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne legyen kevesebb, mint a levegő telítettségi érték (ASV) 30 %-a. A levegőellátást ellenőrizni kell, és ha szükséges, munkanapokon legalább naponta egyszer be kell állítani.

A vízminőség mérése

45. Az alábbi vízminőségi paramétereket kell mérni a fedővízben:

Hőmérséklet:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben; ha lehetséges, a környező közeg (környezeti levegő vagy vízfürdő) hőmérsékletét is rögzíteni lehet, pl. óránként;
Oldott oxigén koncentrációja:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben; mg/l és % ASV (levegő telítettségi érték) mértékegységben kifejezve;
Levegőellátás:	munkanapokon legalább naponta egyszer ellenőrizni és szükség esetén módosítani kell;
pH:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben;
Vízkeménység:	az expozíciós idő elején és végén legalább egy kontroll ismétlésben és a legmagasabb koncentráció egyik vizsgálati edényében; mg/l CaCO ₃ mértékegységben kifejezve;
Teljes ammónia-tartalom:	az expozíciós idő elején és végén, majd azt követően hetente 3x legalább egy kontroll ismétlésben és koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben; mg/l NH ₄ ⁺ , vagy NH ₃ vagy összes ammónia-N mértékegységben kifejezve.

Ha a víz minőségi paramétereinek mérése jelentős mennyiségű minta eltávolítását igényli az edényekből, tanácsos lehet elkülönített edényeket létrehozni a vízminőségi mérésekhez, hogy ne változzon meg a víz-üledék térfogatarány.

Biológiai megfigyelések

46. A vizsgálati edényeket meg kell figyelni az expozíció alatt annak érdekében, hogy vizuálisan értékeljék a férgek viselkedésében a kontrollokhoz képest mutatkozó eltéréseket (pl. üledék elkerülése, széklettel látható az üledék felszínén). A megfigyeléseket fel kell jegyezni.

47. A vizsgálat végén minden ismétlést megvizsgálják (a kémiai vizsgálatok számára kijelölt további edényeket ki lehet zárni ebből a vizsgálatból). Megfelelő módszert kell alkalmazni a férgek vizsgálati tartályból történő kinyerésére. Ügyelni kell arra, hogy az összes férget sértetlen állapotban lehessen kinyerni. Az egyik lehetséges eljárás a férgek szitálással történő elválasztása az üledéktől. Megfelelő lyukbőségű rozsdamentes acélhálót lehet használni. A fedővíz nagyobb részét óvatosan dekantálják, és a visszamaradó üledéket és vizet összekeverik, hogy egy zagylevet kapjanak, amelyet át lehet szűrni a szitán. 500 μm lyukbőségű szitát használva a legtöbb üledékrészecske nagyon gyorsan áthalad a szitán; a szitálást gyorsan kell elvégezni annak megakadályozására, hogy a férgek bemásszanak a szita lyukaiba vagy átmásszanak rajta. A 250 μm -es szita megakadályozza, hogy a férgek bemásszanak a lyukakba vagy átmásszanak rajta; ügyelni kell azonban arra, hogy a lehető legkevesebb üledékrészecske maradjon vissza a szitában. Az ismétlések átszitált zagylevét egy második alkalommal is át lehet vezetni a szitán, hogy az összes férget kinyerjék. Alternatív módszer lehet az üledék felmelegítése, amihez a vizsgálati edényeket egy 50–60 °C-os vízfürdőbe helyezik; a férgek el fogják hagyni az üledéket és egy tűzcsiszolt széles szájú pipetta segítségével össze lehet őket gyűjteni az üledék felszínéről. Egy másik alternatív módszer lehet, ha az üledékből zagylevet készítenek, és egy megfelelő méretű sekély serpenyőbe öntik. A sekély zagyrétegből a férgeket acéltűvel vagy óráscsipesszel (inkább villaként, mint csipeszként használva, hogy a férgek ne sérüljenek meg) fel lehet szedegetni és át lehet helyezni tiszta vízbe. A férgeket az üledék-zagylétől történő elválasztás után vizsgálati közeggel leöblítik és megszámlálják.
48. Az alkalmazott módszertől függetlenül a laboratóriumnak be kell bizonyítania, hogy a személyzet képes a szervezetek átlagosan legalább 90 %-át kinyerni a teljes üledékből. Például bizonyos számú vizsgálati organizmust lehet hozzáadni a kontroll üledékhez vagy a vizsgálati üledékekhez, és 1 óra elteltével meghatározni a kinyerési arányt (7).
49. Az ismétlésenkénti élő és elhullott egyedek számát fel kell jegyezni és értékelni kell. A férgek alábbi csoportjait kell elhullottnak tekinteni:
- nincs reakció enyhe mechanikai ingerre
 - lebomlás jelei figyelhetők meg (az »a« ponttal együtt)
 - eltűnt férgek
- Továbbá, az élő férgeket három csoport egyikébe lehet rendelni:
- nagy teljes férgek (felnőttek) regenerálódott testtájuk nélkül
 - teljes férgek regenerálódott, világosabb színű testtájakkal (azaz új posterior résszel, új anterior résszel, vagy egyaránt új anterior és posterior résszel)
 - hiányos férgek (azaz a közelmúltban fragmentálódott férgek nem regenerálódott testtájakkal)
- Ezek a kiegészítő megfigyelések nem kötelezőek, de felhasználhatók a biológiai eredmények további értelmezésére (például nagy számú féreg besorolása a c csoportba a szaporodás és a regeneráció késését jelezheti egy adott kezelési csoportban). Továbbá, ha különbségek figyelhetők meg a kezelt és a kontroll férgek külső megjelenésében (pl. a kültakaró elváltozásai, ödémás testszakaszok), ezeket fel kell jegyezni.
50. Közvetlenül a számolás/értékelés után az egyes ismétlésekben található élő férgeket áthelyezik szárított, előzetesen lemért és felcímkézett mérőtálcákba (replikátumonként egy tálca), és mérőtálcánként egy csepp etanollal elpusztítják őket. A mérőtálcákat szárítókamencébe helyezik 100 \pm 5 °C-on egy éjszakán át száradni, majd a szárítóban történt lehűtést követően megméri őket, és meghatározzák a férgek száraz tömegét (lehetőleg g-ban, legalább 4 tizedesjegyig).
51. A teljes száraz tömeg mellett a hamumentes száraz tömeget is meg lehet határozni a (49) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint annak érdekében, hogy figyelembe lehessen venni a férgek emésztőrendszerében jelen lévő, az elfogyasztott üledékből származó szervetlen komponenseket.
52. Az élőanyagot az ismétlésenkénti teljes biomasszában határozzák meg, beleértve a felnőtt és a fiatal férgeket is. Az elhullott férgeket nem kell figyelembe venni az ismétlések élőanyag-tömegének meghatározása során.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának ellenőrzése

Mintavétel

53. A vizsgált vegyi anyag kémiai analíziséhez való mintákat legalább a legmagasabb koncentrációból és egy alacsonyabb koncentrációból kell venni, legalább a kiegyenlítődesi szakasz végén (a vizsgálati szervezetek hozzáadása előtt) és a vizsgálat végén. Legalább az ömlesztett üledékből és a fedővízből kell mintát venni az elemzéshez. Legalább két mintát kell venni mátrixonként és kezelésként minden mintavételi időpontban. Az egyik mintát tartalékként félre lehet tenni (pl. arra az esetre, ha a kezdeti elemzés kívül esik a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományán). Speciális kémiai tulajdonságok esetében, például ha a vizsgált vegyi anyag gyors lebomlása várható, az analitikai menetrendet a szakértői vélemények alapján finomítani lehet (pl. gyakoribb mintavételezés, több koncentrációsint elemzése). Mintákat lehet venni a közbenső mintavételi időpontokon is (pl. az expozíció kezdete utáni hetedik napon).
54. A fedővízből óvatos dekantálás vagy a fedővíz leszívása útján kell mintát venni, hogy minimalizálható legyen az üledék felzavarása. A minták térfogatát fel kell jegyezni.
55. A fedővíz eltávolítása után az üledéket homogenizálni kell és át kell tölteni egy megfelelő tartályba. A nedves üledékminta tömege feljegyzésre kerül.
56. Amennyiben ezen kívül a pórúsvízben lévő vizsgált vegyi anyag elemzése is szükséges, a homogenizált és lemért üledékmintákat centrifugálni kell a pórúsvíz kinyeréséhez. Például körülbelül 200 ml nedves üledéket lehet betölteni egy 250 ml-es centrifugapohárba. Ezt követően a mintákat szűrés nélkül kell centrifugálni a pórúsvíz izolálásához, pl. $10\,000 \pm 600 \times g$ értéken, 30-60 percen át, a vizsgálat során alkalmazott hőmérsékletet nem meghaladó hőmérsékleten. Centrifugálás után a felülúszót dekantálják vagy pipettával leszívják, ügyelve arra, hogy semmilyen üledékrészecske ne kerüljön bele, és a térfogatot feljegyzik. Feljegyzik a megmaradó üledékpellet tömegét. Megkönnyítheti a tömegegyensúly becslését vagy a vizsgált vegyi anyag kinyerését a víz-üledék rendszerből, ha minden mintavételi időpontban meghatározzák az üledék száraz tömegét. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórúsvízben.
57. Az azonnali analízis meghiúsulása esetén a mintákat megfelelő módszerrel kell tárolni, pl. az adott vizsgált vegyi anyag minimális lebomlása érdekében ajánlott tárolási körülmények mellett (pl. a környezeti mintákat általában -18 °C-on, sötétben tárolják). A vizsgálat megkezdése előtt szerezzon információt az adott vizsgált vegyi anyag megfelelő tárolási körülményeiről, például a tárolás időtartamáról és hőmérsékletéről, a kivonási eljárásokról, stb.

Analitikai módszer

58. Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgált anyaghoz használt analitikai módszer pontossága és érzékenysége határozza meg, kísérlettel kell ellenőrizni legalább a legalacsonyabb és a legmagasabb koncentráción, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált anyag vízből és üledékmintákból való visszanyerése kielégítő-e az adott módszer szempontjából. Ellenőrizni kell azt is, hogy a vizsgált anyag kimutatható-e a kontroll kamrákban a kimutatási határértéket meghaladó koncentrációban. Ha szükséges, javítsa ki a névleges koncentrációkat a minőségellenőrző szennyezések visszanyerési értékeire (pl. ha a visszanyerés a szennyező mennyiség 80–120 %-os tartományán kívül esik). A vizsgálat során a mintákat mindvégig úgy kell kezelni, hogy a szennyeződés és a veszteség (például a vizsgált vegyi anyag mintavevő eszközön való adszorbeálódása következtében) a lehető legkisebb mértékű legyen.
59. A vizsgált vegyi anyag visszanyerését, a mennyiségi meghatározási határértéket, és a kimutatási határértéket üledékben és vízben fel kell jegyezni és bele kell foglalni a jelentésbe.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

60. A vizsgálat statisztikailag értékelendő főbb kötelező hatásváltozói az élőanyagtömeg és a férgek száma ismétlésként. Opcionálisan a szaporodás (például a férégszám növekedése) és a növekedés (például a száraz élőanyagtömeg növekedése) is értékelhető. Ebben az esetben el kell végezni a férgek száraz tömegének becslését az expozíció kezdetén, pl. megmérve a vizsgálatban használandó szinkronizált féregtétel egy reprezentatív részmintájának száraz tömegét.

61. Bár a mortalitás nem végpontja a vizsgálatnak, a mortalitást ki kell értékelni, amennyire csak lehetséges. A mortalitás becsléséhez azokat a férgeket, amelyek nem reagálnak enyhe mechanikai ingerre vagy a bomlás jeleit mutatják, valamint a hiányzó férgeket elpusztultnak kell tekinteni. Az elhullásokat legalább fel kell jegyezni és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.
62. A hatáskonzentrációkat mg/kg üledék száraz tömeg mértékegységben kell megadni. Ha a vizsgált vegyi anyagnak az üledékben, vagy az üledékben és fedővízben az expozíció elején mért visszanyerése a névleges koncentráció 80–120 %-a, a hatáskonzentrációkat (EC_x , NOEC, LOEC) a névleges koncentráció alapján is ki lehet fejezni. Ha visszanyerés a névleges koncentráció több mint ± 20 %-ával eltér a névleges koncentrációtól, a hatáskonzentrációkat (EC_x , NOEC, LOEC) az expozíció elején mért kezdeti koncentrációkra kell alapozni, pl. figyelembe véve a vizsgált vegyi anyag tömegegyensúlyát a vizsgálati rendszerben (lásd a 30. pontot). Ezekben az esetekben további információt lehet szerezni a törzs- és/vagy alkalmazási oldatok elemzése alapján annak megerősítése érdekében, hogy a vizsgált üledékeket megfelelően készítették el.

EC_x

63. A 60. pontban leírt paraméterekhez tartozó EC_x -értékeket megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull-függvény, vágott Spearman-Kärber módszer vagy egyszerű interpoláció). A statisztikai értékeléshez iránymutatás a (15) és (50) szakirodalmi hivatkozásban található. Az EC_x -értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezeléskénti átlagokat (\bar{X}) regressziós elemzésnek kell alávetni.

NOEC/LOEC

64. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni. Általában a vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlítva mutatott káros hatásait egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal vizsgálják ki ($p \leq 0,05$). A példákat lásd a következő pontokban. A megfelelő statisztikai módszerek kiválasztására vonatkozó iránymutatást a (15) és (50) irodalom tartalmazza.
65. Az adatok normál eloszlását például a Kolmogorov–Szmirnov-féle illeszkedéspróbával, a tartomány-szórás arány próbával (R/S-próba), vagy a Shapiro–Wilk-féle próbával (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet vizsgálni. A Cochran-próbát, a Levene-próbát vagy a Bartlett-próbát (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet használni a szóráshomogenitás vizsgálatára. Ha a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, szórás homogenitás) teljesülnek, egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd ezt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Párunkénti összehasonlító vizsgálatokat (pl. Dunnett-féle t-próba), vagy lépéskénti trendvizsgálatokat (pl. Williams-próba) lehet használni annak kiszámítására, hogy vannak-e szignifikáns különbségek ($p \leq 0,05$) a kontrollok és a különféle vizsgálati elemek koncentrációi között. Ellenkező esetben nemparaméteres módszereket (pl. a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát) kell használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

66. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztek, és a parametrikus vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat (az összes féreg száma és a férgek száraz tömegében kifejezett élőanyag) a Student-féle próbával (t-próba) lehet értékelni. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann-Whitney-féle U-próba alkalmazható. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.
67. A kontrollok (kontroll és oldószer kontroll) közötti szignifikáns különbségek meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint kell vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontroll és az oldószer kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószer kontrollal kell összehasonlítani.

Az eredmények értelmezése

68. Amennyiben eltértek a vizsgálati módszertől és a vizsgált oldatok mért koncentrációi az analitikai módszer kimutatási határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell értelmezni. A vizsgálati módszertől való bármilyen eltérést fel kell jegyezni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

69. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

— *Vizsgált vegyi anyag:*

- kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.), beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét; a vizsgált vegyi anyag beszerzési forrása, az alkalmazott oldószerek azonosítása és koncentrációja,
- a vizsgálat megkezdése előtt beszerzett, a vizsgált vegyi anyag fizikai természetére és fizikai-kémiai tulajdonságaira vonatkozó rendelkezésre álló információk (pl. vízben való oldhatóság, gőznyomás, megoszlási hányados a talajban (vagy az üledékben, ha van ilyen), $\log K_{ow}$, stabilitás vízben, stb.);

— *A vizsgálathoz felhasznált faj:*

- tudományos név, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, tenyésztési körülmények, stb.

— *Vizsgálati körülmények:*

- alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. statikus, félstatikus vagy állandó áramlású);
- a vizsgálat kialakítása (pl. vizsgálati kamrák száma, anyaga és mérete, vízmennyiség edényenként, üledék tömege és térfogata edényenként (állandó áramlású vagy félstatikus eljárások: vízmennyiség helyettesítési ráta), vizsgálat előtti és alatti levegőztetés, ismétlések száma, férgék száma ismétlésenként az expozíció elején, kísérleti koncentrációk száma, kondicionálás hossza, kiegyenlítődesi és expozíciós időtartam, mintavétel gyakorisága);
- az üledék és a fedővíz mélysége,
- a vizsgált vegyi anyag előkezelésének, illetve addíciójának/alkalmazásának módszere;
- a névleges kísérleti koncentrációk, a kémiai vizsgálathoz történő mintavétel részletei, és az analitikai módszerek, amelyekkel a vizsgált vegyi anyag koncentrációit megmérték;
- az üledék jellemzői a 24–25. pontban leírtak szerint, bármely egyéb elvégzett mérés; a formulázott üledék elkészítése;
- a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterséges víz használata esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, és bármely egyéb elvégzett mérés) a vizsgálat megkezdése előtt;
- a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét;
- a fényerő és a megvilágítási időszak(ok);
- a biológiai paraméterek (pl. mintavétel, ellenőrzés, vizsgálati organizmusok tömegének mérése) és az összes abiotikus paraméter (pl. a víz és az üledék minőségi paraméterei) meghatározására alkalmazott módszerek;
- a kémiai elemzésre vett minták térfogata és/vagy tömege;
- a kémiai elemzésre vett minták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés részleteit, a tárolást, a szennyezési eljárásokat, az extrakciót és az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a vizsgált vegyi anyagra vonatkozóan, és a vizsgált tétel visszanyerését.

- *Eredmények:*
- vízminőség a vizsgálati edényekben (pH, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció, keménység, ammónia-koncentráció, és bármely egyéb elvégzett mérés);
 - összes szerves szén tartalom (TOC), a száraz és nedves tömeg aránya, az üledék pH-ja, és bármely egyéb elvégzett mérés;
 - férgek száma, és ha meghatározták, a teljes és nem teljes férgek száma az egyes vizsgálati kamrákban a vizsgálat végén;
 - a férgek száraz tömege az egyes vizsgálati kamrákban a vizsgálat végén, és amennyiben megmérték, a férgek egy részmintájának száraz tömege a vizsgálat kezdetén;
 - bármely megfigyelt rendellenes viselkedés, összehasonlítva a kontrollokkal (pl. üledék elkerülése, széklet-pelletek jelenléte vagy hiánya);
 - észlelt elhullás;
 - toxicitási végpontok (például EC_x, NOEC és/vagy LOEC) becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;
 - a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására használt analízisek eredményei,
 - az érvényességi kritériumoktól való bármely eltérés.
- *Az eredmények értékelése:*
- az eredmények megfelelése a 13. bekezdésben felsorolt érvényességi kritériumoknak,
 - az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

- (1) EC (2003). Technikai iránymutató dokumentum a Bizottság 93/67/EGK irányelve az új bejelentett anyagok kockázatértékeléséről, a Bizottság 1488/94/EK rendelete a létező anyagok kockázatértékeléséről és az Európai Parlament és a Tanács 98/8/EK irányelve a biocid termékek forgalomba hozataláról alátámasztására; I–IV. rész. Az EK Hivatalos Kiadó Hivatala (Európai Bizottság), Luxembourg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD), Párizs.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) E melléklet »Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett üledék használatával« című C.27. fejezete.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

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

- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22*.
- (37) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. *Toxicológiai vizsgálat halak egyedfejlődésének kezdeti szakaszán (FELS) OECD, Párizs*.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on »Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes«, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.

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

A statisztikai eljárásokkal kapcsolatos további irodalom:

- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) *Biometry*. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

A **kondicionálási időszakot** arra használják, hogy stabilizálják az üledék mikrobiális komponensét és eltávolítsák pl. az üledékkomponensekből származó ammóniát; az üledék vizsgált vegyí anyaggal történő szennyezése előtt zajlik. A fedővizet a kondicionálás után általában elöntik.

Az EC_x a vizsgált anyag azon koncentrációja az üledékben, amely X % (például 50 %) hatást gyakorol egy biológiai paraméterre a meghatározott expozíciós időszak alatt.

A **kiegyenlítődési szakaszt** arra használják, hogy lehetővé tegyék a vizsgált vegyí anyag eloszlását a szilárd fázis, a pórusvíz és a fedővíz között; az üledék vizsgált vegyí anyaggal történő szennyezése után és a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt kerül rá sor.

Expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amely alatt a vizsgálatához használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált vegyí anyag hatásának.

Formulázott üledék vagy kevert, mesterséges vagy szintetikus üledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): a vizsgált vegyí anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyí anyag egy jelentős toxikus hatása ($p \leq 0,05$). Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag jelentős hatást ($p \leq 0,05$), a meghatározott expozíciós időszak alatt.

Oktanól-víz megoszlási hányados (K_{ow} ; néha P_{ow}): a vegyí anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának aránya egyensúlyi állapotban; a vegyí anyag lipofilitását fejezi ki (e melléklet A.24. fejezete). A K_{ow} -t vagy logaritmusát ($\log K_{ow}$) a vegyí anyag vízi szerkezetekben való felhalmozódási képességének kifejezésére használják.

Szerves szén-víz megoszlási hányados (K_{oc}): a vegyí anyag üledék szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának hányadosa egyensúlyi állapotban.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledéket befedő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett üledék: a vizsgált vegyí anyaggal szennyezett üledék.

Vizsgált vegyí anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

Az ajánlott mesterséges víz összetétele

(e melléklet C.1. fejezetéből átvéve (1))

a) *Kalcium-klorid oldat*Oldjon fel 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzelb) *Magnézium-klorid oldat*Oldjon fel 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzelc) *Nátrium-karbonát oldat*Oldjon fel 2,59 g NaHCO_3 -ot ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzeld) *Kálium-klorid oldat*Oldjon fel 0,23 g KCl -ot ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzel

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A desztillált vagy ionmentesített víz vezetőképessége nem haladhatja meg a $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ értéket.

Az a) és d) oldatból 25-25 ml-t összekevernek, és a térfogatot feltöltik 1 literre ionmentesített vízzel. A kalcium- és magnézium-ionok összege ezekben az oldatokban 2,5 mmol/l.

A Ca:Mg ionok aránya 4: 1, Na:K ionok aránya 10: 1. Ennek az oldatnak a $K_{\text{S}4,3}$ savkapacitása 0,8 mmol/l.

A hígítóvizet az oxigén telítettség eléréséig szellőztesse, majd felhasználás előtt körülbelül két napig, további levegőztetés nélkül tárolja.

HIVATKOZÁS

(1) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.

3. függelék

Az elfogadható minőségű hígítóvíz fizikai-kémiai tulajdonságai

Összetevő	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 µg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

(az OECD (1992) (1) kiadványból átvéve)

Hivatkozás

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Toxikológiai vizsgálat halak egyedfejlődésének kezdeti szakaszán (FELS) OECD, Párizs.

4. függelék

Ajánlott mesterséges üledék – iránymutatás az előállításához és tárolásához

Üledékösszetevők

Összetevő	Jellemzők	üledék száraz tömeg % -a
Tőzeg	Tőzegmoha tőzeg, lebomlás foka: »közepes«, levegőszáraz, látható növényi maradványok nincsenek, finomra őrölt (szemcseméret $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Kvarchomok	Szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban legyen	= 75 – 76
Kaolinit agyag	Kaolinittartalom ≥ 30 %	20 ± 1
Táplálékforrás	pl. Urtica-por (Folia urticae), Urtica dioica levelek (nagy csalán), finomra őrölt (szemcseméret $\leq 0,5$ mm); a gyógyszer-tári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra; a száraz üledéken felül	0,4–0,5 %
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	$2 \pm 0,5$
Kalcium-karbonát	CaCO_3 , porított, kémiaailag tiszta, a száraz üledéken felül	0,05 – 1
Ionmentesített víz	Vezetőképesség ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, a száraz üledéken felül	30 – 50

Megjegyzés: Ha megemelkedett ammónia-koncentrációk várhatók (pl. ha a vizsgált vegyi anyagról ismert, hogy gátolja a nitrifikációt), hasznos lehet a nitrogéngazdag Urtica-por 50 %-át cellulózzal helyettesíteni (pl. α -cellulóz por, kémiaailag tiszta, $\leq 0,5$ mm-es szemcseméret, (1) (2)).

Előkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őrlik. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítenek a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját CaCO_3 hozzáadásával $5,5 \pm 0,5$ értékre kell beállítani. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionálják a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak $6,0 \pm 0,5$ értéket kell mutatnia. Ezek után a tőzegszuszpenziót összekeverik a többi összetevővel (homok és kaolinagyag) és ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjanak. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételtelen megméri, és szükség esetén CaCO_3 hozzáadásával 6,5–7,5 értékre állítják be. Ha azonban ammónia képződése várható, akkor hasznos lehet az üledék pH-ját 7,0 alatt tartani (pl. 6,0–6,5 között). Az üledékből vett minta alapján meghatározzák a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ha ammónia képződése várható, a formulázott üledéket hét napig kondicionálni lehet ugyanolyan körülmények között, amelyek az ezt követő vizsgálat tekintetében érvényesek (pl. 1: 4 üledék-víz arány,

az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal) a vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezés előtt, azaz fel kell önteni vízzel, amelyet levegőztetni kell. A kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Ezt követően a szennyezett kvarchomokot minden kezelési szint esetében összekeverik az üledékkal, az üledéket szétosztják a párhuzamos kezelt edények között, és felöntik a vizsgálati vízzel. Az edényeket ezután ugyanolyan feltételek mellett inkubálják, mint amelyek a rákövetkező vizsgálat során érvényesülnek. Itt kezdődik a kiegyenlítőidőszak. A fedővizet levegőztetni kell.

A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. Az elején össze lehet keverni a tözogszuszpenzióval (lásd fent). A táplálékforrás túlzott lebomlása a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt (pl. hosszú kiegyenlítőidőszak esetén) elkerülhető azáltal, ha a táplálék hozzáadása és az expozíció kezdete közötti időszak a lehető legrövidebb. Annak érdekében, hogy a táplálékot a vizsgált vegyi anyag biztosan beszennyezze, a táplálékforrást az üledéssel azon a napon kell összekeverni, amikor az üledéket a vizsgált vegyi anyaggal beszennyezik.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az elkészített, vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledéket azonnal fel kell használni a vizsgálatban. A szennyezett üledékmintákat az adott vizsgált vegyi anyag esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

HIVATKOZÁSOK

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

5. függelék

A *lumbriculus variegatus* tenyésztési módszerei

A *Lumbriculidae* család, *Oligochaeta* alosztályába tartozó *Lumbriculus variegatus* (Müller) édesvízi üledéklakó faj és széles körben használják ökotoxikológiai vizsgálatokban. Laboratóriumi körülmények között könnyen tenyészthető. A tenyésztési módszereket a következőkben vázoljuk.

Tenyésztési módszerek

A *Lumbriculus variegatus* tenyésztésének feltételeit részletes ismertetik Phipps és munkatársai (1993) (1), Brunson és munkatársai (1998) (2), az ASTM (2000) (3) és a US EPA (2000) (4). Az alábbiakban e feltételek rövid összefoglalása található. Az *L. variegatus* legnagyobb előnye a gyors szaporodás, ami gyorsan növekvő élőanyagtömeget eredményez a laboratóriumban tenyésztett populációkban (pl. (1), (3), (4), (5)).

A férgeket nagy akváriumokban (57–80 l), 23 °C-on, 16 óra fényes és 8 óra sötét megvilágítási időszak mellett (100–1 000 lx) lehet tenyészteni, naponta cserélt természetes víz felhasználásával (45–50 l akváriumonként). A szubsztrátumot úgy állítjuk elő, hogy fehérítetlen barna papírtörlet csíkokra vágunk, amelyeket azután tenyésztővízzel néhány másodpercig összekeverünk. Ez kis papírdarabokból álló szubsztrátumot eredményez. Ez a szubsztrátum azután közvetlenül felhasználható a *Lumbriculus* tenyésztőakváriumokban a tartály aljának befedésére, vagy ionmentesített vízben lefagyasztva későbbi felhasználásig tárolható. A tartályban újonnan elhelyezett szubsztrátum általában körülbelül két hónapig tart.

Minden féregtenyészetet 500–1 000 féreggel indítunk, amelyeket heti 3 alkalommal 6 g indító pisztrángeledelt tartalmazó 10 ml szuszpenzióval etetünk, vízcserés vagy állandó áramlású rendszerben. A statikus vagy félstatikus rendszerben nevelt tenyészeteket ritkábban etetjük a baktériumok és gombák szaporodásának megelőzésére.

Ilyen körülmények között a tenyészetben található az egyedek száma általában körülbelül 10–14 naponta megduplázódik.

A *Lumbriculus variegatus* ehelyett tenyészthető a mesterséges üledékhez használttal megegyező (1–2 cm-es mélységű) kvarchomok rétegből és mesterséges vízből álló rendszerben is. Tenyésztőedényként 12–20 cm-es magasságú üveg- vagy rozsdamentes acél tartályok használhatók. A fedővizet enyhén levegőztetni kell (pl. két buborék másodpercenként) egy kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett elhelyezett Pasteur-pipettán keresztül. Hogy elkerüljük pl. az ammónia felhalmozódását, a fedővizet állandó áramlású rendszer használatával vagy legalább hetente egyszer manuálisan kell cserélni. A kevéssertéjűeket szobahőmérsékleten lehet tartani 16 óra fényes (100–1 000 lx fényerő) és 8 óra sötét megvilágítási időszakkal. A félstatikus tenyészetekben (vízcseré hetente egyszer) a férgeket hetente kétszer TetraMinnal etetjük (pl. 0,6–0,8 mg/cm² üledékfelület), amelyet milliterenként 50 mg TetraMint tartalmazó ionmentesített vízben szuszpenzióban lehet adagolni.

A *Lumbriculus variegatus* egyedeket úgy lehet eltávolítani a tenyészetekből, hogy pl. egy finom hálóval a szubsztrátumot vagy pedig egy tűzcsiszolt, széles szájú (kb. 5 mm átmérőjű) üvegpipettával az organizmusokat helyezzük át egy külön főzőpohárba. Ha szubsztrátumot is áthelyezünk a főzőpohárba, a férgeket és a szubsztrátumot tartalmazó főzőpoharat egy éjszaka át állandó áramlású rendszerfeltételek között tartjuk, amellyel a szubsztrátum eltűnik a főzőpohárból, míg a férgek az edény alján maradnak. Ezeket azután áttehetjük újonnan előkészített tenyésztőtartályokba, vagy a (3) és (4) szakirodalmi hivatkozásban, illetve a következőkben vázoltak szerint tovább vizsgálhatjuk őket.

Kritikus kérdés a *L. variegatus* üledékvizsgálatokban történő használata során a faj szaporodási módja (architomia vagy morfallaxis, pl. (6)). Ez a fajta ivartalan szaporodás két fragmentet eredményez, amelyek a fej- és a farokrész regenerálódásáig nem táplálkoznak (pl. (7), (8)). Ez azt jelenti, hogy a *L. variegatus* fajban a szennyezett üledék elfogyasztása útján történő expozíció nem folyamatos.

Ezért szinkronizálást kell végezni az ellenőrizetlen reprodukció és regeneráció, illetve a vizsgálati eredmények ebből következő nagyfokú változékonyságának minimalizálása érdekében. Ilyen mértékű változékonyság akkor fordulhat elő, ha egyes egyedek, amelyek fragmentálódtak, egy bizonyos ideig nem táplálkoznak, és ezért kevésbé vannak kitéve a vizsgált vegyi anyagnak, mint más egyedek, amelyek nem fragmentálódnak a vizsgálat alatt (9), (10), (11). 10 és 14 nappal az expozíció megkezdése előtt a férgeket mesterségesen fragmentálni kell (szinkronizálás). A szinkronizáláshoz lehetőleg olyan nagy (felöltt) férgeket kell kiválasztani, amelyek nem mutatják közelmúltbeli morfallaxis jeleit. Ezeket a férgeket egy csepp tenyésztővízben tárgylemezre helyezzük, és egy szikével kettévágjuk a test középső régiójában. Ügyelni kell arra, hogy a posterior végek hasonló méretűek legyenek. A posterior végeket ezután az expozíció kezdetéig hagyni kell új fejet növesztetni egy tenyésztőedényben, amely ugyanazt a szubsztrátumot

tartalmazza, mint amelyet a tenyészetben használtunk, valamint mesterséges vizet. Az új fej regenerációját az jelzi, ha a szinkronizált férgek beássák magukat a szubsztrátumba (a regenerált fej megjelenése egy reprezentatív rész minta binokuláris mikroszkóp alatt végzett ellenőrzésével is megerősíthető). A vizsgálati szervezetek ezután várhatóan hasonló fiziológiai állapotban lesznek. Ez azt jelenti, hogy ha morfallaxis útján történő szaporodás következik be a szinkronizált férgekben a vizsgálat alatt, akkor gyakorlatilag az összes állat várhatóan ugyanolyan mértékben lesz kitéve a szennyezett üledéknek. A szinkronizált férgeket egyszer kell megetetni, amikor a férgek elkezdik beásni magukat a szubsztrátumba, vagy 7 nappal a kettémetszés után. Az etetési rendnek összehasonlíthatónak kell lennie a rendes tenyészetekével, és tanácsos lehet a szinkronizált férgeket ugyanazzal a táplálékforrással etetni, mint amelyet majd a vizsgálathoz kell használni. A férgeket a vizsgálati hőmérsékleten, 20 ± 2 °C-on kell tartani. A regenerációs időszak után az enyhe mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutató ép, teljes férgeket kell felhasználni a vizsgálathoz. A sérüléseket vagy a férgek autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzcsiszolt pipettát vagy rozsdamentes acél fogászati szondát használva.

A *Lumbriculus variegatus* starterkultúrájának forrásai (az egyesült államokbeli címek a (4) irodalomból átvéve)

Európa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Németország

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Németország

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finnország

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommstr. 13
D-01062 Dresden
Németország

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Egyesült Államok

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

HIVATKOZÁSOK

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganization of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

6. függelék

A körvizsgálat eredményeinek összegzése
»Lumbriculus variegatuson végzett üledéktoxicitási vizsgálat«

1. táblázat

Az egyes körvizsgálati futtatások eredményei: A férgek átlagos száma a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban a vizsgálat végén; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

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

2. táblázat

Az egyes körvizsgálati futtatások eredményei: A férgek átlagos összes száraz tömege ismétlésenként a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban a vizsgálat végén; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

	férgek összes száraz tömege ismétlésenként (kontrollok)	SD	CV (%)	n	férgek összes száraz tömege ismétlésenként (oldószeres kontrollok)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
laboratóriumok közötti átlagérték	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

3. táblázat

A PCP toxicitása: A körvizsgálat végpontjainak összegzése; az EC₅₀, a NOEC és a LOEC laboratóriumok közötti átlagértéke; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

biológiai paraméter		Laboratóriumok közötti átlagérték (mg/kg)	min.	max.	Laboratóriumok közötti faktor	SD	CV (%)	mértani átlag (mg/kg)
a férgek összes száma	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
a férgek összes száraz tömege	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
mortalitás/túlélési arány	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
szaporodás (a férgek számának növekedése ismétlésenként)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
növekedés (az élőanyagtömeg növekedése ismétlésenként)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: legkisebb kimutatható különbség a kontroll értékekhez viszonyítva a hipotézisvizsgálat alatt; a statisztikai erő mértékeként használják

HIVATKOZÁS

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36. RAGADOZÓ ATKA (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA TALAJBAN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 226. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer célja a talajba kerülő vegyi anyagoknak a *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) talajlakó atkafaj szaporodási teljesítményére kifejtett hatásainak értékelése, ami lehetővé teszi a fajlagos populációnövekedési sebességre gyakorolt gátló hatás becslését (1,2). A szaporodási teljesítmény itt a fiatal egyedek számát jelenti a vizsgálati időszak végén. A *H. aculeifer* egy további táplálkozási szintet képvisel azokhoz a fajokhoz viszonyítva, amelyek tekintetében a vizsgálati módszerek már rendelkezésre állnak. E vizsgálati módszer céljaira a szaporodási ciklus különböző szakaszainak hátrányos megkülönböztetése és számszerűsítése nélküli szaporodási vizsgálatot tekintik megfelelőnek. A talajon keresztüli expozíciótól eltérő expozíciós forgatókönyv szerint működő vegyi anyagok esetében más megközelítések lehetnek megfelelőek (3).
2. A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* fajt a talajfauna, és különösen a ragadozó atkák fontos képviselőjének tekintik. Világszerte elterjedt (5), könnyű gyűjteni és laboratóriumban tenyészteni. A *H. aculeifer* biológiájának összefoglalója a 7. függelékben található. Az atkafaj ökológiájára és az ökotoxikológiai vizsgálatokban való használatára vonatkozó háttérinformációk rendelkezésre állnak (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Kifejlett nőtény egyedeket tesznek ki a vizsgált vegyi anyag talajba kevert koncentrációsorozatának. A vizsgálatot ismétlésenként 10 kifejlett nőtény egyeddel kezdik meg. A hímek nem vesznek részt a vizsgálatban, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a nőtények azonnal vagy röviddel a deutonimfa szakaszból való kikelés után párosodnak, ha hímek vannak jelen. Ezen kívül a hímek bevonása meghosszabbítaná a vizsgálatot oly módon, hogy az életkori szakaszok hátrányos megkülönböztetése válna szükségessé. Így a párzás önmagában nem része a vizsgálatnak. A nőtényeket 28–35 nappal azután vonják be a vizsgálatba, hogy peterakás megkezdődött a szinkronizálás során (lásd a 4. függelék), mivel a nőtényeket ekkor már úgy lehet tekinteni, hogy párosodtak és túljutottak a peterakás előtti szakaszon. 20 °C hőmérsékleten a vizsgálat a nőtények bevonása (0. nap) utáni 14. napon ér véget, ami lehetővé teszi az első kontroll utódok számára, hogy elérjék a deutonimfa szakaszt (lásd a 4. függelék). A fő mért változóhoz a vizsgálati edényenkénti fiatal egyedek számát és emellett a túlélő nőtények számát határozzák meg. A vizsgált vegyi anyagnak kitett atkák szaporodási teljesítményét összehasonlítják a kontrollal, hogy a vizsgálati elrendezéstől függően (lásd a 29. pontot) meghatározzák az EC_x (például EC₁₀, EC₅₀) értéket vagy az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) (a definíciókat lásd az 1. függelékben). A vizsgálati ütemtervről a 8. függelék ad áttekintést.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. A vizsgált vegyi anyag vízben való oldhatósága, log K_{ow} értéke, talaj-víz megoszlási hányadosa és gőznyomása lehetőleg ismert legyen. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk, mint például a biotikus és abiotikus lebomlás aránya.
5. Ez a vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazás módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása meghaladja a 0,0133 Pa értéket 25 °C-on.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYSÉGE

6. A kezeletlen kontrolloknek a következő kritériumoknak kell megfelelniük a vizsgálati eredmény érvényességéhez:
 - A felnőtt nőtények átlagos mortalitása nem haladhatja meg a 20 %-ot a vizsgálat végén;
 - A fiatalok átlagos száma ismétlésenként (10 bevont felnőtt nőténnyel) legalább 50 legyen a vizsgálat végén;
 - Az ismétlésenkénti fiatal atkák számának variációs együtthatója nem haladhatja meg a 30 %-ot a meghatározó vizsgálat végén.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. A referencia-vegyianyag EC_x és/vagy NOEC értékét meg kell határozni a megfelelő laboratóriumi vizsgálati körülmények garantálása érdekében, illetve annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz az idő múlásával nem változott. A dimetoát (CAS 60-51-5) megfelelő referencia-vegyianyag, amelyről kimutatták, hogy befolyásolja a populációméretet (4). A bórsavat (CAS 10043-35-3) alternatív referencia-vegyianyagként lehet használni. Ezzel a vegyi anyaggal kapcsolatban még kevesebb tapasztalatot szereztek. Két elrendezés lehetséges:
- A referencia-vegyianyag az egyes vizsgált vegyi anyagok toxicitásának meghatározásával párhuzamosan vizsgálható egyetlen koncentráción, amelyről egy előzetes dózis-válasz vizsgálatban bizonyítani kell, hogy az utódok > 50 %-os csökkenését eredményezi. Ebben az esetben az ismétlések száma legyen ugyanannyi, mint a kontrollcsoportban (lásd a 29. pontot).
 - Alternatív megoldásként a referencia-vegyianyagot évente 1–2 alkalommal vizsgálják egy dózis-válasz vizsgálatban. A választott elrendezéstől függően a koncentrációk és ismétlések száma, valamint az osztásköz különbözik (lásd a 29. pontot), de el kell érni a 10–90 %-os hatást (1,8-es osztásköz). A dimetoát EC₅₀-értékének a fiatal egyedek száma alapján a 3,0 és 7,0 mg/kg talaj (száraz tömeg) közötti tartományba kell esnie. A bórsavval eddig kapott eredmények alapján a fiatal egyedek számán alapuló EC₅₀-értéknek a 100 és 500 mg/kg talaj száraz tömeg közötti tartományba kell esnie.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és berendezések

8. Üvegből vagy más, kémiaileg semleges anyagból készített és szorosan illeszkedő fedéllel rendelkező 3–5 cm átmérőjű (talaj magassága $\geq 1,5$ cm) vizsgálati edényeket kell használni. A csavaros fedelek előnyösebbek; ebben az esetben az edényeket hetente kétszer lehet levegőztetni. Alternatív megoldásként a szubsztrátum és az atmoszféra közötti közvetlen gázcserét lehetővé tevő fedelek (pl. géz) is használhatók. Mivel a nedvességtartalmat a vizsgálat során elég magasan kell tartani, a vizsgálat során ellenőrizni kell az egyes vizsgálati edények tömegét, és szükség esetén fel kell őket tölteni vízzel. Ez különösen fontos lehet, ha nem áll rendelkezésre csavaros fedő. Ha nem átlátszó vizsgálati edényt használnak, a fedélnek olyan anyagból kell lennie, amely lehetővé teszi a fényhez való hozzáférést (pl. egy perforált átlátszó fedél útján), miközben megakadályozza az atkák elszökését. A vizsgálati edény mérete és típusa függ a kiemelési eljárástól (részletekért lásd az 5. függelékét). Ha hővel történő kiemelést végzünk közvetlenül a vizsgálati edényen, akkor megfelelő lyukbőségű alsó hálót lehet rátenni (a kiemeléssig le kell zárni), és a talajnak megfelelő mélységűnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a hőmérsékleti és nedvesség gradienst.
9. Standard laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:
- lehetőleg üvegedények csavaros fedéllel;
 - szárítószekrény;
 - sztereomikroszkóp;
 - kefék az atkák átvitelére
 - pH-mérő és megvilágításmérő;
 - megfelelő pontos mérlegek;
 - megfelelő hőmérséklet szabályozó eszközök;
 - megfelelő páratartalom szabályozó eszközök (nem szükségesek, ha az expozíciós edények fedéllel le vannak fedve);
 - szabályozott hőmérsékletű inkubátor vagy kis szoba;
 - eszközök a kiemeléshez (lásd az 5. függelékét) (13)
 - mennyezeti lámpa fény szabályozóval
 - gyújtóüvegek a kiemelt atkák számára.

A mesterséges talaj előkészítése

10. Ehhez a vizsgálathoz mesterséges talajt használnak. A mesterséges talaj a következő komponensekből áll (minden érték a száraz tömegben alapul):

- 5 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2 ± 1 mm-es részecskeméret elfogadható);
- 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);
- körülbelül 74 % levegőn szárított ipari homok (a szükséges CaCO_3 mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, amelyben a részecskék több mint 50 %-a 50–200 mikron méretű. A homok pontos mennyisége a CaCO_3 mennyiségétől függ (lásd alább), együtt 75 %-ot kell kiadniuk.
- < 1,0 % kalcium-karbonát (CaCO_3 , porított, analitikai tisztaságú) pH = $6,0 \pm 0,5$ eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ (lásd az 1. megjegyzést).

1. megjegyzés: A CaCO_3 szükséges mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ, és a talaj részminták pH-jának mérésével kell meghatározni közvetlenül a vizsgálat előtt.

2. megjegyzés: A mesterséges talaj tőzegtartalma eltér a talajban élő szervezetekkel végzett más vizsgálati módszerektől, ahol a legtöbb esetben 10 % tőzeget használnak (pl. (15)). Az EPPO (16) szerint azonban a tipikus mezőgazdasági talaj legfeljebb 5 % szerves anyagot tartalmaz, és a tőzegtartalom csökkentése így vissza-tükrözi a természetes talaj csökkent lehetőségeit a vizsgált vegyi anyag szerves szénen történő szorpciójára.

3. megjegyzés: Ha szükséges (például specifikus vizsgálatok céljából), a nem szennyezett területekről származó természetes talajok is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztéshez használt szubsztrátumként (3). Ha azonban természetes talajt alkalmaznak, akkor azt legalább a következő információkkal kell jellemezni: eredet (gyűjtőhely), pH, textúra (szemcseméret-eloszlás) és szervesanyag-tartalom. Ha rendelkezésre áll, a talaj talajosztályozás szerinti típusát és nevét is bele kell venni, és a talaj legyen mentes minden szennyeződéstől. Abban az esetben, a vizsgált vegyi anyag fém vagy szerves fém, a természetes talaj kationcserélő kapacitását (CEC) szintén meg kell határozni. Különös figyelmet kell fordítani arra, hogy megfeleljenek az érvényességi kritériumoknak, mivel a természetes talajokra vonatkozó háttérinformációk általában ritkák.

11. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverik (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A pH-érték meghatározása céljából a talajból és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid (CaCl_2) oldatból készült 1:5 arányú keveréket használnak (lásd a (14) irodalmat és a 3. függelékét). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb (lásd a 10. pontot), a pH-t megfelelő mennyiségű CaCO_3 hozzáadásával lehet beállítani. Ha a talaj túl lúgos, a 11. pontban leírt első három összetevőből álló – CaCO_3 nélkül készített – keverék hozzáadásával lehet beállítani.
12. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni. 2–7 nappal a vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesíteni kell annyi ionmentesített víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom (a WHC 40–60 %-a) körülbelül felét lehessen elérni. A nedvességtartalmat a maximális WHC 40–60 %-ára kell beállítani a vizsgált vegyi anyag oldatának és/vagy desztillált vagy deionizált víz hozzáadásával (lásd a 16–18. pontot). A talaj nedvességtartalmának durva ellenőrzésére alkalmas további elvégzendő módszer, ha enyhén megnyomja a talajt a kezében, és ha a nedvességtartalom megfelelő, kis vízcseppeknek kell megjelennie az ujjai között.
13. A talaj nedvességtartalmát a vizsgálat elején és végén az ISO 11465 (17) szabványnak megfelelően, a talaj pH-értékét pedig a 3. függelék vagy az ISO 10390 (14) szabvány szerint határozzák meg. Ezeket a méréseket további atka nélküli mintákon kell elvégezni, amelyeket a kontroll talajból és az egyes vizsgálati koncentrációk talajából kell venni. A talaj pH-értéke nem módosítható, ha savas vagy lúgos vegyi anyagot tesztelnek. A nedvességtartalmat az egész vizsgálat során ellenőrizni kell az edények időközönként történő mérlegelése útján (lásd a 20. és 24. pontot).

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

14. A vizsgálatban felhasznált faj a *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* (Canestrini, 1883). Egy szinkronizált csoportból vett felnőtt nőstény atkákra van szükség a vizsgálat indításához. Az atkákat kb. 7–14 nappal a felnőtté válás után kell bevezetni, azaz 28–35 nappal azután, hogy a peterakás megkezdődött a szinkronizálás során (lásd a 3. és 4. függelék). Az atkák forrását vagy szállítóját, valamint a laboratóriumi tenyészet fenntartásának módját jegyzőkönyvezni kell. Ha a laboratóriumi tenyészetet tartanak fenn, javasolt legalább évente egyszer beazonosítani a fajt. Az azonosító lapot a 6. függelék tartalmazza.

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

15. A vizsgált vegyi anyagot be kell keverni az talajba. A talajnak a vizsgált vegyi anyaggal való kezelését elősegítő szerves oldószerek kiválasztásakor az atkákra gyakorolt csekély toxicitásból kell kiindulni, és a vizsgálati elrendezésnek megfelelő oldószerkontrollt is tartalmaznia kell (lásd a 29. pontot).

Vízben oldódó vegyi anyagok

16. A vizsgált vegyi anyagból ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely egy vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Javasolt a kívánt nedvességtartalom (azaz a maximum WHC 40–60 %-a) eléréséhez szükséges mennyiségű vizet használni (lásd a 12. pontot). A vizsgált vegyi anyag mindegyik oldatát alaposan össze kell keverni egy tétel előnedvesített talajjal a vizsgálati edénybe történő behelyezés előtt.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

17. Vízen oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldódó vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani a megfelelő hordozó (például aceton) lehető legkisebb mennyiségében. Csak illékony oldószereket szabad használni. Amikor ilyen hordozókat használnak, minden vizsgált koncentrációnak és a kontrollnak is a hordozó azonos minimális mennyiségét kell tartalmaznia. A hordozót rápermetezik vagy összekeverik kis mennyiségű (például 10 g) finom kvarchomokkal. A szubsztrátum teljes homoktartalmát korrigálni kell ezzel a mennyiséggel. A hordozót elszívó fülkében legalább egy órán keresztül történő párologtatással eltávolítják. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadják az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverik megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapják. A végtermékként kapott keveréket töltsé be a vizsgálati edényekbe. Vegye figyelembe, hogy egyes oldószerek toxikus lehetnek az atkákra. Ezért ajánlott egy hordozó nélküli kiegészítő vizes kontrollt használni, ha az oldószer atkákkal szembeni toxicitása nem ismert. Ha megfelelően bizonyított, hogy az oldószerek (az alkalmazandó koncentrációkban) nincs hatása, a vizes kontrollt el lehet hagyni.

Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok

18. Vízen és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,5 g finomra őrölt kvarchomokot (például 10 g finom kvarchomokot négy ismétléshez) kevernek össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A szubsztrátum teljes homoktartalmát korrigálni kell ezzel a mennyiséggel. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadják az előnedvesített talajhoz, és megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadása után alaposan elkeverik úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat eredményezze. A végtermékként kapott keveréket elosztják a vizsgálati edények között. Az eljárást megismétlik minden egyes vizsgált koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítenek.

AZ ELJÁRÁS

Vizsgálati csoportok és kontrollok

19. Minden kontroll és kezelt edény esetében tíz felnőtt nőstény ajánlott 20 g száraz tömegű mesterséges talajban. A vizsgált organizmusokat a végső vizsgálati szubsztrátum előállítását követően két órán belül hozzá kell adni (azaz a vizsgált vegyi anyag bevétele után). Meghatározott esetekben (pl. ha az öregedés meghatározó tényezőnek tekinthető) a végső vizsgálati szubsztrátum elkészítése és az atkák hozzáadása közötti idő meghosszabbítható (az ilyen öregedésre vonatkozó információkat lásd a (18) szakirodalmi hivatkozásban). Ilyen esetekben azonban tudományos indoklást kell adni.

20. Az atkák talajhoz való hozzáadása után az atkák táplálékot kapnak, és meg kell mérni az egyes edények kezdeti tömegét, amelyet referenciaként kell használni talaj nedvességtartalmának a 24. pontban leírtak szerinti ellenőrzéséhez az egész vizsgálat során. A vizsgálati edényeket ezután a 8. pontban leírtak szerint le kell fedni és elhelyezni a vizsgálati kamrában.
21. Megfelelő kontrollt készítenek a vizsgált vegyi anyag alkalmazásának 15–24. pontban leírt minden módszeréhez. A korábban leírt vonatkozó eljárásokat követik a kontrollok elkészítése során is, kivéve, hogy a vizsgált vegyi anyagot nem adják hozzá. Így adott esetben a kontrollokban a kezelésekkal megegyező koncentrációban/mennyiségben szerves oldószereket, kvarchomokot vagy más hordozókat alkalmaznak. Ha oldószert vagy egyéb hordozót használnak a vizsgált vegyi anyag hozzáadásához, további kontrollt kell készíteni, amely nem tartalmazza a hordozót és a vizsgált vegyi anyagot, és amelyet meg kell vizsgálni, ha az oldószer toxicitása nem ismert (lásd a 17. pontot).

Vizsgálati körülmények

22. A vizsgálati hőmérsékletnek 20 ± 2 °C-nak kell lennie. Hőmérséklet legalább naponta fel kell jegyezni, és szükség esetén be kell állítani. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végzik (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények környezetében. Az összehasonlíthatóság érdekében ezek a feltételek megegyeznek az egyéb talaj ökotoxikológiai vizsgálatok feltételeivel (pl. (15)).
23. Ha csavaros fedelet használnak, a gázcserét a vizsgálati edények legalább hetente kétszer történő levegőztetésével kell biztosítani. Ha gézfedelet használnak, különös figyelmet kell fordítani a talaj nedvességtartalmának fenntartására (lásd a 8. és a 24. pontot).
24. A talajszubsztrátum víztartalmát a vizsgálati edényekben az egész vizsgálat alatt úgy tartják fenn, hogy rendszeres időközönként újra lemérik a vizsgálati edényeket (pl. hetente egyszer), és pótolják a hiányzó vizet. A veszteségeket szükség esetén ionmentesített vízzel pótolják. A nedvességtartalom a vizsgálat során nem térhet el több mint 10 %-kal a kezdeti értéktől.

Táplálás

25. A sajt atkákról (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) kimutatták, hogy alkalmas táplálékforrások. A kis ugróvillások (pl. fiatal *Folsomia candida* Willem, 1902 vagy *Onychiurus fimatus* (19), (20), televényférgek (pl. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) vagy fonalférgek (pl. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) is alkalmasak lehetnek (21). Javasolt a vizsgálatban történő használat előtt ellenőrizni a táplálékot. A táplálék típusának és mennyiségének megfelelő számú fiatal egyednek kell biztosítani az érvényességi kritériumok teljesítése érdekében (6. pont). A zsákmányállatok kiválasztása során a vizsgált vegyi anyag hatásmódját is figyelembe kell venni (pl. az atkaölő szerek mérgezőek lehetnek a táplálékatkákra is, lásd a 26. pontot).
26. A táplálékot *ad libitum* kell biztosítani (azaz minden alkalommal egy kis mennyiséget (spatulahegynyt)). E célból alacsony szívóerejű szippantó (az ugróvillásokkal végzett vizsgálatban javasoltak szerint) vagy finom ecset is használható. Általában elegendő a vizsgálat elején, majd hetente két-három alkalommal táplálékot adni. Amikor a vizsgált vegyi anyag toxikusnak tűnik a zsákmányállatokra, mérlegelni kell a táplálási sebesség növelését és/vagy alternatív táplálékforrás használatát.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

27. A vizsgált vegyi anyag toxicitásának előzetes ismerete (pl. dózisbehatóró vizsgálatokból) segít a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában. Szükség esetén dózisbehatóró vizsgálatot kell végezni a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával a 0,1–1 000 mg/kg száraz talaj tartományban, a kezelések és a kontroll esetében is legalább egy ismétlést alkalmazva. A dózisbehatóró vizsgálat időtartama 14 nap, amely után meghatározzák a kifejlett atkák mortalitását és a fiatalok számát. A meghatározó vizsgálat koncentrációtartományát lehetőleg úgy kell megválasztani, hogy az magában foglalja azokat a koncentrációkat, amelyek hatással vannak a fiatal egyedek számára, de az anyai generáció túlélési arányát nem befolyásolják. Ez azonban nem lehetséges olyan vegyi anyagok esetében, amelyek csaknem megegyező koncentrációban okoznak letális vagy szubletális hatásokat. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált vegyi anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A vizsgálati szervezeteket befolyásoló legalacsonyabb koncentrációnál jóval alacsonyabb vagy a legnagyobb vizsgált koncentrációt meghaladó extrapolációt csak kivételes esetekben szabad végezni, és erre részletes magyarázatot kell adni a jelentésben.

Kísérleti elrendezés

Dózis-válasz vizsgálatok

28. Egy másik körvizsgálatából (televényféreg reprodukciós vizsgálat) származó ajánlások alapján három vizsgálati elrendezést javasolnak (22). Az elrendezések általános alkalmasságát a *H. aculeifer* érvényességi vizsgálatának eredménye is megerősítette.
29. A koncentrációk meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:
 - Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) meghatározásához tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább két ismétlést és hat kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.
 - A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 2,0-nél nagyobb.
 - Egy kombinált módszer lehetővé teszi mint a NOEC, mind az EC_x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

Határérték-vizsgálat

30. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg talaj száraz tömeg), a meghatározó reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg talaj száraz tömeg vizsgálati koncentráció használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget nyújt annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC vagy EC_{10} magasabb a határérték-koncentrációnál, miközben minimálisra csökkenthető a vizsgálatnál használt atkák száma. Nyolc ismétlést kell használni mind a kezelt talaj, mind a kontroll esetében.

A teszt időtartama és a mérések

31. A kontroll és a kezelt edényekben lévő atkák viselkedése és morfológiája között megfigyelt különbségeket fel kell jegyezni.
32. A 14. napon a túlélő atkákat kiemeljük a talajból hővel/fénnyel történő extrakcióval vagy más megfelelő módszerrel (lásd az 5. függelék). A fiatal egyedeket (azaz a lárvákat, protonimfákat és deutonimfákat) és felnőtt atkákat külön-külön számolják meg. Az ebben az időben fel nem lelhető atkákat elhullottnak kell tekinteni, feltételezve, hogy az ilyen atkák az értékelés előtt elpusztultak és lebomlottak. A kiemelés határfokát évente egyszer vagy kétszer hitelesíteni kell ismert számú felnőtt és fiatal egyed tartalmazó kontrollokban. A hatékonyságnak átlagban 90 % felett kell lennie az összes fejlődési szakasz tekintetében kombináltan (lásd az 5. függelék). A felnőtt és fiatal egyedek számát nem korrigálják a hatékonysággal.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

33. A vizsgálati eredmények elemzésére használható statisztikai módszerekre vonatkozó információ a 36–41. pontban található. Ezen kívül az »Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató« című 54. számú OECD-dokumentumot (31) kell tanulmányozni.
34. A vizsgálat fő végpontja a reprodukciós teljesítmény, ami itt az előállított fiatal egyedek száma ismétlésenként (10 bevont felnőtt nősténnyel). A statisztikai elemzés megköveteli a reprodukciós teljesítmény számtani középértékének (X) és varianciájának (s^2) kiszámítását kezelésenként és kontrollonként. Az X és s^2 értéket az ANOVA eljárásokhoz használják (mint például a Student-féle t -próba, a Dunnett-féle próba, vagy a Williams-féle próba), valamint a 95 %-os konfidenciaintervallumok kiszámításához.

Megjegyzés: Ez a fő végpont egyenértékű a fekunditással, amelyet úgy mérnek, hogy a vizsgálat során nemzett élő fiatal egyedek számát elosztják a vizsgálat kezdetekor bevont anyaállatok számával.

35. A túlélő nőtények száma a kezeletlen kontrollokban fontos érvényességi feltétel és dokumentálni kell. A dózisbehatároló vizsgálathoz hasonlóan minden más káros jelet is kell tüntetni a végleges jelentésben.

EC_x

36. A 34. pontban leírt paraméterre vonatkozó EC_x-értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os megbízhatósági határokat, megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull-függvény, vágott Spearman-Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). Az EC_x-értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC50 vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat (X) regressziós elemzésnek kell alávetni.

NOEC/LOEC

37. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az »Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató« című 54. számú OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni. Általában a vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlítva mutatott káros hatásait egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal vizsgálják meg ($p \leq 0,05$). A példákat lásd a következő pontokban.
38. Az adatok normál eloszlását például a Kolmogorov-Szmirnov illeszkedés próbával, a tartomány-szórás arány próbával (R/S próba), vagy a Shapiro-Wilk-próbával (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet vizsgálni. A Cochran-próbát, a Levene-próbát vagy a Bartlett-próbát (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet használni a szóráshomogenitás vizsgálatára. Ha a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, szórás homogenitás) teljesülnek, egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd ezt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Többszörös összehasonlítást (pl. Dunnett-féle t-próba), vagy lépésenkénti trendvizsgálatot (pl. Williams-féle próba monoton dózis-válasz összefüggés esetén) lehet használni annak kiszámítására, hogy vannak-e szignifikáns különbségek ($p \leq 0,05$) a kontroll és a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi között (az ajánlott próba kiválasztása az »Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató« című 54. számú OECD-dokumentum szerint történjen). Ellenkező esetben nemparaméteres módszereket (pl. a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere-Terpstra-féle trendpróbát) kell használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

39. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztek, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat a Student-féle próbával (t-próba) lehet értékelni. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann-Whitney-féle U-próba alkalmazható.
40. A kontrollok (kontroll és oldószer kontroll) közötti szignifikáns különbségek meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint kell vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontroll és az oldószer kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószer kontrollal kell összehasonlítani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

41. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következőket kell tartalmaznia:

— Vizsgált vegyi anyag

— a vizsgált vegyi anyag azonosítása, név, tételszám, CAS-szám, tisztaság;

— a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log K_{ow} , vízdoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag sorsára vonatkozó esetleges információk).

— A vizsgálathoz használt organizmusok

— a vizsgálati organizmusok azonosítása és szállítója, a tenyésztési körülmények leírása;

— a vizsgált szervezetek kortartománya.

- Vizsgálati körülmények
 - a kísérleti terv és eljárások leírása.
 - a vizsgálati talaj előkészítésének adatai; részletes specifikáció, ha természetes talaj használnak (eredet, történelem, szemcseméret-eloszlás, pH, szervesanyag-tartalom és – ha rendelkezésre áll – a talaj besorolása)
 - a talaj maximális víztartó képessége;
 - a vizsgált anyag talajba történő bejuttatására szolgáló technika bemutatása;
 - a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt kiegészítő vegyi anyagokra vonatkozó részletek;
 - a vizsgálati edények mérete és a vizsgálati talaj száraz tömege edényenként;
 - vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;
 - az etetési rend leírása, a a vizsgálatban használt eledel típusa és mennyisége, etetési dátumok;
 - a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat elején és alatt.(kontroll és kezelések)
 - a kiemelési eljárás részletes leírása és a kiemelés határfoka.
- Vizsgálati eredmények
 - az előállított fiatal egyedek száma az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;
 - az felnőtt nőstény egyedek száma és a felnőtt egyedek mortalitása (%) az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;
 - a nyilvánvaló tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;
 - a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;
 - összesítő statisztikák (ECx és/vagy NOEC), beleértve a 95 %-os megbízhatósági határokat és a számítási módszer leírását;
 - a koncentráció-válasz kapcsolat ábrázolása;
 - az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

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

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.
- (15) E melléklet C.8. fejezete: Földgilisztákra kifejtett toxicitás..
- (16) EPPO (2003): EPPO szabványok. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. A szárazanyag és a víztartalom meghatározása tömeg alapján – Gravimetriás módszer, No. 11465. ISO, Genf.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) E melléklet C.32. fejezete: Televényférgek szaporodásának vizsgálata.
- (23) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földgilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with »good genes« in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

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

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E vizsgálati módszerben a következő fogalom meghatározások alkalmazandók (ebben a vizsgálatban valamennyi hatáskoncentráció a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában van kifejezve):

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

NOEC (megfigyelhető hatást nem koncentráció) a vizsgált vegyi koncentráció, amelyben nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$) egy adott expozíciós időtartamon belül a kontrollal összehasonlítva.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC₅₀ az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

A talaj maximális víztartó képességének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének meghatározására szolgáló alábbi módszert találják megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található (Talajminőség. A szennyező anyagok hatása földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása (23)).

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas mintavételi eszköz (csigás cső stb.) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, töltsen meg vízzel, majd tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órán keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarcchomokból készített ágyra kell helyezni egy fedett edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% -ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

—

*3. függelék***A talaj pH-értékének meghatározása**

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 »Talajminőség. A pH meghatározása« szabványban található leíráson alapul (16).

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid (CaCl_2) oldattal. A szuszpenziót öt percig alaposan rázzák, majd legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megméri a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

4. függelék

A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Felnevelése, Táplálékatkák És A Tenyészet Szinkronizálása**A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* felnevelése:**

A tenyészetek gipsz/szénpor (9:1) keverékével töltött műanyag edényekben vagy üvegpalackokban tarthatók. A gipszet néhány csepp desztillált vagy ionmentesített víz hozzáadásával lehet nedvesen tartani, ha szükséges. A nevelési hőmérséklet optimálisan 20 ± 2 °C, a világos/sötét időszakok váltogatása nem releváns ennek a fajnak az esetében. A prédaállatok lehetnek *Tyrophagus putrescentiae* vagy *Caloglyphus* sp. atkák (a táplálékatkákkal óvatosan kell bánni, mert emberben allergiát okozhatnak), de a fonálféreg, televényféreg és ugróvillásak is alkalmasak prédaállatnak. A prédaállatok forrását fel kell jegyezni. A populáció kialakítása kezdődhet egyetlen nőténnyel is, mert a megtermékenyítetlen petékből hímek fejlődnek ki. A generációk nagyrészt átfedik egymást. A nőtények legalább 100 napig élhetnek, és élettartamuk során mintegy 100 petét rakhatnak le. A legnagyobb peterakási arányt 10–40 nap között éri el (a felnőtté válás után), ami $2,2$ pete nőstény⁻¹ nap⁻¹. A petéből kifejlett nőténnyé fejlődési idő kb. 20 nap 20 °C-on. Több tenyészetet is fenn kell tartani, már a vizsgálatot megelőzően.

A *Tyrophagus putrescentiae* felnevelése:

Az atkákat finom sörészű porral töltött üvegedényben tartják, amelyet egy KNO₃-oldattal töltött műanyag vödörbe tesznek, hogy elkerüljék az atkák szökését. A táplálékatkákat a por tetejére teszik. Ezt követően egy spatula segítségével gondosan összekeverik őket a porral (amelyet hetente kétszer ki kell cserélni).

A tenyészet szinkronizálása:

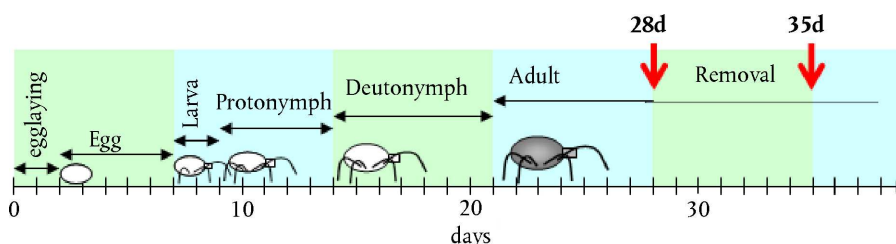
A vizsgálatban használandó példányoknak hasonló korúaknak kell lenniük (kb. a kifejlett állapot elérése után 7 nap). Ezt 20 °C tenyésztési hőmérsékleten a következőképpen lehet elérni:

Helyezze át a nőtényeket egy tiszta tenyésztőedénybe, és adjon nekik megfelelő mennyiségű táplálékot

- Hagyja a nőtényeket két-három napon át petéket rakni, majd távolítsa el a nőtényeket
- Az indulást követő 28. és 35. nap között vegye ki a felnőtt nőtényeket a vizsgálatához, és tegye a felnőtt nőtényeket tiszta tenyésztőedényekbe.

A felnőtt nőtényeket könnyen meg lehet különböztetni a hímektől és más fejlődési szakaszoktól nagyobb testméretük, duzzadt alakjuk és barna hátsó pajzsuk alapján (a hímek karcsúbbak és laposak); az éretlen egyedek fehérek vagy krémszínűek. Az atkák fejlődése megközelítőleg követi az alábbiakban leírt mintát 20 °C-on (ábra): Pete 5 nap, lárva 2 nap, protonimfa 5 nap, deutonimfa 7 nap, peterakás előtti időszak a nőtényeknél 2 nap. Ezt követően az atkák felnőttnek számítanak.

Ábra

A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* fejlődése 20 °C-on (eltávolítás = a vizsgálatban használt nőtények)

Az anyaállatok peterakásának megkezdését követő 28. és 35. nap között (azaz 7–14 nappal a felnőtté válás után) a felnőtt vizsgálati állatokat eltávolítjuk a szinkronizált tenyészetből és behelyezzük őket a vizsgálati edénybe. Ezzel biztosítható, hogy a vizsgálati állatok már átestek a peterakás előtti időszakon és párosodtak hím atkákkal, amelyek szintén jelen vannak a tenyésztőedényben. A laboratóriumi tenyészetekben végzett megfigyelések arra utalnak, hogy a nőtények azonnal vagy nem sokkal a felnőtté válás után párosodnak, ha hímek vannak jelen (Ruf, Vaninnen, személyes megfigyelés). A hétnapos időtartam azért megfelelő, mert megkönnyíti a vizsgálat beillesztését a laboratóriumi rutinba és pufferehető az atkák közötti egyéni fejlődésbeli variabilitás. A peterakást legalább ugyanakkora számú nőténnyel kell megkezdeni, mint amennyi végül is a vizsgálatához szükséges lesz (ha például 400 nőtény szükséges a vizsgálatához, akkor legalább 400 nőtényt kell hagyni petét rakni két-három napig). Legalább 1 200 petének kell a szinkronizált populáció kiindulási alapját képeznie (a nemek aránya körülbelül 0,5, a mortalitás körülbelül 0,2). A kannibalizmus elkerülése érdekében legfeljebb 20–30 peterakó nőtényt érdemes egy edényben tartani.

5. függelék

Kiemelési módszerek

Mikroízeltlábúak esetében a hővel való extrakció megfelelő módszer a példányok talajtól/szubsztrátumtól történő elválasztására (lásd az alábbi ábrát). A módszer az organizmusok aktivitásán alapul, így csak a mozgó példányok feljegyzésére lesz esély. A hőextrakció alapelve az, hogy fokozatosan lerontjuk a körülményeket az organizmusok számára a mintában, ezért azok elhagyják a szubsztrátumot, és belezuhannak a rögzítőfolyadékba (pl. etanol). A meghatározó szempontok az extrakció időtartama, illetve a jó, közepes és rossz körülmények gradiense az organizmusok számára. Az ökotoxikológiai vizsgálatok céljából végzett extrakció időtartamának a lehető legrövidebbnek kell lennie, mert a kiemelés során bekövetkező populációnövekedés meghamisítaná az eredményeket. Másrészt a minta hőmérséklete és páratartalma mindig abban a tartományban legyen, amely lehetővé teszi az atkák mozgását. A talajminta fűtése a szubsztrátum kiszáradásához vezet. Ha a kiszáradás túl gyors, néhány atka is kiszáradhat, még mielőtt sikerülne elmenekülnie.

Ezért a következő eljárás javasolt (24) (25):

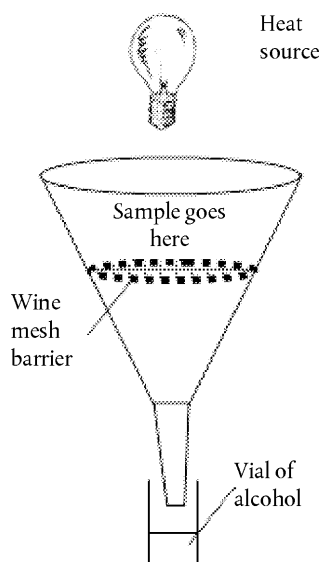
Készülékek: Tullgren-tölcsér vagy hasonló módszerek, mint például a McFadyen (fűtés felülről, a mintát egy tölcser fölé tesszük)

Fűtési rendszer: 25 °C-on 12 órán át, 35 °C-on 12 órán át, 45 °C-on 24 órán át (összesen 48 óra). A hőmérsékletet a szubsztrátumban kell mérni.

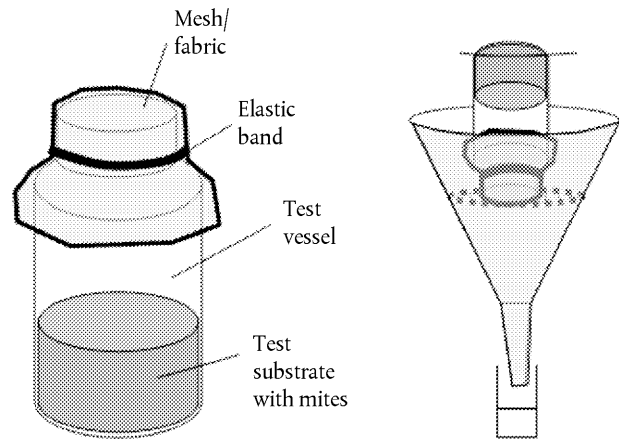
Rögzítőfolyadék: 70 %-os etanol

Részletek: Vegyünk egy, a vizsgálat során is használt üvegfiolát. Vegyük le a fedelét, és csavarjunk egy darab hálót vagy szövetet a nyílás köré. A szövetnek 1,0–1,5 mm lyukbőségűnek kell lennie. Rögzítsük az anyagot egy gumiszalaggal. Óvatosan fordítsuk az fiolát fejjel lefelé, és helyezzük az extrakciós készülékbe. A szövet megakadályozza, hogy a szubsztrátum befolyjon a rögzítőfolyadékba, de lehetővé teszi, hogy az atkák elhagyják a mintát. Miután az összes fiolát behelyeztük, indítsuk el a fűtési rendszert. 48 óra után fejezzük be az extrakciót. Vegyük ki rögzítőfiolákat, és számoljuk meg az atkákat egy preparálómikroszkóppal.

A választott módszer extrakciós hatékonyságát évente egyszer vagy kétszer bizonyítani kell a kezeletlen kontroll-szubsztrátumban tartott ismert számú fiatal és felnőtt atkát tartalmazó edények segítségével korábban végzett próbával. A hatékonyságnak átlagban ≥ 90 % mértékűnek kell lennie az összes fejlődési szakasz tekintetében kombináltan.

Tullgren-típusú extrakciós eszköz

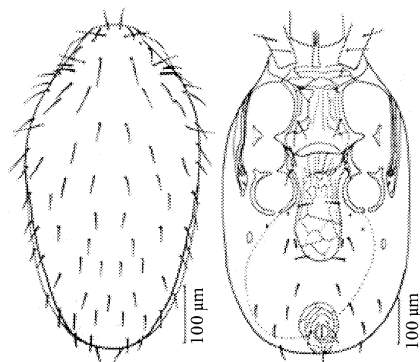
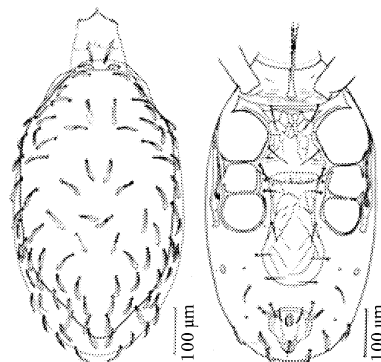
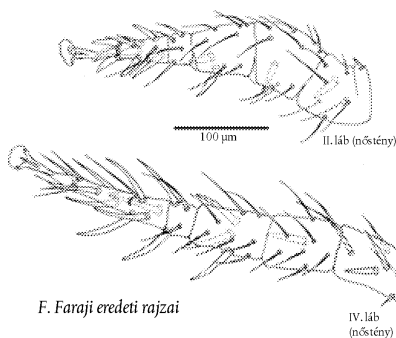
A vizsgálati fiola elkészítése a vizsgálat befejezése után, a kiemelés előtt



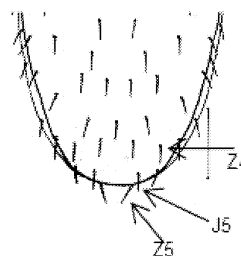
6. függelék

A *hypoaspis (geolaelaps) aculeifer* azonosítása

Alosztály/rend/alrend:	Család:	Nemzetség/alnemzetség/faj:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Szerző és dátum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 2007. január 23.	
Irodalomjegyzék:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.	
Meghatározó jellemzői:	Tectum lekerekített fogazott peremmel; hypostomális hornyok több mint 6 denticulusszal; a Z4 kaudális dorzális sörtéi nem túl hosszúak; setiform dorzális söрте; genitális pajzs normális, nem túlságosan megnagyobbodott és nem éri el az anális pajzsot; dorzális pajzs hátsó fele páratlan söрте nélkül; II. és IV. láb néhány vastag makrosörtével; Z5 dorzális söрте körülbelül kétszer hosszabb, mint J5; csáprágó rögzített íze 12–14 foggal és mozgatható íze 2 foggal; idiosoma 520–685 µm hosszú. A <i>Hypoaspis miles</i> fajt szintén használják a biológiai kontrollban, és össze lehet téveszteni a <i>H. aculeifer</i> fajjal. A fő különbség: A <i>H. miles</i> a <i>Cosmolaelaps</i> alnemzetségbe tartozik és késszerű dorzális sörtéi vannak, míg a <i>H. aculeifer</i> a <i>Geolaelaps</i> alnemzetségbe tartozik és setiform dorzális sörtéi vannak.	

*Hypoaspis aculeifer* (Hughes, 1976 alapján)*Hypoaspis miles* (Hughes, 1976 alapján)

F. Faraji eredeti rajzai

IV. láb
(nőstény)*Hypoaspis aculeifer*,
hátsó pajzs a fajra jellemző sörtékkel

7. függelék

Alapvető információk a *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* biológiájával kapcsolatban

A *Hypoaspis aculeifer* a Lealpidae családba, az Acari (atkák) rendbe, az Arachnida osztályba, az Arthropoda törzsbe tartozik. Mindenféle talajban megél és egyéb atkákkal, fonálférgekkel, televényférgekkel és ugróvillásokkal táplálkozik (26). Táplálékhiány esetében kannibalizmusra vált (27). A ragadozó atkák idiosomára és gnathosomára oszthatók fel. Hiányzik az idiosoma egyértelmű elkülönülése prosomára (fej) és opisthosomára (has). A gnathosoma (fejpajzs) tartalmazza a táplálkozásra szolgáló eszközöket, így a tapogatókat és a csáprágókat. A csáprágók háromfelé ágaznak, és különböző alakú fogakkal vannak felszerelve. A táplálkozás mellett a hímek a csáprágókat elsősorban a spermatorák nőtényekhez való átvitelére használják. A dorzális pajzs szinte teljesen lefedi az idiosomát. A nőtények idiosomájának nagy részét a reprodukív szervek foglalják el, amelyek különösen röviddel a peterakás előtt jól kivehetőek. Ventrálisan két pajzs található, a sternális és a genitális pajzs. Minden lábon sörték és tövisek vannak. A sörtéket az atkák horgonyként használják, amikor a talajban vagy annak felszínén mozognak. Az első pár lábat főként antennaként használják. A második pár lábat nem csak mozgásra, hanem a zsákmány megszerzésére is használják. A negyedik pár láb tövisei védelmiül szolgálhatnak, valamint »mozgató motorként« (28). A hímek 0,55–0,65 mm hosszúak, tömegük 10–15 µg. A nőtények 0,8–0,9 mm hosszúak, tömegük 50–60 µg (8) (28) (1. ábra).

1. ábra

A *H. aculeifer* nőténye, híme, protonimfája és lárvái

23 °C-on az atkák 16 nap után (nőtények), illetve 18 nap után (hímek) válnak nemileg éretté (6). A nőtények a solenostománál veszik át a spermiumokat, ahonnan azután átkerülnek a petefészekbe. A petefészekben a spermiumok beérnek és tárolódnak. A megtermékenyítésre csak a spermiumoknak a petefészekben történő érését követően kerül sor. A megtermékenyített vagy termékenyítetlen petéket a nőtények csomókban vagy külön-külön, lehetőleg hasadékokban vagy lyukakban helyezik el. A párosodott nőtények petéiből mindkét nembe tartozó fiatal egyedek kikelhetnek, míg a nem párosodott nőtényekéből csak hím utódok. A kifejlődés során az atkák négy fejlődési szakaszon (pete-lárva, lárva-protonimfa, protonimfa-deutonimfa, deutonomimfa-felnőtt) mennek át.

A pete tejfehér, átlátszó, elliptikus és körülbelül 0,37 mm hosszú, szilárd burokkal. A (8) szakirodalmi hivatkozás szerint a lárvák 0,42–0,45 mm méretűek. A lárváknak csak három pár lába van. A fejrégióban tapogatók és csápok találhatóak. A csápokat, amelyeken néhány néhány kis denticulus van, a petéből való kikelésre használják. Az első vedlés után (a kikelés után 1–2 napon belül) kialakulnak a protonimfák. Ezek is fehér színűek, a méretük 0,45–0,62 mm (8), és négy pár lábuk van. A csápokon a fogak teljesen jelen vannak. Ettől a stádiumtól kezdve az atkák táplálkozni kezdenek. Ebből a célból a chelicerákkal csápokkal áttörik a prédaállat kutikuláját, és a bélrendszeren kívüli emésztést szolgáló szekrétumot bocsátanak a prédaállatba. A táplálékmasszát azután az atka kiszippantja. A csápok arra is használhatók, hogy nagyobb részeket tépjenek ki a táplálékdarabokból (28). Egy további vedlést követően kialakulnak a deutonomimfák. Ezek 0,60–0,80 mm (8) méretűek és sárga, világosbarna színűek. Ettől a fázistól kezdve az atkákat nőtényekre és hímekre lehet osztani. Egy további vedlés után, mely idő alatt az állatok inaktívak és kifejlődik a barna pajzs (kb. 14 nap után), az atkák felnőttek (28) (29) (30). Az élettartamuk 48 és 100 nap között van 25 °C-on (27).

8. függelék

A hypoaspis-vizsgálat végrehajtása érdekében megteendő főbb intézkedések összegzése és ütemezése

Idő (nap) vizsgálat kezdete = 0. nap	Tevékenység / feladat
-35. naptól -28. napig	Helyezzük át a nőstényeket a törzstenyészetből tiszta edényekbe a szinkronizálás megkezdéséhez 2 nappal később: a nőstények eltávolítása hetente kétszer vagy háromszor: elegendő táplálék biztosítása
-5. nap (+/- 2)	Készítsünk mesterséges talajt
-4. nap (+/- 2)	Határozzuk meg a mesterséges talaj WHC-értékét Szárítsuk egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a minták tömegét és számítsuk ki a WHC-értéket
-4. nap (+/- 2)	Nedvesítsük elő a mesterséges talajt, hogy annak nedvességtartalma a WHC 20–30 %-a legyen
0. nap	Kezdjük el a vizsgálatot: adjuk hozzá a vizsgált vegyi anyagot a mesterséges talajhoz Helyezzünk 10 nőstényt minden ismétlésbe Mérjük meg minden ismétlés tömegét Állítsunk fel abiotikus kontrollokat a nedvességtartalom és a pH méréséhez, 2 ismétlést minden kezelés esetében Szárítsuk a nedvességkontrollokat egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a nedvességkontrollok tömegét Következő nap: mérjük meg a szárított abiotikus kontrollok pH-ját
3., 6., 9., 12. nap (kb.)	Adjunk minden ismétléshez megfelelő mennyiségű prédaállatot Mérjük meg az ismétlések tömegét, és pótoljuk az elpárolgott vizet
14. nap	Fejezzük be a vizsgálatot, alakítsuk ki az extrakciós rendszert minden ismétlés esetében, valamint állítsuk fel az extrakció hatásfokát mérő kontrollokat Szárítsuk a víztartalomkontrollokat egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a víztartalomkontrollok tömegét Következő nap: mérjük meg a szárított kontrollok pH-ját
16. nap	Fejezzük be a kiemelést
16. nap után	Jegyezzük fel a felnőtt és a fiatal egyedek számát a kivont anyagokban Számoljunk be az eredményekről a sablontáblázatokban Számoljunk be a vizsgálati eljárásról a vizsgálati protokoll lapokon

C.37. 21 NAPOS HALVIZSGÁLAT: AZ ÖSZTROGÉN- ÉS ANDROGÉNHATÁS, VALAMINT AZ AROMATÁZGÁTLÁS RÖVID TÁVÚ SZŰRŐVIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 230. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az endokrin rendszerre ható egyes vegyi anyagok halfajokban történő kimutatására alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy a vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségükben az endokrin rendszerrel való kölcsönhatásuk révén káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatók felülvizsgálatára, valamint a hormonháztartást esetlegesen zavaró anyagok kiszűrését és vizsgálatát célzó új vizsgálati iránymutatók kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított. E tevékenység egyik eleme a halfajok endokrin rendszerére ható vegyi anyagok kiszűrésére vonatkozó vizsgálati iránymutatók kidolgozása volt. A halakkal végzett 21 napos endokrin szűrővizsgálatot a kiválasztott vegyi anyagokkal végzett, laboratóriumok közötti vizsgálatokból álló alapos validálási programnak vetették alá, hogy bizonyítsák a vizsgálat alkalmasságát az ösztrogenhatású és aromatázgátló vegyi anyagok megbízható kimutatására (1, 2, 3, 4, 5) a három vizsgált halfajban (amerikai cselle, japán fogasponty és zebraadánió); az androgenhatás az amerikai csellében és a fogaspontyban kimutatható, de a zebraadánióban nem. A vizsgálati módszer nem teszi lehetővé az antiandrogen hatású vegyi anyagok kimutatását. A validációs munka szakértői értékelését a vizsgálati iránymutatói program nemzeti koordinátorai által kinevezett szakértői testület végezte (6). A vizsgálat célja nem a hormonális zavarok specifikus mechanizmusainak meghatározása, mivel a vizsgálati állatok ép hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengellyel rendelkeznek, amely olyan vegyi anyagokra is reagálhat, amelyek eltérő szinteken gyakorolnak hatást a HPG-tengelyre. A halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat (OECD 229. vizsgálati iránymutató) kiterjed az amerikai cselle fekunditásának vizsgálatára és – adott esetben – gonadális kórszövettani vizsgálatára, valamint az ebben a vizsgálati módszerben szereplő összes végpontra is. Az OECD 229. vizsgálati iránymutatója egy szűrővizsgálatot mutat be a szaporodást különböző (beleértve az endokrin rendszerre ható) mechanizmusokon keresztül befolyásoló vegyi anyagok kimutatására, amelyet a legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztása során figyelembe kell venni.
2. Az e fejezetben ismertetett vizsgálati módszer egy *in vivo* szűrővizsgálati eljárást ír le, amelynek során ivarérett hím és szaporodóképes nőstény halakat tartunk együtt és teszünk ki egy vegyi anyag hatásának életciklusuk egy korlátozott szakaszában (21 napig). A 21 napos expozíciós idő befejezésekor – az alkalmazott fajtól függően – egy vagy két biomarker végpontot mérünk a hímeknél és a nőstényeknél a vizsgált vegyi anyag ösztrogen-, aromatázgátló vagy androgenhatásának mutatójaként; ezek a végpontok a vitellogenin és a másodlagos nemi jellegek. A vitellogenint az amerikai csellénél, a japán fogaspontynál és a zebraadániónál mérjük, míg a másodlagos nemi jellegét csak az amerikai csellénél és a japán fogaspontynál.
3. E biológiai vizsgálat *in vivo* szűrővizsgálatként szolgál bizonyos endokrin hatásmechanizmusok tekintetében és alkalmazását az »OECD fogalmi keret a hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálatához és értékeléséhez« című dokumentummal összefüggésben kell értelmezni (28).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. A vitellogenin általában a nőstény ikrarakó gerincesek májában termelődik a keringő endogén ösztrogénekre adott válaszként. Az ikra sárgájában található fehérjék prekursora, és a májban történő megtermelődése után a vérárammal jut el a petefészekbe, ahol a fejlődő ikrák felveszik és módosítják. A vitellogenin szinte kimutathatatlan a fiatal nőstény és hím halak vérplazmájában, mivel a szervezetükben nincs elegendő keringő ösztrogén; ugyanakkor a máj az exogén ösztrogenstimulációra adott válaszul is képes vitellogenin szintetizálására és kiválasztására.
5. A vitellogenin mérésével kimutathatók a különböző ösztrogen hatásmechanizmusú vegyi anyagok. Az ösztrogenikus vegyi anyagok kimutathatók a hím halakban végbemenő vitellogeninindukció mérésével, amely módszerre számos hivatkozást találunk a lektorált tudományos szakirodalomban (pl. (7)). A vitellogenin indukcióját aromatizálható androgénnel szembeni expozíció után is kimutatták (8, 9). A keringő ösztrogen szintjének csökkenése a nőstényeknél – például az endogén androgént természetes ösztrogen 17 β -ösztradiollá konvertáló aromatáz gátlása miatt – a vitellogeninszint csökkenését okozza, amelyet az aromatázgátló tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok kimutatására lehet használni (10, 11). Az ösztrogen/aromatázgátlást követően létrejövő vitellogenin-válasz biológiai jelentőségét megállapították és széles körben dokumentálták. Lehetséges azonban, hogy a VTG-termelést a nőstényeknél az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják.

6. Több rutin mérési módszert fejlesztettek már ki és szabványosítottak. Ilyenek a fajspecifikus enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati módszerek (ELISA), amelyek immunkémiai eljárásokat használnak a termelt vitellogeninmennyiség meghatározására az egyes halakból gyűjtött kis vér- vagy májmintákban (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). A VTG mérése céljából az amerikai cselléből vér-, a zebra-dánióból vér- vagy fej/farok homogenizátumot, a fogaspontyból pedig májmintát kell venni. A fogasponty esetében jó korreláció áll fenn a vérben és a májban mért VTG-értékek között (19). A vitellogeninanalízishez előírt mintavételi eljárásokat a 6. függelék tartalmazza. A vitellogenin mérésére szolgáló készletek széles körben elérhetők; az ilyen készleteknek validált fajspecifikus ELISA-módszeren kell alapulniuk.
7. Egyes halfajok hím egyedeinek másodlagos nemi jellegei kívülről láthatók, számszerűsíthetők és reagálnak az endogén androgének szervezetben keringő mennyiségeire; ez a helyzet az amerikai cselle és a fogasponty esetében, de a zebra-dánió esetében nem, mert ez a faj nem rendelkezik számszerűsíthető másodlagos nemi jellemzőkkel. A nőtények képesek arra, hogy hím másodlagos nemi jellegeket fejlesszenek ki, ha vízben oldott androgén hatású vegyi anyagoknak vannak kitéve. A tudományos irodalomban számos vizsgálat áll rendelkezésre, amely dokumentálja az ilyen típusú választ az amerikai cselle (20) és a fogasponty (21) esetében. A másodlagos nemi jellegek csökkenését a hím egyedekben óvatosan kell értelmezni az alacsony statisztikai erő miatt, és az értelmezést szakértői megítélésre és a bizonyítékok súlyára kell alapozni. A vizsgálatban a zebra-dánió használatának – az androgénhatású vegyi anyagokra reagáló számszerűsíthető másodlagos nemi jellemzők hiánya miatt – vannak bizonyos korlátai.
8. Az amerikai csellében az exogén androgén expozíció fő mutatója a nőtény hal ormányán található nuptiális tuberculumok száma. A fogasponty nőtény egyedeiben a papillaris nyúlványok száma képezi az androgén vegyi anyagoknak való exogén kitétség fő markerét. Az amerikai cselle és a fogasponty nemi jellegeknek értékelése során követendő eljárásokat 5A. és 5B. függelék tartalmazza.
9. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatóak.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgálat során a vizsgálati edényekben vegyesen elhelyezett, párzóképes állapotú hím és nőtény halakat tesszük ki egy vegyi anyagnak. A felnőtt korú és párzóképes állapotú halakon a nemek egyértelműen megkülönböztethetők és ezáltal az egyes végpontok ivaronként elemezhetők, illetve biztosított a halak érzékenysége az exogén vegyi anyagok iránt. A vizsgálat befejezésekor a halak ivarát az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával támasztjuk alá a has ollóval történő ventrális felnyitása után. A biológiai vizsgálat lényeges feltételeiről a 2. függelék nyújt áttekintést. A vizsgálatot általában ívási állapotban lévő populációból vett halakkal indítjuk el; öregedő állatokat nem szabad használni. A halak életkorára és párzóképességére vonatkozó útmutató »A halak kiválasztása« című szakaszban található. A vizsgálatot a vegyi anyag három expozíciós koncentrációjával, valamint egy vizes kontrollal és szükség esetén egy oldószeres kontrollal végezzük. A zebra-dánió és a fogasponty esetében kezelésenként két edényt vagy ismétlést (minden edény 5 hím és 5 nőtényt tartalmaz), míg az amerikai cselle esetében kezelésenként négy edényt vagy ismétlést használunk (minden edény 2 hím és 4 nőtényt tartalmaz). Ez azért szükséges, hogy érvényesülhessen a hím amerikai csellek territorialis viselkedése, úgy, hogy a vizsgálatához szükséges statisztikai erő is biztosított legyen. Az expozíciót 21 napig folytatjuk és a halakból az expozíció 21. napján veszünk mintát.
11. A 21. napon végzett mintavétel keretében az állatokat kíméletesen leöljük. Az amerikai cselle és a fogasponty esetében a másodlagos nemi jelleget mérjük (lásd az 5A. és 5B. függelék); a zebra-dánióból és az amerikai cselléből vérmintát gyűjtünk a vitellogenin meghatározására, míg a zebra-dánió esetében a vitellogenin meghatározására alternatívaként fej/farok mintát is lehet gyűjteni (6. függelék); a fogaspontyból májmintát gyűjtünk VTG-analízis céljára (6. függelék).

A VIZSGÁLAT ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

12. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat elfogadható legyen:
 - a mortalitási arány a vizes (vagy oldószeres) kontrollokban az expozíciós idő végén nem haladhatja meg a 10 %-ot,
 - az expozíciós idő alatt az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig legalább a levegőteltettségi érték (ASV) 60 %-ának kell lennie,

- a víz hőmérsékletében soha nem lehet $\pm 1,5$ °C-nál nagyobb eltérés az egyes vizsgálati edények között, és a hőmérséklet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérsékleti tartományon belül 2 °C-ot ingadozhat (2. függelék),
- bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgált vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

13. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:
 - a) oxigéntartalom- és pH-mérők;
 - b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;
 - c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;
 - d) kémiaileg semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és egyedsűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 2. függelék);
 - e) ívási aljzat az amerikai csele és a zebadánió esetében; a szükséges adatok a 4. függelékben találhatók;
 - f) megfelelő pontosságú mérleg (azaz $\pm 0,5$ mg pontosságú).

Víz

14. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgált fajok kellően hosszú ideig túlélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak $\pm 0,5$ -del térhet el a kiindulási értéktől. Annak biztosítása céljából, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgált vegyi anyaggal), bizonyos időközönként vízmintákat kell venni és elemezni. A vízmintában a következőket kell mérni: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- és SO_4^{2-}), a növényvédő szerek (pl. összes szerves foszfort és összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről ismert, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége legalább egy éven keresztül bizonyítottan változatlan, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. hathavonta egyszer). Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 3. függelékben található.

Vizsgálati oldatok

15. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is használhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Oldószer-hordozóanyag használata nem ajánlott. Abban az esetben azonban, ha oldószerre van szükség, párhuzamosan egy oldószeres kontrollt is futtatni kell a vegyi anyaggal történő kezelésekből alkalmazottal megegyező oldószer-koncentrációval. Nehezen vizsgálható vegyi anyagok esetében technikailag az oldószer lehet a legjobb megoldás; e tekintetben »A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata« című OECD-iránymutatást (22) kell tanulmányozni. A megfelelő oldószert a vegyi anyag tulajdonságai határozzák meg. Az OECD-iránymutatás maximum 100 µl/l értéket javasol, amelyet be kell tartani. Egy közelmúltban végzett felülvizsgálat (23) azonban további aggályokra hívta fel a figyelmet az oldószeres endokrin rendszerre kifejtett hatások vizsgálatában való használatával kapcsolatban. Ezért ajánlott, hogy amennyiben feltétlenül szükség van rá, az oldószer koncentrációja a lehető legkisebb legyen, ha ez technikailag megvalósítható (a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ).
16. Átfolyásos vizsgálati rendszert kell használni. Ez a rendszer a koncentrációsorozatnak a vizsgálati kamrákba történő bejuttatása céljából folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgált vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőszerrel). A vizsgálat során időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. Ügyelni kell arra, hogy ne használjunk rossz minőségű műanyag csöveket vagy egyéb olyan anyagokat, amelyek biológiailag aktív vegyi anyagokat tartalmazhatnak. Az állandó áramlású rendszerhez használt anyagok kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagnak a kiválasztott anyaghoz való lehetséges adszorpcióját is.

A halak tartása

17. A vizsgálati halakat a laboratóriumi populációból kell kiválasztani, lehetőleg egyetlen tenyészetből, és a halakat a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó körülmények, vízminőség és megvilágítás mellett kell akklimatizálni. Fontos, hogy a betelepítési arány és egyedsűrűség (a fogalmak meghatározását lásd az 1. függelékben) a felhasznált vizsgálati fajnak megfelelő legyen (lásd a 2. függelékét).
18. A 48 órás betelepítési időszak után a mortalitást jegyzőkönyvezni kell, és az alábbi követelményeket kell alkalmazni:
 - amennyiben hét nap alatt a mortalitás a populáció 10 %-ánál nagyobb: az egész halállományt ki kell cserélni;
 - amennyiben a mortalitás a populáció 5–10 %-a: további hét nap akklimatizációs időszakot kell beiktatni, és amennyiben a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál, az egész állományt ki kell cserélni;
 - ha hét nap után a mortalitás 5 % alatt marad, az állomány elfogadható.
19. Az akklimatizációs időszak során, az expozíciót előkészítő időszakban és az expozíciós idő alatt a halak nem kaphatnak semmilyen betegség elleni kezelést.

Az expozíciót előkészítő időszak és a halak kiválasztása

20. Egyhetes expozíciót előkészítő időszak javasolt, amelynek során az állatokat a tényleges vizsgálatban alkalmazotthoz hasonló edényekben kell elhelyezni. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt *ad libitum* kell etetni. Az expozíciós fázist olyan, az ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, ivari kétalakúságot mutató, kifejlett (pl. az amerikai cselle és a fogaspony esetében jól látható másodlagos nemi jellegekkel rendelkező) halakkal kezdjük meg, amelyek aktívan ívnak. Általános iránymutatásként (és ezt a szempontot nem szabad az adott halállomány tényleges pározóképességétől elszigetelten szemlélni) az amerikai csellék kb. 20 (\pm 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartottuk őket. A japán fogasponyok körülbelül 16 (\pm 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartottuk őket. A zebradániók körülbelül 16 (\pm 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 26 ± 2 °C-on tartottuk őket.

VIZSGÁLATI TERV

21. A vizsgált vegyi anyag három koncentrációját, egy (vizes) kontrollt, illetve – szükség esetén – egy oldószeres kontrollt használunk. Az adatokat a kezelések és a kontrollok esetében kapott válaszok közötti statisztikailag szignifikáns különbség meghatározása érdekében elemezhetjük. Ezek az elemzések nem a kockázatelemzésben hasznosak (24), sokkal inkább arról adnak tájékoztatást, hogy szükség van-e a vegyi anyag káros hatásainak további hosszabb távú vizsgálatára (vagyis a túlélés, a fejlődés, a növekedés és a szaporodás vizsgálatára).
22. A zebradánió és a fogaspony esetében a vizsgálat 21. napján hím és nőstény állatokat mintavételezünk minden kezelési szintből (5 hím és 5 nőstény mindkét ismétlésben), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és – adott esetben – a másodlagos nemi jellegek mérésére. Az amerikai cselle esetében az expozíció 21. napján hím és nőstény állatokat mintavételezünk (2 hím és 4 nőstény mind a négy ismétlésben), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és másodlagos nemi jellegek mérésére.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

23. E vizsgálat esetében a legnagyobb vizsgálati koncentrációt a legnagyobb elviselhető koncentráció (maximum tolerated concentration, MTC) alapján kell meghatározni, amelyet dózisbehataroló vizsgálat vagy egyéb toxicitási adatokból, illetve 10 mg/l-ben, vagy a maximális vízoldhatóság mértékében kell megállapítani (amelyik a legalacsonyabb). Az MTC a vegyi anyag azon legnagyobb vizsgálati koncentrációja, amely kevesebb, mint 10 %-os mortalitást eredményez. E megközelítés azt feltételezi, hogy rendelkezésre állnak azok az empirikus akut toxicitási vagy egyéb toxicitási adatok, amelyekből az MTC-t meg lehet becsülni. Az MTC becslése pontatlan lehet és alkalmazhatóságáról jellemzően egyéni szakmai megítélés alapján kell dönten.
24. Három vizsgálati koncentrációra van szükség, amelyek állandó osztásköze nem haladja meg a 10-et, valamint egy hígítóvizes kontrollra (és szükség esetén egy oldószeres kontrollra is). 3,2 és 10 közötti osztásköz ajánlott.

ELJÁRÁS

A vizsgálati halak kiválasztása és lemérése

25. Fontos a halak testtömegeltéréseinek minimumra csökkentése a vizsgálat elején. A vizsgálatához javasolt különböző halfajok megfelelő mérettartományait az 2. függelék tartalmazza. A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a hím és nőstény halak vizsgálat elején mért egyéni testtömegének lehetőleg az azonos nemű halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg előzetes becslése céljából javasolt a vizsgálat előtt a halállomány egy részmintájának a tömegét lemérni.

Expozíciós körülmények*Időtartam*

26. A vizsgálat időtartama 21 nap, egy expozíciót előkészítő időszakot követően. Az expozíciót előkészítő időszak ajánlott ideje egy hét.

Táplálás

27. A halakat *ad libitum* kell etetni a megfelelő táplálékkal (2. függelék) olyan mennyiségben, amely segít fenntartani fizikai állapotukat. Gondosan kerülni kell a mikrobatenyészetek kialakulását és a víz zavarossá válását. Általános iránymutatásként a napi adagot két vagy három egyenlő részre lehet osztani, és a halakat naponta többször etetni, az egyes etetések között legalább három órát hagyva. Az egyszerre adott nagyobb adag is elfogadható, különösen hétvégén. A halak a mintavételezés/boncolás előtti 12 órában nem kaphatnak táplálékot.
28. A haleledelben vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – előfordulását. Kerülni kell a magas fitoösztrogén-tartalmú táplálékokat, amelyek a vizsgálatban befolyásolnák az ismert ösztrogénagonistákra (pl. a 17-béta-ösztradiolra) adott választ.
29. Az el nem fogyasztott táplálékot és az ürülékot legalább hetente kétszer el kell távolítani az edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva.

Fény és hőmérséklet

30. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd a 2. függelékot).

Az analitikai vizsgálatok és mérések gyakorisága

31. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot befogadó rendszere megfelelő működéséről. Meg kell állapítani a szükséges analitikai módszereket, illetve a vegyi anyag vizsgálati rendszerben való kémiai stabilitásáról megfelelő ismereteket kell szerezni. A vizsgálat alatt a vizsgált vegyi anyag koncentrációit rendszeres időközönként határozzuk meg az alábbiak szerint: a hígító és a toxikus törzsoldat áramlási sebességét lehetőleg naponta kell ellenőrizni, de minimum hetente kétszer, és értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A vizsgált vegyi anyag tényleges koncentrációit ajánlott minden edényben a vizsgálat elején és azt követően hetente egyszer megmérni.
32. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.
33. Szükség lehet a minták szűrésére (0,45 μm pórusméretű szűrőbetét használatával) vagy centrifugálására. Ha erre van szükség, akkor a centrifugálás az ajánlott eljárás. Amennyiben azonban a vizsgált anyag nem adszorbeálódik a szűrő felszínén, akkor a szűrés is elfogadható módszer.

34. A vizsgálat alatt minden vizsgálati edényben legalább hetente egyszer meg kell mérni az oldott oxigén koncentrációját, a hőmérsékletet és a pH-t. Az víz összes keménységét és a lúgosságát legalább hetente egyszer meg kell mérni a kontrollokban és a legmagasabb vizsgálati koncentrációt tartalmazó egyik edényben. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

Megfigyelések

35. Több általános (pl. túlélés arány) és alapvető biológiai választ (pl. vitellogeninszintek) értékelünk a vizsgálat során vagy a vizsgálat befejezésekor. E végpontok mérését és értékelését, illetve hasznosságát az alábbiakban ismertetjük.

Túlélési arány

36. A halakat a vizsgálati időszak alatt naponta meg kell vizsgálni, a mortalitást fel kell jegyezni, és az elpusztult halakat a lehető leghamarabb el kell távolítani. Az elpusztult halakat nem szabad sem a kontroll-, sem a kezelési edényekben újakra cserélni. A vizsgálat során elpusztult halak ivarát meg kell határozni az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával.

Viselkedés és külső megjelenés

37. A rendellenes viselkedést (a kontrollhoz képest) fel kell jegyezni; ide sorolhatók az általános toxicitás jelei, beleértve a hiperventilációt, a koordinálatlan úszást, az egyensúly elvesztését és az atipikus nyugalmat vagy táplálkozást. Emellett a külső rendellenességeket (bevérzés, elszíneződés) is fel kell jegyezni. A toxicitás ilyen jeleit az adatok értelmezése során gondosan mérlegelni kell, mert olyan koncentrációkat jelezhetnek, amelyek mellett a hormonhatás biomarkerei nem megbízhatóak. A viselkedésre vonatkozó ilyen jellegű megfigyelések hasznos kvalitatív információkkal szolgálhatnak a potenciális jövőbeni halvizsgálati követelmények tekintetében is. Az amerikai cselle esetében például androgénexpozíció hatására területi agresszivitást figyeltek meg a hímekben vagy a maszkulinizált nőstényekben; a zebraadániónál az ösztrogén- és antiandrogén-expozíció csökkenti vagy akadályozza a fajnál jellegzetesen az első hajnali fényvel jelentkező párzási és ivási magatartást.
38. Mivel a külső megjelenés néhány aspektusa (elsősorban a szín) az állatok kezelésének hatására gyorsan változhat, fontos, hogy a kvalitatív megfigyeléseket az állatoknak a vizsgálati rendszerből való eltávolítása előtt végezzük el. Az amerikai csellel szerzett eddigi tapasztalatok arra utalnak, hogy egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok először a következő külső jellemzőkben idéznek elő változásokat: testszín (világos vagy sötét), mintázat (függőleges sávok jelenléte), valamint a test alakja (a fej és a pectorális régió). Ezért a halak fizikai megjelenésével kapcsolatos megfigyeléseket kell tenni a vizsgálat során és a vizsgálat végén.

A halak humánus leölése

39. A 21. napon – azaz az expozíció befejezésekor – a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l NaHCO₃ (nátrium-hidrogén-karbonát, CAS 144-55-8) oldattal puffertolt megfelelő mennyiségű trikainnal (trikain-metán-szulfonát, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végezni; ezután a »Vitellogenin« című szakaszban leírtak szerint vér- vagy szövetmintát veszünk a vitellogenin szintjének meghatározásához.

A másodlagos nemi jellegek megfigyelése

40. Egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok változásokat idéznek elő a speciális másodlagos nemi jellegekben (a nuptiális tuberkulumok száma a hím amerikai csellenél, a papilláris nyúlványok száma a hím fogaspontyban). Bizonyos hatásmechanizmusú vegyi anyagok az ellenkező nemű állatokra jellemző másodlagos nemi jelleg kóros előfordulását idézhetik elő; a trenbolonhoz, a metiltesztoszteronhoz és a dihidrotesztoszteronhoz hasonló androgénreceptor-agonisták például a nőstény amerikai cselleknél jól fejlett nuptiális tuberkulumok, nőstény fogaspontyoknál pedig papilláris nyúlványok megjelenését okozhatják (11, 20, 21). Azt is feljegyezték, hogy felnőtt hímekben az ösztrogénreceptor-agonisták csökkenthetik a nuptiális tuberkulumok számát és a dorzális tarkólemezt méretét (25, 26). Az ilyen általános morfológiára vonatkozó megfigyelések hasznos kvalitatív és kvantitatív információt nyújthatnak a potenciális jövőbeni halvizsgálati követelmények tekintetében. Az amerikai csellenél a nuptiális tuberkulumok, illetve fogaspontynál a papilláris nyúlványok számát és méretét közvetlenül, vagy egyszerűbben konzervált példányokon lehet számszerűsíteni. Az amerikai cselle és a fogasponty másodlagos nemi jellemzőinek értékelésére ajánlott eljárások az 5A., illetve az 5B. függelékben találhatók.

Vitellogenin (VTG)

41. A vérmintákat a kaudális artériából/vénából heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel, vagy pedig fecskendővel végzett szívpunkcióval gyűjtjük. A hal méretétől függően a begyűjthető vértérfogat példányonként általában 5–60 µl az amerikai csele és 5–15 µl a zebra-dánió esetében. A plazmát a vérből centrifugálással különítjük el, és a vitellogeninszint vizsgálatáig proteázinhibitorokat hozzáadva – 80 °C-on tároljuk. Alternatív megoldásként a fogasponty esetében a májból, zebra-dánió esetében pedig a fej/farok homogenizátumból vett szövetmintát is használhatunk a vitellogeninszint meghatározásához (6. függelék). A VTG mérésének homológ VTG standardokat és homológ antitesteket használó validált homológ ELISA módszerrel kell alapulnia. Olyan módszer alkalmazása javasolt, amely a VTG-t alacsony, akár néhány ng/ml vérplazma (vagy ng/mg szövet) koncentrációban is képes kimutatni, ami a vizsgált vegyi anyagnak nem kitett hím halakban megfigyelhető háttérszintnek felel meg.
42. A vitellogeninanalízis minőségellenőrzését standardok és vakpróbák alkalmazásával, illetve legalább két ismétlésben végzett analízis révén biztosítjuk. A minimális mintahígítási tényező meghatározása céljából minden ELISA módszer esetében le kell futtatni egy tesztet a mátrixhatás (a mintahígítás hatásának) vizsgálatára. A VTG vizsgálati eljárásokban felhasznált minden ELISA-lemeznek a következő minőségellenőrzési mintákat kell tartalmaznia: a várható vitellogeninkoncentrációkat lefedő legalább 6 kalibrációs standard, és legalább egy nem specifikus kötési vakpróba (két példányban analizálva). E vakpróbák abszorbanciája a kalibrációs standard maximális abszorbanciájának legfeljebb 5 %-a lehet. Az egyes hígítási minták legalább két alikvotjának (párhuzamos lyukak) analízisét végezzük el. Azokat a párhuzamos lyukakat, amelyek értékei között az eltérés nagyobb, mint 20 %, újra kell analizálni.
43. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatója (R^2) 0,99-nál nagyobb legyen. Ugyanakkor azonban a magas korreláció nem garantálja a koncentráció megfelelő előrejelzését minden tartományban. A kalibrációs görbe elegendően nagy korrelációja mellett az egyes standardok kalibrációs görbe alapján számolt koncentrációjának a névleges koncentráció 70–120 %-a közé kell esnie. Ha a névleges koncentráció távolodik a kalibrációs regressziós egyenestől (pl. az alacsonyabb koncentrációknál), szükség lehet arra, hogy a kalibrációs görbét alacsony és magas tartományra osszuk, vagy hogy egy nemlineáris modellt alkalmazzunk az abszorbanciaadatok megfelelő illesztésére. Ha a görbét kettéosztjuk, mindkét vonalszakasznak $R^2 > 0,99$ értékkel kell rendelkeznie.
44. A kimutatási határérték (LOD) a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációja, a mérhetőségi határérték (LOQ) pedig a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációjának és a legkisebb hígítási tényezőnek a szorzata.
45. Minden olyan napon, amikor vitellogeninvizsgálatot végzünk, egy inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálunk (7. függelék). Az adott napon végzett vizsgálatok eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell a várt koncentrációkhoz viszonyított arányát is.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

A biomarker-válaszok értékelése varianciaanalízissel (ANOVA)

46. Egy vegyi anyag endokrin rendszerre kifejtett potenciális hatásának azonosítása céljából varianciaanalízissel (ANOVA) összehasonlítjuk a kezelésként és kontrollcsoportonként kapott válaszokat. Ha oldószeres kontrollt is alkalmazunk, minden végpont tekintetében megfelelő statisztikai próbát kell végezni a hígítóvízes és az oldószeres kontrollok összehasonlítására is. A hígítóvízes és az oldószeres kontrollok esetében kapott adatoknak a rákövetkező statisztikai elemzés során való felhasználására vonatkozó iránymutatás az OECD 2006c (27) szakirodalmi hivatkozásban található. Az összes biológiai válaszadatot elemezni és nemenként jegyzőkönyvezni kell. Amennyiben nem teljesülnek a paraméteres módszerekhez szükséges feltételek – nemnormális eloszlás (pl. Shapiro–Wilk-próba) vagy heterogén variancia (Bartlett- vagy Levene-féle próba) –, akkor fontolóra lehet venni az adatok transzformálását a variancia homogenizálása érdekében az ANOVA elemzés elvégzése előtt, vagy a súlyozott ANOVA elemzés alkalmazását. Nem monoton dózis-válasz esetén a többszörös páronkénti összehasonlításon végzett Dunnett-féle próba (parametrikus) vagy a Bonferroni-korrekcióval végzett Mann–Whitney-féle próba (nem paraméteres) is használható. Ha a dózis-hatás nagyjából monoton, egyéb statisztikai próbákat lehet alkalmazni (pl. Jonckheere–Terpstra próba vagy Williams-féle próba). A 8. függelékben található statisztikai folyamatábra segít a legmegfelelőbb statisztikai próbára vonatkozó döntés meghozatalában. További információ található az »Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében« című OECD-dokumentumban (27).

A vizsgálati eredmények jegyzőkönyvezése

47. A vizsgálati adatoknak tartalmazniuk kell:

Vizsgálólétesítmény:

- Felelős személyek és vizsgálati feladataik
- Minden laboratóriumnak igazolnia kell jártasságát reprezentatív vegyi anyagok használatában

Vizsgált vegyi anyag:

- A vizsgált vegyi anyag jellemzése
- Fizikai jelleg és lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok
- A vizsgálati koncentrációk elkészítésének módja és gyakorisága
- A stabilitásra és a biológiai lebonthatóságra vonatkozó információk

Oldószer:

- Az oldószer jellemzése (jelleg, alkalmazott koncentráció)
- Az oldószer kiválasztásának indoklása (ha nem víz)

Vizsgálati állatok:

- Faj és törzs
- Szállító és a konkrét szállító létesítmény
- A halak életkora a vizsgálat elején, valamint a halak párzóképes/ívási állapota
- Az állatok akklimatizációjának részletei
- A halak testtömege az expozíció elején (a halállomány részmintájában)

Vizsgálati körülmények:

- Alkalmazott vizsgálati eljárás (vizsgálat típusa, betelepítési arány, betelepítési egyedsűrűség stb.);
- A törzsoldatok elkészítésének módszere és az áramlási sebesség;
- Névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati oldatok hetente mért koncentrációi és az analitikai módszer, a vizsgálati edényekben mért értékek átlaga és szórása, valamint bizonyíték arra, hogy a mérések a vizsgált vegyi anyag valódi oldatban lévő koncentrációira vonatkoznak;
- A hígítóvíz jellemzői (beleértve a pH-t, a keménységet, a lúgosságot, a hőmérsékletet, az oldott oxigén koncentrációját, a maradéklór-tartalmat, a teljes szerves széntartalmat, a szuszpendált szilárd anyagokat és bármely egyéb elvégzett mérés eredményét)
- Víztisztaság a vizsgálati edényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldott oxigén koncentrációja;
- Az etetésre vonatkozó részletes információk (pl. a táplálék(ok) típusa, forrása, az adagolt mennyiség és az etetés gyakorisága, valamint a lényeges szennyezőanyagok elemzése (pl. PCB-k, PAH-ok, és szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek), ha rendelkezésre állnak).

Eredmények

- Annak igazolása, hogy a kontrollok teljesítették a vizsgálat elfogadhatósági kritériumait;
- A vizsgálati koncentrációk és a kontrollok bármelyikében előforduló egyedpusztulásokra vonatkozó adatok;
- Statisztikai elemzési technikák, az adatok kezelése és az alkalmazott technikák indoklása;
- Az általános morfológiára vonatkozó biológiai megfigyelések adatai, beleértve a másodlagos nemi jellegeket és a vitellogenin szintjét;
- Az adatelemzés eredményei lehetőleg táblázatos és grafikus formában;
- A halak szokatlan reakcióinak és a vizsgált vegyi anyag által előidézett bármely látható elváltozásnak az előfordulása.

ÚTMUTATÓ A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSÉHEZ ÉS ELFOGADÁSÁHOZ

48. Ez a szakasz olyan szempontokat tartalmaz, amelyeket figyelembe kell venni a különböző mért végpontok vizsgálati eredményeinek értelmezése során. Az eredményeket körültekintően kell értelmezni, ha úgy tűnik, hogy a vizsgált vegyi anyag nyilvánvaló toxicitást okoz vagy befolyásolja a kísérleti állatok általános állapotát.
49. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során ügyelni kell arra, hogy ne lépjük túl a legnagyobb elviselhető koncentrációt, mert csak így lesz lehetőség az adatok megfelelő értelmezésére. Fontos, hogy legalább egy olyan kezelés legyen, ahol nincs jele toxikus hatásoknak. A betegség és a toxikus hatások jeleit alaposan meg kell vizsgálni és jegyzőkönyvezni kell. Lehetséges például, hogy a nőstényeknél a VTG termelését az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják. A hatások helyes értelmezését azonban segíthetik azok az egyéb kezelési szintek, amelyeket nem zavar a szisztémás toxicitás.
50. Van néhány szempont, amelyet figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények elfogadása során. Útmutatásként a hímek és a nőstények kontrollcsoportjaiban mért VTG-szinteknek különbözőnek és egymástól körülbelül három nagyságrenddel eltérőnek kell lenniük az amerikai cselle és a zebadánió esetében, illetve körülbelül egy nagyságrenddel eltérőnek a fogasponty esetében. A kontroll- és a kezelési csoportokban előforduló értéktartományokra a validálási jelentésekben található példák (1, 2, 3, 4). A kontrollcsoport hímjeinél mért magas VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válasz-készségét és a gyenge ösztrogénagonisták felismerésére való képességét. A kontrollnőstényekben mért alacsony VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válasz-készségét, illetve az aromatazgatatók és az ösztrogénantagonisták felismerésére való képességét. Ez az útmutatás a validálási vizsgálatok alapján készült.
51. Ha a laboratórium korábban még nem végezte a vizsgálatot vagy jelentős változások történtek (pl. a haltörzsben vagy a szállítóban), célszerű lefolytatni egy technikai jártassági vizsgálatot. Olyan vegyi anyagokat javasolt használni, amelyek különböző hatásmechanizmussal rendelkeznek vagy több vizsgálati végpontra is hatással vannak. A gyakorlatban a laboratóriumokat arra ösztönzik, hogy építsenek fel saját adatbázist a hímekre és a nőstényekre vonatkozó korábbi kontrolladatokból úgy, hogy pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy ösztrogénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β -ösztradiol 100 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban, vagy egy ismert gyenge agonista), amely megnöveli a VTG szintjét a hím halakban, továbbá pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy aromatazgatató vegyi anyaggal (pl. fadrozol vagy prokloraz 300 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban), amely csökkenti a VTG szintjét a nőstény halakban, és pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy androgénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β -trenbolon 5 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban), amely a másodlagos nemi jellegek megjelenését eredményezi a nőstény amerikai cselleben és a fogaspontyban. Ezeket az adatokat a laboratórium jártasságának igazolása céljából össze lehet hasonlítani a validációs vizsgálatokból (1, 2, 3) származó adatokkal.
52. A vitellogeninméréseket általában akkor kell pozitívnak tekinteni, ha – legalább a legmagasabb vizsgált dózisban – a VTG statisztikailag szignifikáns növekedése ($p < 0,05$) figyelhető meg a hímeknél vagy statisztikailag szignifikáns csökkenése ($p < 0,05$) figyelhető meg a nőstényeknél a kontrollcsoporttal összehasonlítva, általános toxicitásra utaló jelek nélkül. A pozitív eredményt még inkább alátámaszthatja a dózis és a hatásgörbe közötti biológiai szempontból hihető kapcsolat. Mint korábban említettük, a vitellogenin csökkenése nem feltétlenül teljesen endokrin eredetű; a pozitív eredményt azonban általában az *in vivo* endokrin hatás bizonyítékeként kell értelmezni, és rendszerint az eredmény tisztázása érdekében tett további intézkedések követik.

SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68 (3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22 (6): 1350-60.

- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
 - (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as »signposts«, not »traffic lights«, in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22
-

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

CV: relatív szórás.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Betelepítési egyedsűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

VTG (vitellogenin): az ikra sárgájában található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekursora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

HPG-tengely: hypothalamusz-hipofízis-gonád tengely.

MTC: legnagyobb elviselhető koncentráció, amely az LC₅₀ körülbelül 10 %-a.

Vizsgált vegyi anyag: a jelen vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

A halakban végzett endokrin szűrővizsgálat kísérleti körülményei

1. Ajánlott faj	Amerikai cselle (<i>Pimephales promelas</i>)	Fogasponty (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebradánió (<i>Danio rerio</i>)
2. Vizsgálat típusa	Átfolyásos	Átfolyásos	Átfolyásos
3. Vízhőmérséklet	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Megvilágítás jellege	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)
5. Fényerő	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)
6. Megvilágítási időszak (hajnali/alkonyati átmeneti időszakok is alkalmazhatók, de nem feltétlenül szükségesek)	16 óra fény, 8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét
7. Betelepítési arány	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Vizsgálókamra mérete	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Vizsgálóoldat térfogata	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Vizsgálóoldatok térfogatának cseréje	Naponta legalább 6x	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x
11. Vizsgálathoz használt organizmusok életkora	Lásd a 20. pontot.	Lásd a 20. pontot.	Lásd a 20. pontot.
12. Kifejlett halak hozzávetőleges nedves tömege (g)	Nőstények: 1,5 ± 20 % Hímek: 2,5 ± 20 %	Nőstények: 0,35 ± 20 % Hímek: 0,35 ± 20 %	Nőstények: 0,65 ± 20 % Hímek: 0,4 ± 20 %
13. Halak száma vizsgálati edényenként	6 (2 hím és 4 nőstény)	10 (5 hím és 5 nőstény)	10 (5 hím és 5 nőstény)
14. Kezelések száma	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)
15. Edények száma kezelésenként	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Halak száma vizsgálati koncentrációnként	16 felnőtt nőstény és 8 hím (4 nőstény és 2 hím minden ismétlésben)	10 felnőtt nőstény és 10 hím (5 nőstény és 5 hím minden ismétlésben)	10 felnőtt nőstény és 10 hím (5 nőstény és 5 hím minden ismétlésben)

17. Etetési rend	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) élő vagy fagyasztott felnőtt vagy sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja
18. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőteltettség alá esik	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőteltettség alá esik	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőteltettség alá esik
19. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz
20. Expozíciót előkészítő időszak	7 nap ajánlott	7 nap ajánlott	7 nap ajánlott
21. Vizsgált vegyi anyaggal történő expozíció időtartama	21 nap	21 nap	21 nap
22. Biológiai végpontok	túlélési arány viselkedés másodlagos nemi jelek VTG	túlélési arány viselkedés másodlagos nemi jelek VTG	túlélési arány viselkedés VTG
23. A vizsgálat elfogadhatósága	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 25 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 24 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 26 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.

3. függelék

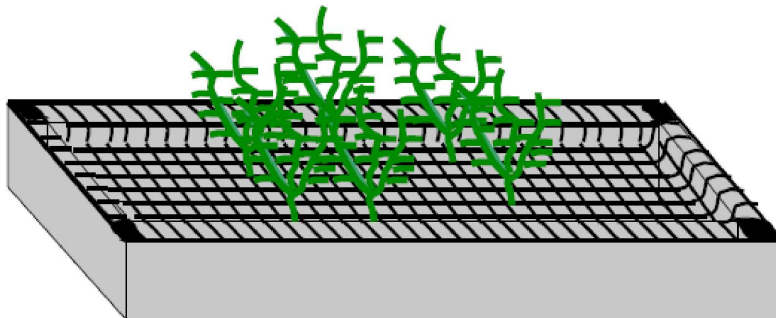
Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány fontosabb kémiai tulajdonsága

Összetevő	Koncentráció
Finomszemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

4A. függelék

Ívási aljzat a zebra-dánió részére

Ívási tálca: bármilyen, üvegből készült eszköztartó edény, például 22x15x5,5 cm méretű (hosszúság x szélesség x mélység), eltávolítható rozsdamentes acél ráccsal fedve (2 mm-es lyukbőség). A rácsnak a perem alatti magasságban kell fednie az eszköztartó edény nyílását.



A rácsra ívási aljzatot kell rögzíteni. A közegnek olyan szerkezetet kell biztosítani a halak részére, amelybe beköltözhetnek. A zöld műanyagból készült mesterséges akváriumnövények például alkalmasak erre a célra (megjegyzés: figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyagnak a műanyaghoz való lehetséges adszorpcióját). A műanyagot elegendő ideig megfelelő mennyiségű meleg vízben kell áztatni, hogy ne bocsásson ki vegyi anyagokat a vizsgálati vízbe. Ha üvegből készült anyagokat használunk, biztosítani kell, hogy a halak intenzív mozgásuk során ne sérüljenek meg vagy szoruljanak be.

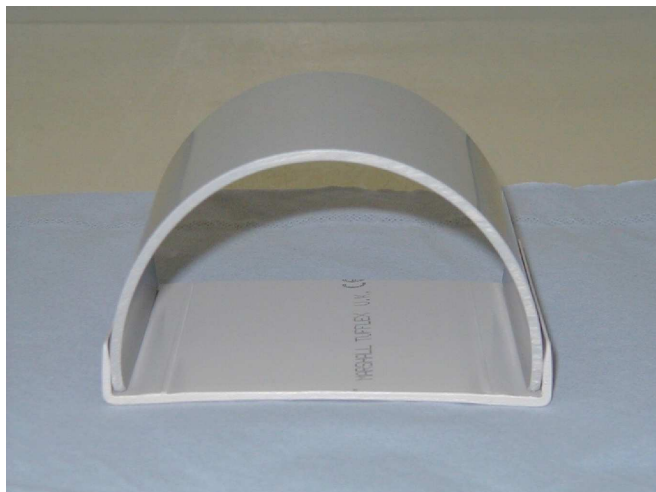
A tálca és az üvegfalak közötti távolság legalább 3 cm legyen, hogy az ívás ne történhessen a tálcán kívül. A tálcára lerakott ikrák átesnek a rácson, és 45–60 perccel a megvilágítás kezdete után mintát lehet venni belőlük. Az átlátszó ikrák nem tapadnak, és keresztirányú fény segítségével könnyen meg lehet számolni őket. Ha öt nőstényt használunk edényenként, a legfeljebb 20 ikra/nap mennyiség alacsonynak, a legfeljebb 100 ikra/nap mennyiség közepesnek, a több mint 100 ikra/nap mennyiség pedig magasnak számít. Az ívási tálcát – a lehető legkésőbbi esti időpontban vagy kora reggel – el kell távolítani, az ikrákat össze kell gyűjteni, majd az ívási tálcát újra be kell helyezni a vizsgálati edénybe. Az újrabehelyezésig eltelt idő nem haladhatja meg az egy órát, különben az ívási aljzat hatása szokatlan időben jelentkező egyedi párzást és ívást válthat ki. Ha valamilyen körülmény az ívási tálca későbbi behelyezését teszi szükségessé, ezt legalább 9 órával a megvilágítás kezdete után kell megtenni. E késői napszakban a tálca behelyezése már nem vált ki ívást.

4B. függelék

Ívási aljzat az amerikai csele részére

Két vagy három kombinált műanyag/kerámia/üveg vagy rozsdamentes acél ívási lemezt és tálcát helyezünk mindegyik vizsgálati kamrába (pl. 80 mm hosszú szürke, félkör alakú ereszcatorna-darab egy 130 mm hosszú peremes tálcára helyezve) (lásd a képet). A megfelelően előkészített PVC- vagy kerámialemezek megfelelő ívási aljzatnak bizonyultak (Thorpe és munkatársai, 2007.).

A jobb tapadás érdekében ajánlott a lemezeket megcsiszolni. Emellett a tálcát célszerű ráccsal lefedni, hogy megakadályozzuk a halak hozzáférését a lehullott ikrákhoz, kivéve, ha igazoltuk az ikráknak a használt ívási aljzathoz való hatékony tapadását.



Az alaplapp célja, hogy felfogja azokat az ikrákat, amelyek nem tapadnak meg a lemez felületén és ezért a tartály aljára esnének (vagy azokat az ikrákat, amelyeket a halak közvetlenül a lapos műanyag alaplappra raktak le). Az ívási aljzatot felhasználás előtt legalább 12 órán keresztül áztatni kell a hígítóvízben.

HIVATKOZÁSOK

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

5A. függelék

A másodlagos nemi jellegek vizsgálata az amerikai csellében bizonyos endokrin rendszerre ható vegyi anyagok kimutatása céljából**Áttekintés**

A hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálata során a fizikai megjelenés potenciálisan fontos jellemzői lehetnek a felnőtt amerikai csellék esetében többek között: a testszín (azaz világos/sötét), a mintázat (azaz a függőleges sávok jelenléte vagy hiánya), a test alakja (azaz a fej és a pektorális régió alakja, a has puffadtsága), valamint a speciális másodlagos nemi jellegek (azaz a nuptiális tuberkulumok száma és mérete, a dorzális lemez és a tojócső mérete).

A nuptiális tuberkulumok a szaporodásbiológiailag aktív hím amerikai csellék fején (dorzális lemez) találhatóak, és általában kétoldali szimmetrikus mintázatba rendeződnek (Jensen és munkatársai, 2001). A kontrollnőstényeken, illetve a fiatal hímeken és nőstényeken nem figyelhető meg a tuberkulumok kifejlődése (Jensen és munkatársai, 2001). A hímek szeme körül és orrlyukai között akár nyolc egyedi tuberkulum is lehet. A legtöbb és legnagyobb tuberkulum közvetlenül az orrlyukak alatt és a száj fölött, két párhuzamos vonalban található. Számos halban tuberkulumcsoportok helyezkednek el az alsó állkapocs alatt; ezek közül a szájhoz legközelebb elhelyezkedők általában egy különálló párt alkotnak, míg a ventrálisabb csoportok akár négy tuberkulumból is állhatnak. A gyakorlatban a tuberkulumok száma ritkán haladja meg a 30-at (tartomány: 18–28; Jensen és munkatársai, 2001). A (számuk tekintetében) domináns tuberkulumok különálló, viszonylag kerek képződmények, amelyek magassága körülbelül megegyezik a sugarukkal. A szaporodásbiológiailag leginkább aktív hímek többségének van legalább néhány olyan tuberkuluma, amely olyan mértékben megnagyobbodott és hangsúlyossá vált, hogy az egyes struktúrákat nem lehet megkülönböztetni.

A hormonháztartást zavaró anyagok bizonyos típusai egyes másodlagos nemi jellegek rendellenes előfordulását okozhatják a másik nemben; például az androgénreceptor-agonisták – mint a 17 β -metiltesztozteron vagy a 17 β -trenbolon – nuptiális tuberkulumok kifejlődését okozhatják a nőstény amerikai cselléknél (Smith, 1974; Ankley és munkatársai, 2001, 2003), míg az ösztrogénreceptor-agonisták a hímeknél csökkenhetik a nuptiális tuberkulumok számát vagy méretét (Miles–Richardson és munkatársai, 1999; Harris és munkatársai, 2000.).

Az alábbiakban az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (US Environmental Protection Agency) duluth-i (Minnesota állam) laboratóriumában alkalmazott eljárások alapján ismertetjük a nuptiális tuberkulumok jellemzését az amerikai cselle esetében. Az egyes termékek és/vagy berendezések hasonló rendelkezésre álló anyagokkal is helyettesíthetők.

A tuberkulumok megfigyelésére leginkább megvilágított nagyító vagy 3X nagyítású megvilágított preparálómikroszkóp alkalmas. A halat dorzális irányból és anterior részével előre vizsgáljuk (fejfel a megfigyelő felé).

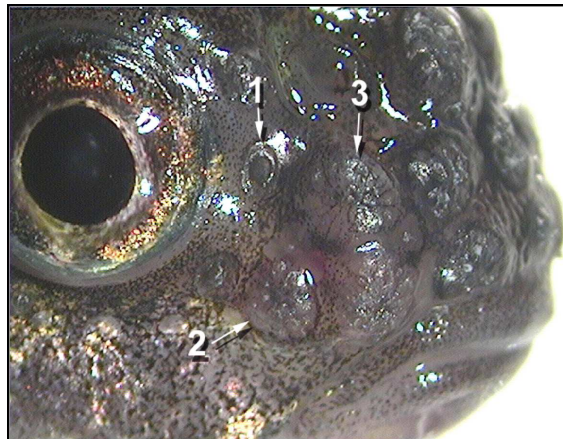
- A halat anterior részével előre és ventrális részével lefelé helyezzük kis (pl. 100 mm átmérőjű) Petri-csészébe. Fókuszáljuk a keresőt, hogy a tuberkulumok beazonosíthatók legyenek. A halat lassan, finoman forgassuk egyik oldaláról a másikra a tuberkulumterületek beazonosítása érdekében. Számoljuk meg és pontozzuk a tuberkulumokat.
- Ismételjük meg a megfigyelést a fej ventrális felületén is úgy, hogy a halat hátára fektetve, anterior részével előre helyezzük a Petri-csészébe.
- Az egyes halak megfigyelését 2 percen belül be kell fejezni.

A tuberkulumok megszámlálása és értékelése

Felnőtt amerikai cselle esetében hat specifikus területet határoztak meg, ahol meg kell vizsgálni a tuberkulumok jelenlétét és fejlődését. A jelenlévő tuberkulumok elhelyezkedésének és mennyiségének feltérképezésére kifejlesztettek egy sablont (lásd a függelék végén). Fel kell jegyezni a tuberkulumok számát; a tuberkulumok méretét az egyes szervezetekben a következőképpen lehet mennyiségileg rangsorolni: 0 – hiányzik, 1 – jelen van, 2 – megnagyobbodott és 3 – kifejezett (1. ábra).

0 pont – hiányoznak a tuberkulumok. 1 pont – jelen van, és a tuberkulumnak van egy olyan pontja, amelynek magassága csaknem egyenlő a tuberkulum sugarával (átmérőjével). 2 pont – megnagyobbodott, megjelenésében csillagra emlékeztető szövet jellemzi, és rendszerint nagy sugaras alapja van a középpontból eredő bordákkal vagy barázdákkal. A tuberkulum felszíne gyakran egyenetlen, de időnként kissé lekerekedett is lehet. 3 pont – kifejezett, általában elég nagy és lekerekedett, kevésbé definiált struktúrával. Időnként ezek a tuberkulumok összefutnak és egy adott területen vagy különböző területek kombinációján összefüggő tömeget képeznek (B, C és D, alább ismertetve). A tuberkulumok színezete és struktúrája a 2 ponttal értékelt tuberkulumokéhoz hasonlít, de időnként eléggé megkülönböztethetetlen. Ez a minősítési rendszer a 18–20 tuberkulummal rendelkező normál kontrollhímek esetében általában < 50 általános tuberkulumpontszámot eredményez (Jensen és munkatársai, 2001).

1. ábra



Az adott minősítési területen lévő tuberkulumok tényleges száma néhány hal esetében meghaladhatja a sabloncellák méretét (A. függelék). Ilyen esetben a további pontszámokat a cellán belül, illetve a cellától jobbra vagy balra lehet megadni. A sablonnak ezért nem kell szimmetrikusnak lennie. További technika a páros vagy a száj vízszintes síkja mentén vertikálisan összekapcsolódott tuberkulumok feltérképezésére, hogy egy cellában két tuberkulumminősítő pontot adunk meg.

Feltérképezendő régiók:

A – a szem körül található tuberkulumok. A szem elülső pereme körül dorzális-ventrális irányban feltérképezve. A kifejlett kontrollhímeknél általában több is található, a kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgénnek kitett nőstényekben pedig általában párban (mindkét szem közelében egy pár) vagy önállóan fordulnak elő.

B – az orrnyílások (szenzoros csatorna pórusok) között található tuberkulumok. A kontrollhímeknél normális esetben párokban, magasabb fejlettségi szintjen (2 – megnagyobbodott vagy 3 – kifejezett) fordulnak elő. A kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgénnek kitett nőstényeknél alkalmanként előfordulnak és bizonyos mértékben fejlettek.

C – az orrlyukaktól közvetlenül anterior irányban, a szájjal párhuzamosan található tuberkulumok. A kifejlett kontrollhímekben általában megnagyobbodtak vagy kifejezettek. A kevésbé fejlett hímekben vagy az androgénnel kezelt nőstényekben jelen vannak vagy megnagyobbodtak.

D – a szájvonallal párhuzamosan elhelyezkedő tuberkulumok. A kontrollhímeknél általában fejlettnek minősülnek. A kontrollnőstények esetében hiányoznak, de az androgénnek kitett nőstényeknél jelen vannak.

E – az alsó állkapcsón, a száj közelében található tuberkulumok, általában kisméretűek és gyakran párban vannak. A kontroll- és a kezelt hímek, valamint a kezelt nőstények esetében változó jellemzőkkel rendelkeznek.

F – az E-vel jelölt tuberkulumoktól ventrálisan elhelyezkedő tuberkulumok. Gyakran kisméretűek és párban vannak. A kontrollhímeknél és az androgénnek kitett nőstényeknél vannak jelen.

HIVATKOZÁSOK

- (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.

Tuberkulumsablon**Számszerű értékelés**

Azonosító _____

1 – jelen van

Dátum _____

2 – megnagyobbodot

Összesített pontszám _____

3 – kifejezett

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1		
	F	X1	X1	X1	X1

5B. függelék

A másodlagos nemi jellegek vizsgálata a fogsopontyban egyes, az endokrin rendszerre ható vegyi anyagok kimutatása céljából

Az alábbiakban a papilláris nyúlványok (*) mérési módját ismertetjük, amelyek a fogsoponty (*Oryzias latipes*) jellemző másodlagos nemi jellegei.

(*) A papilláris nyúlványok normális esetben csak felnőtt hímeknél jelennek meg és az anális úszó sugarain, az úszó hátsó végétől számított másodiktól a hetedik vagy nyolcadik úszósugárig található meg (1. és 2. ábra). A nyúlványok ugyanakkor csak ritkán jelennek meg az anális úszó hátsó végétől számított első úszósugáron. Ez a szabványos eljárás kiterjed a nyúlványok első úszósugáron történő mérésére is (ebben a szabványos eljárásban az úszósugarak számjele az anális úszó hátsó végétől számított sorszámokra utal).

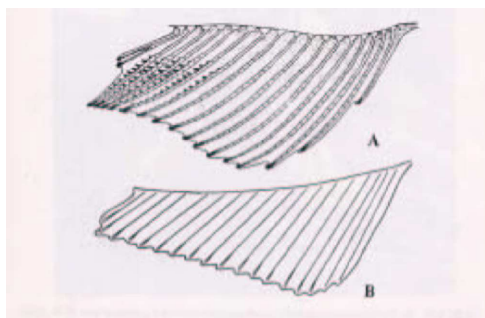
- (1) A máj kimetszése után (6. függelék) a tetemet egy kúpos csőbe helyezük, amely körülbelül 10 ml 10 %-os semleges pufferelt formalint tartalmaz (felső rész: fej, alsó rész: fark). Ha az ivarmirigyet 10 %-os semleges pufferelt formalintól eltérő oldatban rögzítjük, a testet keresztirányban vágjuk át borotva segítségével az anális úszó anterior régiója és a végbélnyílás között, ügyelve arra, hogy ne sértsük meg az ivarnyílást és magát az ivarmirigyet (3. ábra). Helyezzük a haltest feji végét fixálóoldatba az ivarmirigy megőrzése céljából, a haltest farki végét pedig – a fent leírtak szerint – 10 %-os semleges pufferolt formalinba.
- (2) Miután a haltestet 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyeztük, csipesszel fogjuk meg az anális úszó anterior régióját és tartjuk meghajlítva körülbelül 30 másodpercig, hogy az anális úszó nyitva maradjon. Az anális úszó csipesszel való megfogása során csak néhány úszósugarat fogjunk meg az anterior régióban, ügyelve arra, hogy ne karcoljuk meg a papilláris nyúlványokat.
- (3) Miután körülbelül 30 másodpercig nyitva tartottuk az anális úszót, a haltestet a papilláris nyúlványok méréséig 10 %-os semleges pufferolt formalinban tároljuk szobahőmérsékleten (a mérést legalább 24 órával a rögzítés után kell elvégezni).

Mérés

- (1) Miután a hal testét legalább 24 órán keresztül fixáltuk 10 %-os semleges pufferelt formalinban, vegyük ki a haltestet a kúpos csőből, és a formalint szűrőpapírral (vagy papírtörölővel) töröljük le.
- (2) Helyezzük el a halat hassal felfelé. Kisméretű boncolóollóval óvatosan vágjuk le az anális úszót (célszerű az anális úszót a pterygiophorus kis darabjával együtt levágni).
- (3) Csipesszel fogjuk meg a levágott anális úszót az elülső régióban, és néhány csepp vízzel helyezzük egy üveg tárgylemezre. Ezután fedjük le az anális úszót egy üveg fedőlemezzel. Vigyázzunk, hogy ne karcoljuk meg a papilláris nyúlványokat, amikor megfogjuk az anális úszót a csipesszel.
- (4) A számláló segítségével számoljuk meg a papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezeket biológiai mikroszkóp alatt (álló mikroszkóp vagy inverz mikroszkóp). A papilláris nyúlványt akkor fogadjuk el, ha egy kis nyúlvány kialakulása látható az összekapcsolódott lemez hátsó szélén. Jegyezzük fel a munkalapra a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezek számát minden úszósugáron (pl. első úszósugár: 0, második úszósugár: 10, harmadik úszósugár: 12, stb.), és halanként jegyezzük fel ezeknek a számoknak az összegét az Excel-munkalapon. Szükség esetén fényképezzük le az anális úszót és a fényképen számoljuk meg a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezeket.
- (5) A mérés után tárolás céljából helyezzük az anális úszót az (1) pontban leírt a kúp alakú csőbe.

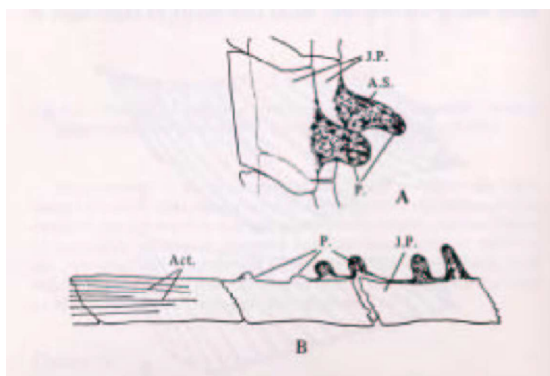
1. ábra

Az anális úszó alakjában és méretében megfigyelhető ivarok közötti különbséget bemutató ábra. A: hím; B: nőstény. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



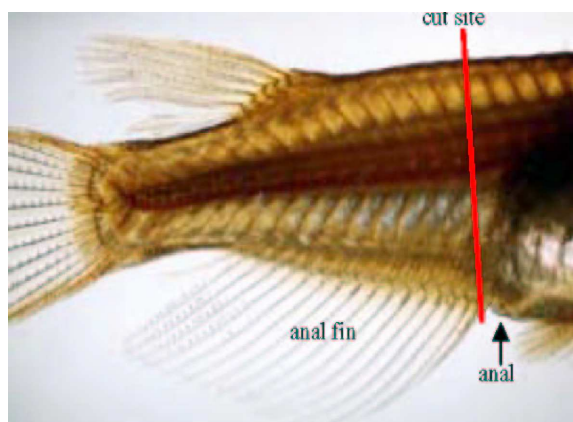
2. ábra

A: nyúlványok az anális úszósugár összekapcsolódott lemezein. J.P.: összekapcsolódott lemez; A.S.: axiális tér; P.: nyúlvány. B: az úszósugár distális vége. Actinotrichia (Act.) az úszósugár hegyén. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



3. ábra

A hal testéről készült fénykép a kettévágás helyével, amelyet az ivarmirigy 10 %-os semleges puffertelt formalintól eltérő fixálóoldatban való rögzítése esetén kell elvégezni. Ebben az esetben a testet az anális úszó anterior régiója és a végbélnyílás között borotva segítségével kettévágjuk (piros vonal), majd a haltest feji része az ivarmirigy-fixálóoldatba, míg a haltest farki része 10 %-os semleges puffertelt formalinba kerül.



6. függelék

A vitellogeninanalízis céljára ajánlott mintavételi eljárások

Ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a hímekből és nőstényekből vett VTG-minták közötti keresztszennyeződést.

1A. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel farokvénából/-artériából

Érzéstelenítés után a faroktövet szikével részben átvágjuk, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel vért gyűjtünk a farokvénából/-artériából. Miután a vért levettük, a vérplazmát 3 percig 15 000 g -vel (vagy alternatív megoldásként 10 percig 15 000 g -vel 4 °C-on) történő centrifugálással gyorsan elkülönítjük. Centrifugálás után szükség esetén meg lehet határozni a százalékos hematokritértéket. A plazmarészt ezután eltávolítjuk a mikrohematokrit csőből, és 0,13 egység aprotinin (proteáz-inhibitor) hozzáadása után a vitellogeninmeghatározás elvégzéséig centrifugácsoljuk, -80 °C hőmérsékleten tároljuk. A begyűjtendő vérplazmatérfogat az amerikai cselle méretétől függően (ami ivarfüggő) általában 5–60 mikroliter/hal (Jensen és munkatársai, 2001).

1B. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel szívből

Alternatív megoldásként a vért szívpunkcióval is gyűjthetjük heparinnal kezelt fecskendő használatával (1 000 egység heparin/ml). A vért (jégen tartott) Eppendorf-csövekbe töltjük át, majd centrifugáljuk (5 perc, 7 000 g, szobahőmérséklet). A vérplazmát tiszta Eppendorf-csövekbe töltjük át (aliquotokban, ha a vérplazma térfogata ezt lehetővé teszi), majd -80 °C-on azonnal lefagyaszthatjuk és az analízisig így tároljuk (Panter és munkatársai, 1998).

2A. eljárás: Japán fogasponty, a máj kimetszése a fogasponty esetében

A vizsgálati halak eltávolítása a vizsgálati kamrából

- (1) A vizsgálati halakat kis merítőhálóval kell eltávolítani a vizsgálati kamrából. Vigyázzunk, hogy ne ejtsük bele a vizsgálati halakat egy másik vizsgálati kamrába.
- (2) A vizsgálati halakat elvileg a következő sorrendben kell eltávolítani: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, közepes koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll. Ezenkívül az összes hím el kell távolítani a vizsgálati kamrából, mielőtt a nőstények eltávolítására sor kerülne.
- (3) A vizsgálati halak ivarát a külső másodlagos nemi jellegek alapján állapíthatjuk meg (pl. az anális úszó alakja).
- (4) Tegyük a vizsgálati halakat egy szállítótartályba és vigyük át a máj kimetszésére szolgáló munkaállomásra. Ellenőrizzük, hogy a vizsgálati kamra és a szállítótartály címkéje pontos adatokat tartalmaz-e, illetve erősítsük meg, hogy a vizsgálati kamrából eltávolított halak száma és a kamrában maradó halak száma összhangban van-e az elvárttal.
- (5) Ha az ivart a halak külső megjelenése alapján nem lehet azonosítani, távolítsuk el az összes halat a vizsgálati kamrából. Ebben az esetben az ivart az ivarmirigy vagy a másodlagos nemi jellemzők sztereomikroszkóp alatti megfigyelésével kell meghatározni.

A máj kimetszése

- (1) A vizsgálati halat kis merítőhálóval helyezzük át a szállítótartályból az érzéstelenítő oldatba.
- (2) Érzéstelenítés után csipesszel (kereskedelmi forgalomban kapható típus) helyezzük át a szűrőpapírra (vagy papírtörőre). A vizsgálati halat a fej két oldalán fogjuk meg a csipesszel, hogy elkerüljük a farok eltörését.
- (3) Töröljük le a vizet a szűrőpapírral (vagy a papírtörővel) a vizsgálati hal testének felületéről.
- (4) Helyezzük el a halat hassal felfelé. Boncolóollóval készítsünk egy kis keresztirányú bemetszést félúton a ventrális nyaki régió és a középszi régió között.

- (5) Vezessük be a boncolóollót a kis bemetszésbe, majd a kopoltyúfedőtől kaudális irányban elhelyezkedő ponttól a végbélnyílás kraniális széléig vágjuk fel a hasat a has középvonala mentén. Vigyázzunk, hogy ne vezessük be túl mélyen a boncolóollót, nehogy károsodjon a máj és az ivarmirigy.
- (6) A következő műveleteket sztereomikroszkóp alatt végezzük.
- (7) Tegyük a vizsgálati halat hassal felfelé a papírtörlőre (üveg Petri-csésze vagy tárgylemez is rendelkezésre áll).
- (8) Precíziós csipesszel húzzuk szét a hasüreg falait, és tárjuk fel a belső szerveket. Szükség esetén az is elfogadható, ha a belső szerveket a hasüreg egyik falának eltávolításával tárjuk fel.
- (9) Egy másik precíziós csipesszel tárjuk fel a máj és az epehólyag kapcsolódó részét. Ezután fogjuk meg az epevezeteket, és vágjuk le az epehólyagot. Vigyázzunk, nehogy kilyukasszuk az epehólyagot.
- (10) Fogjuk meg a nyelőcsövet, és ugyanígy vágjuk le a gyomor-bél traktust a májról. Vigyázzunk, nehogy kiszivároogjon a gyomor- és béltartalom. Vágjuk le a kaudális gyomor-bél traktust a végbélnyílásról, és távolítsuk el a hasüregből.
- (11) Metsszük le a zsírt és az egyéb szöveteket a májperifériáról. Vigyázzunk, nehogy felsértsük a májat.
- (12) Fogjuk meg a máj portális területét a precíziós csipesszel, és távolítsuk el a májat a hasüregből.
- (13) Helyezzük a májat a tárgylemezre. Szükség esetén a máj felületéről precíziós csipesszel távolítsunk el minden további zsírt és külső szövetet (pl. hasüreget bélelő szövetek).
- (14) Elektronikus analitikai mérlegen mérjük meg a máj tömegét 1,5 ml-es mikrocsővel mint tárával együtt. Jegyezzük fel az értéket a munkalapra (leolvasás: 0,1 mg) Jegyezzük fel az azonosító adatokat a mikrocső címkéjére.
- (15) Zárjuk le a májat tartalmazó mikrocső kupakját. Hűtőrácsra (vagy fagyasztócső-tartóállványon) tároljuk.
- (16) A máj kimetszése után tisztítsuk meg a boncolóeszközöket vagy cseréljük le azokat tiszta eszközökre.
- (17) A szállítótartályban található minden halból távolítsuk el a májat a fent leírtak szerint.
- (18) Miután a szállítótartályban lévő összes halból kivágtuk a májat (azaz az adott vizsgálati kamrából származó minden hím- vagy nőstényből), helyezzük az összes májmintát azonosító címkével ellátva egy csőtartó állványra, és fagyasztóban tároljuk. Ha a májakat kimetszés után nem sokkal előkezelésre bocsátjuk, a mintadarabokat hűtőállványon (vagy fagyasztócső-tartóállványon) vigyük át a következő munkaállomásra.

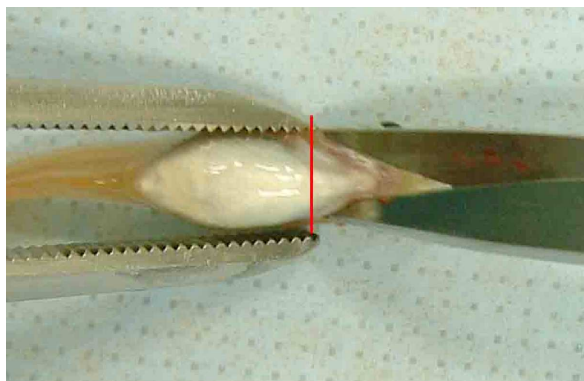
A hal teste a máj kimetszését követően felhasználható a másodlagos nemi jelleg vizsgálatára.

Mintadarab

Ha a vizsgálati halakból vett májmintákat röviddel a kimetszés után nem használjuk fel előkezelésre, akkor ≤ -70 °C-on kell azokat tárolni.

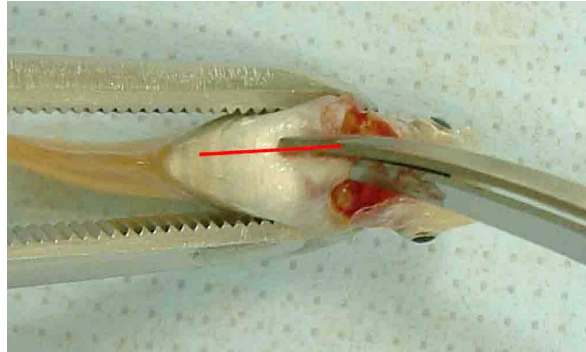
1. ábra

Ollóval egy bemetszést készítünk közvetlenül a mellúszók előtt.



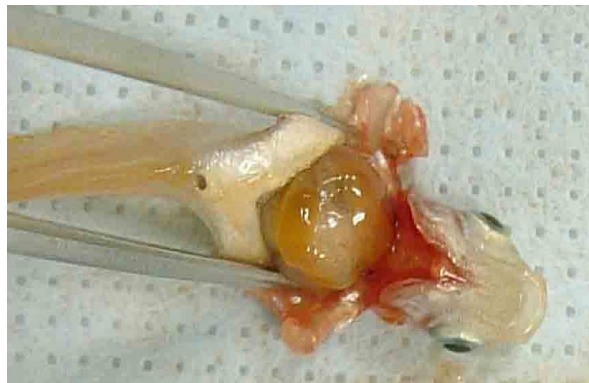
2. ábra

A has középvonalát a végbélnyílástól körülbelül 2 mm-re kranialisan elhelyezkedő pontig ollóval felvágjuk.



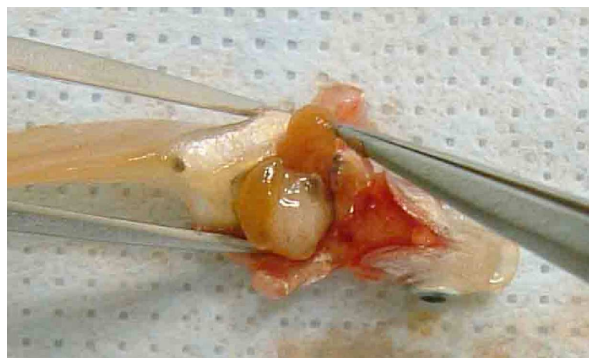
3. ábra

A hasfalat a máj és az egyéb belső szervek szabaddá tétele céljából fogóval kitárjuk. (Alternatív megoldásként a hasfalat oldalra is le lehet tűzni.)



4. ábra

A májat fogóval tompán feltárjuk és kimetesszük.



5. ábra

A beleket fogóval óvatosan visszahúzzuk.



6. ábra

A belek mindkét végét és a mesenterialis függelékeket ollóval elvágjuk.



7. ábra (nőstény)

Az eljárás a nőstények esetében is ugyanaz.



8. ábra

A befejezett eljárás.

**2B. eljárás: Japán fogaspony (*Oryzias latipes*), a máj előkezelése vitellogeninanalízishez**

Vegyük ki a homogenizáló puffert az ELISA-készletből, és zúzott jéggel hűtsük le (az oldat hőmérséklete: ≤ 4 °C). Ha az Enbio ELISA rendszer homogenizáló puffert használjuk, az oldatot szobahőmérsékleten olvasszuk fel, majd a palackot zúzott jéggel hűtsük le.

A májhoz szükséges homogenizáló puffer térfogatát a máj tömege alapján számítsuk ki (a homogenizátum elkészítéséhez egy mg májhoz 50 μ l homogenizáló puffert kell adni). Például ha a máj tömege 4,5 mg, a májhoz adandó homogenizáló puffer mennyisége 225 μ l. Készítsünk egy listát a májához szükséges homogenizáló puffer térfogatáról.

A máj előkészítése az előkezeléshez

- (1) A májat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsovet közvetlenül az előkezelés előtt vegyük ki a fagyasztóból.
- (2) A vitellogeninszennyeződés megelőzése érdekében a hímekből származó májak előkezelését a nőstényekből származó májak előkezelése előtt kell elvégezni. Ezen túlmenően a vizsgálati csoportok előkezelését a következő sorrendben kell lefolytatni: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, középső koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll.
- (3) A fagyasztóból egy adott időpontban kivett – májmintákat tartalmazó – 1,5 ml-es mikrocsovek száma nem haladhatja meg az abban az időpontban lecentrifugálható mikrocsovek számát.
- (4) A májmintákat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsoveket a mintadaraboknak a fagyasztócső-tartóállványon használt sorszámai szerinti sorrendben rendezzük el (a májakat nem kell felolvasztani).

Az előkezelés végrehajtása

1. A homogenizáló puffer hozzáadása

- (1) Ellenőrizzük a listán a homogenizáló puffernek az adott májmintához használandó térfogatát és állítsuk be a mikropipettát (térfogattartomány: 100–1 000 μ l) a megfelelő térfogatra. Csatlakoztassunk egy tiszta hegyet a mikropipettához.
- (2) Szívjuk fel a homogenizáló puffert a reagenspalackból, és adjuk hozzá a puffert a májat tartalmazó 1,5 ml mikrocsovéhez.
- (3) A májat tartalmazó valamennyi 1,5 ml-es mikrocsovéhez adjuk hozzá a homogenizáló puffert a fent leírt eljárás szerint. A mikropipetta hegyét nem kell kicserélni. Ha azonban a pipettahegy szennyezett vagy feltehetően szennyezett, a hegyet ki kell cserélni.

2. A máj homogenizálása

- (1) A homogenizáláshoz csatlakoztassunk egy új mozsártörőt a mikrocső-homogenizátorhoz.
- (2) Vezessük be a mozsártörőt a 1,5 ml-es mikrocsőbe. Tartsuk úgy a mikrocső-homogenizátort, hogy a májat a mozsártörő felülete és a 1,5 ml-es mikrocső belső fala közé préselje.
- (3) Kapcsoljuk be a mikrocső-homogenizátort 10–20 másodpercre. A művelet során zúzott jéggel hűtsük a 1,5 ml-es mikrocövet.
- (4) Emeljük ki a mozsártörőt a 1,5 ml-es mikrocsőből, és hagyjuk a csövet körülbelül 10 másodpercig nyugalomban. Ezután vizuálisan ellenőrizzük a szuszpenzió állapotát.
- (5) Ha májdarabok figyelhetők meg a szuszpenzióban, ismételjük meg a (3) és (4) műveletet, hogy kielégítő minőségű májhomogenizátumot készíthessünk.
- (6) A centrifugálásig jégállványon hűtsük a szuszpendált májhomogenizátumot.
- (7) A mozsártörőt minden homogenizátumhoz újra kell cserélni.
- (8) Az összes májat homogenizáljuk a homogenizáló pufferrel a fent leírt eljárás szerint.

3. A szuszpendált májhomogenizátum centrifugálása

- (1) Ellenőrizzük a hűtött centrifugakamra hőmérsékletét ($\leq 5\text{ °C}$).
- (2) Helyezzük be a szuszpendált májhomogenizátumot tartalmazó 1,5 ml-es mikrocöveket a hűtött centrifugába (egyensúlyozzuk ki, ha szükséges).
- (3) A szuszpendált májhomogenizátumot 10 percig centrifugáljuk $\leq 5\text{ °C}$ hőmérsékleten 13 000 g-vel. Ugyanakkor ha a felülúszók megfelelően elválnak, a centrifugálás sebességét és időtartamát szükség szerint módosítani lehet.
- (4) A centrifugálás után ellenőrizzük, hogy a felülúszók megfelelően elkülönültek-e (felszín: lipid, középső réteg: felülúszó, alsó réteg: májszövet). Ha az elkülönülés nem megfelelő, azonos körülmények mellett ismét centrifugáljuk le a szuszpenziót.
- (5) Távolítsunk el minden mintadarabot a hűtött centrifugából, és helyezzük el azokat a fagyasztócső-tartóállványon a mintadarabok sorszámanak megfelelően. Vigyázzunk, nehogy a centrifugálás után újraszuszpendáljuk a már elválasztott rétegeket.

4. A felülúszó gyűjtése

- (1) Helyezzünk a csőtartó állványba négy db 0,5 ml-es mikrocövet a felülúszó tárolására.
- (2) Mikropipettával vegyünk ki 30 μl -t minden felülúszóból (a középső rétegben különül el), és töltsük át egy 0,5 ml-es mikrocsőbe. Vigyázzunk, hogy ne szívjuk fel a felszínen található lipidet vagy az alsó réteg található májszövetet.
- (3) A fentebb leírtakkal megegyező módon gyűjtjük össze a felülúszót, és töltsük át két másik 0,5 ml-es mikrocsőbe.
- (4) Gyűjtjük össze a maradék felülúszót a mikropipettával (lehetőség szerint: $\geq 100\text{ }\mu\text{l}$). Ezután töltsük a felülúszót a fennmaradó 0,5 ml-es mikrocsőbe. Vigyázzunk, hogy ne szívjuk fel a felszínen található lipidet vagy az alsó réteg található májszövetet.
- (5) Zárjuk le a 0,5 ml-es mikrocső kupakját, és írjuk rá a címkére a felülúszó térfogatát. Ezután azonnal hűtsük le a mikrocöveket a fagyasztócső-tartóállványon.
- (6) A mikropipetta hegyét minden felülúszónál cseréljük újra. Ha nagy mennyiségű lipid halmozódik fel a mikropipetta hegyén, a májkivonat zsírral való szennyeződésének elkerülése érdekében azonnal cseréljük le egy új hegyre.

- (7) Az összes lecentrifugált felülúszót osszuk szét négy 0,5 ml-es mikrocsőbe a fent leírt eljárás szerint.
- (8) Miután szétöntöttük a felülúszót a 0,5 ml-es mikrocsővekbe, helyezük az azonosító címkével ellátott mikrocsőveket a csőtartó állványba, majd fagyasztóban azonnal fagyasszuk őket le. Ha a VTG koncentrációját az előkezelés után azonnal megmérjük, tartunk egy, a csőtartó állványban elhelyezkedő 0,5 ml-es mikrocövet (a 30 µl felülúszót tartalmazó csövet) hűvös állapotban, és vigyük át arra a munkaállomásra, ahol az ELISA-vizsgálatot fogjuk végezni. Ebben az esetben a többi mikrocövet helyezük a csőtartó állványba, és fagyasszuk le fagyasztóban.
- (9) A felülúszó begyűjtését követően a maradékot megfelelően semmisítjük meg.

A minta tárolása

A májhomogenizátum felülúszóját tartalmazó 0,5 ml-es mikrocsőveket az ELISA-vizsgálatban történő felhasználásig ≤ -70 °C-on tároljuk.

3A. eljárás: Zebradánió, vérvétel farokvénából/-artériából

A faroktövet közvetlenül az érzéstelenítés után keresztben átvágjuk, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláris-csővel felfogjuk a vért a farokvénából/-artériából. A vér térfogata a hal méretétől függően 5–15 µl. A mikrokapilláris-csőbe azonos térfogatú aprotinin puffert (6 µg/ml PBS-ben) adunk, és a vérplazmát centrifugálással (5 perc, 600 g) szeparáljuk a vérből. A vérplazmát a kémcsövekben gyűjtjük össze, és a vitellogenin vagy az egyéb vizsgált fehérjék analíziséig -20 °C-on tároljuk.

3B. eljárás: Zebradánió, vérvétel szívpunkcióval

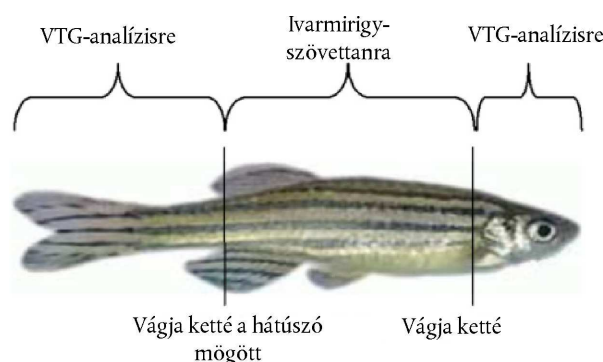
A véralvadás és a fehérjék lebomlásának elkerülése érdekében a mintákat heparint (1 000 egység/ml) és aprotinin proteázinhibitort (2 TIU/ml) tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) gyűjtjük. A puffer összetevőjeként heparin-ammóniumsó és liofilizált aprotinin használata ajánlott. A vérvétel céljára fecskendő (1 ml) használata ajánlott rögzített vékony tűvel (pl. Braun Omnikan-F). A fecskendőt előre meg kell tölteni a pufferrel (körülbelül 100 µl), hogy teljesen feloldja a halakból származó kis vértérfogatokat. A vérmintát szívpunkcióval vesszük. Először a halat MS-222 oldattal (100 mg/l) érzéstelenítjük. Megfelelő érzéstelenítéssel kivehetővé válik a zebradánió szívverése. A szív megszurása közben enyhe nyomást fejtünk ki a fecskendő dugattyújára. A begyűjtendő vértérfogat 20–40 mikroliter között van. A szívpunkció után a vér-puffer keveréket a kémcsőbe töltjük. A vérplazmát a vérből centrifugálással (20 perc, 5 000 g) különítjük el, és az analízisig -80 °C-on tároljuk.

3C. eljárás: Szabványos eljárás: Zebradánió, fej/farok homogenizátum készítése

- (1) A halakat a vizsgálati leírásnak megfelelően érzéstelenítjük és túlaltatjuk.
- (2) A halak fejét és farkát az 1. ábrának megfelelően levágjuk.

Fontos megjegyzés: A nem indukált hímek nőtényektől vagy indukált hímektől eredő »vitellogeninszennyeződésének« megelőzése céljából a boncolóeszközöket, valamint a vágódeszkát az egyes halak kezelése között le kell öblíteni és alaposan meg kell tisztítani (pl. 96 %-os etanollal).

1. ábra



- (3) Az egyes halak fejének és farkának együttesen mért tömegét a legközelebbi mg-ra kerekítjük.
- (4) A mérés után a testrészek megfelelő (pl. 1,5 ml-es Eppendorf-) csövekbe kerülnek, és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on homogenizálódásig fagyasztjuk, vagy jégen két műanyag bibével közvetlenül homogenizáljuk azokat. (Más módszerek is használhatók, ha azokat jégen végezzük, és homogén tömeget eredményeznek). Fontos megjegyzés: A csöveket megfelelően meg kell számozni, hogy az adott halból származó fejet és farkat össze lehessen kapcsolni az ivarmirigy szövettani vizsgálatához használt megfelelő törzsdarabbal.
- (5) Ha homogén masszát kaptunk, a szövet tömegének 4-szeresét kitevő mennyiségű jéghideg homogenizáló puffert (*) adunk hozzá. Dolgozzunk tovább a bibékkal, amíg a keverék homogén nem lesz. Fontos megjegyzés: Minden halhoz új bibét kell használni.
- (6) A mintákat a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 50 000 g-vel 30 percig zajló centrifugálásig jégre tesszük.
- (7) A felülúszóból pipettával vigyünk át 20 μl térfogatú adagokat legalább két csőbe úgy, hogy a pipetta hegyét merítsük a felületen lévő zsírréteg alá és óvatosan szívjuk fel a zsír- vagy pelletfrakció nélküli felülúszót.
- (8) A csöveket felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk.

(*) **Homogenizáló puffer:**

- (50 mmol trisz-HCl, pH 7,4; 1 % proteázgátló koktél (Sigma)): 12 ml trisz-HCl pH = 7,4 + 120 μl proteázgátló koktél.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) pl. Bie & Berntsen, Dánia.
- Proteázgátló koktél: Sigmából (emlőszövetekhez) Termékszám P 8340.
- *Megjegyzés:* A homogenizáló pufferoldatot a készítés napján fel kell használni. Használat közben helyezzük jégre.

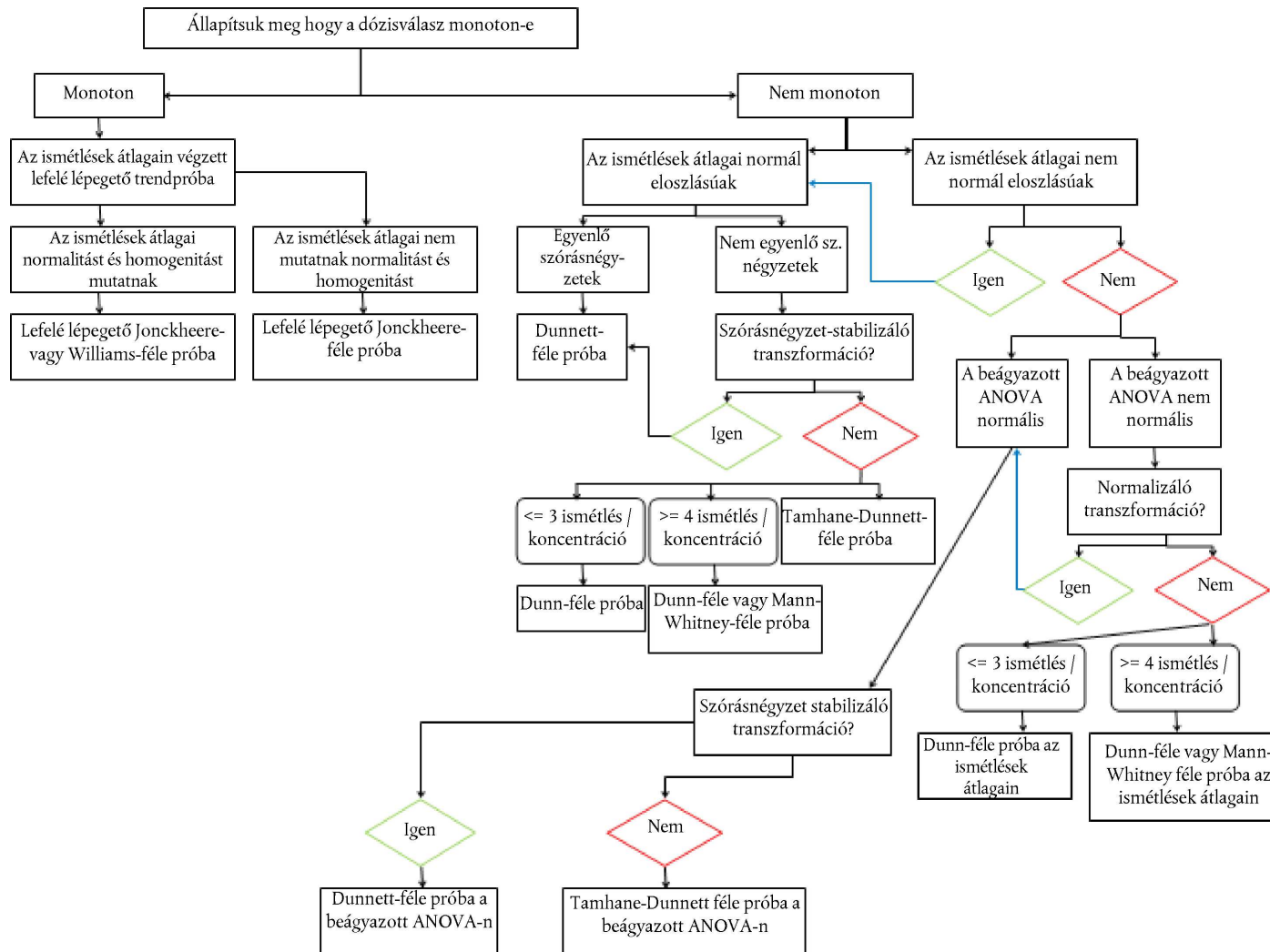
*7. függelék***Dúsított vitellogeninminták és inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard**

Minden olyan napon, amikor vitellogeninvizsgálatokat végzünk, egy inter-assay referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálunk. Az inter-assay referenciastandard készítéséhez használt vitellogeninnek az elvégzendő vizsgálat céljára készített kalibrációs standardokban használt vitellogenintől eltérő tételből kell származnia.

A dúsított minta ismert mennyiségű inter-assay standardnak egy kontrollhím vérplazmájából vett mintához történő hozzáadásával készül. A mintát azért kell feldúsítani, hogy a vitellogenin koncentrációja elérje a kontrollcsoportban lévő hím halakban várható vitellogeninszint 10–100-szorosát. A kontrollhím vérplazmájából vett dúsítandó minta származhat egyetlen halból vagy lehet több halból származó kompozit minta is.

A kontrollhímből vett vérplazma nem dúsított részmintáját legalább két lyukban analizáljuk. A dúsított mintát is legalább két lyukban analizáljuk. A várható koncentráció meghatározásához a vitellogeninnek a kontrollhím vérplazmájából vett két nem dúsított mintában mért átlagos mennyiségét hozzá kell adni a dúsított mintákhoz adott vitellogenin számított mennyiségéhez. E várható koncentrációnak a mért koncentrációhoz viszonyított arányát az adott napon elvégzett valamennyi vizsgálat eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell.

Döntési folyamatábra a statisztikai elemzési módszer kiválasztásához



C.38. KÉTÉLTŰ-ÁTALAKULÁSI VIZSGÁLAT**BEVEZETÉS**

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 231. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. A gerinces fajok pajzsmirigyrendszerében aktív vegyi anyagok kimutatására alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy egyes vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségben káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrését és vizsgálatát célzó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított. E tevékenység egyik eleme a gerinces fajok pajzsmirigyrendszerére ható vegyi anyagok kiszűrésére vonatkozó vizsgálati iránymutatás kidolgozása volt. A rágcslókon végzett ismételt adagolású, 28 napos orális toxicitási vizsgálat (e melléklet B.7. fejezete) továbbfejlesztését, és a kétéltű-átalakulási vizsgálat (AMA) bevezetését egyaránt javasolták. A továbbfejlesztett B.7. vizsgálati módszert validálási eljárásnak vetették alá, és kiadták a felülvizsgált vizsgálati módszert. A kétéltű-átalakulási vizsgálat (AMA) laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokból álló alapos ellenőrzési programon esett át, amely igazolta a vizsgálat relevanciáját és megbízhatóságát (1, 2). Ezt követően a vizsgálat validálását egy független szakértőkből álló testület szakértői értékelésének vetették alá (3). Ez a vizsgálati módszer a pajzsmirigyre ható vegyi anyagok kimutatására szolgáló validálási vizsgálatok során szerzett tapasztalatok, illetve az OECD más tagországaiban végzett munka eredménye.

A VIZSGÁLAT ELVE

2. A kétéltű-átalakulási vizsgálat (Amphibian Metamorphosis Assay, AMA) egy szűrővizsgálat, amelynek célja, hogy empirikusan azonosítsa azokat a vegyi anyagokat, amelyek megzavarhatják a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely normális működését. Az AMA egy általánosított gerinces modell abban a tekintetben, hogy a HHP-tengely konzervált struktúráin és funkcióin alapul. Ez egy fontos vizsgálat, mivel a kétéltűek átalakulása olyan – alaposan tanulmányozott, pajzsmirigyfüggő – folyamat, amely reagál a HHP-tengely mentén ható vegyi anyagokra, és ez az egyetlen létező vizsgálati eljárás, amely kimutatja a pajzsmirigyhormon-aktivitást a morfológiai fejlődésen áteső állatokban.
3. Az általános vizsgálati terv keretében 51. stádiumban lévő *Xenopus laevis* ebihalakat tesznek ki a vizsgált vegyi anyag legalább három különböző koncentrációjának és hígítóvizet kontrollnak 21 napon keresztül. Minden vizsgálati kezelés négy ismétlésből áll. A lárvasűrűség a vizsgálat kezdetén minden kezelési csoportban 20 ebihal vizsgálati tartályonként. A megfigyelt végpontok a hátsó végtagok hossza, a fark nélküli testhossz, a fejlődési stádium, a nedves tömeg, a pajzsmirigy szövettana és a naponta megfigyelt mortalitási arány.

A MÓDSZER LEÍRÁSA**A vizsgálatához használt faj**

4. A *Xenopus laevis* fajt világszerte rutinszerűen tenyésztik a laboratóriumokban, és könnyen beszerezhető kereskedelmi forgalomban is. A szaporodás e faj esetében egész évben könnyen kiváltható humán koriogonadotropin (HCG) injekcióval, és az így kapott nagyszámú lárva rutinszerűen fel lehet nevelni a kiválasztott fejlődési stádiumig, ami lehetővé teszi a stádiumspecifikus vizsgálati protokollok használatát. Előnyös, ha a vizsgálatához használt lárva házon belül nevelt felnőtt egyedektől származnak. Alternatív megoldásként – bár nem ez az előnyben részesítendő eljárás – a peték vagy az embriók máshonnan is a vizsgálatot végrehajtó laboratóriumba szállíthatók, majd ott akklimatizálhatók; a lárvastádiumban lévő vizsgálati egyedek szállítása azonban nem elfogadható.

Berendezések és kellékek

5. A következő berendezések és kellékek szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:
 - a) Expozíciós rendszer (lásd az alábbi leírást);
 - b) Üveg- vagy rozsdamentes acél akváriumok (lásd az alábbi leírást);
 - c) Tenyésztőtartályok;
 - d) Hőmérséklet-szabályozó készülék (pl. fűtőtestek vagy hűtőberendezések (22 ± 1 °C-ra beállítható));

- e) Hőmérő;
- f) Binokuláris preparálómikroszkóp;
- g) Legalább 4 megapixel felbontású és mikrofunkcióval rendelkező digitális fényképezőgép;
- h) Képdigitalizáló szoftver;
- i) Petri-csésze (pl. 100 × 15 mm) vagy hasonló méretű átlátszó műanyag kamra;
- j) 3 tizedesjegyre mérni képes analitikai mérleg (mg);
- k) Készülék az oldott oxigén mérésére;
- l) pH-mérő;
- m) Lux egységek mérésére képes fényerősségmérő;
- n) Különböző laboratóriumi üvegedények és eszközök;
- o) Állítható pipetták (10–5 000 µl) vagy ezzel megegyező méretű, válogatott pipetták;
- p) A vizsgált vegyi anyag a vizsgálat elvégzéséhez elegendő mennyiségben, lehetőleg egy tétel;
- q) A vizsgált vegyi anyagnak megfelelő analitikai műszerek vagy szerződött analitikai szolgáltatók.

Kémiai vizsgálhatóság

6. Az AMA vizes expozíciós protokollon alapul, melynek során a vizsgált vegyi anyag átfolyós rendszeren át kerül be a vizsgálati kamrákba. Az átfolyós módszerek azonban – a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai alapján – korlátozzák a vizsgálható vegyi anyagok körét. Ezért e protokoll használata előtt be kell gyűjteni a vegyi anyagra vonatkozó, a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából releváns alapszempontokat, illetve tanulmányozni kell »A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata« című OECD-iránymutatást (4). A vegyi anyag vizes rendszerekben való nehéz vizsgálhatóságára utaló jellemzők közé tartozik a magas oktanol-víz megoszlási hányados ($\log K_{ow}$), a magas illékonyosság, a hidrolízisre való hajlam és a fotolízálásra való hajlam laboratóriumi környezeti fényviszonyok mellett. Egyéb tényezők is fontosak lehetnek a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából, amelyeket eseti alapon kell meghatározni. Ha a vegyi anyag átfolyós vizsgálati rendszerben sikeresen nem vizsgálható, statikus megújítási rendszer is alkalmazható. Ha a vizsgált vegyi anyaggal egyik rendszer sem egyeztethető össze, akkor alapértelmezés szerint a vegyi anyag nem vizsgálható ezzel a protokollal.

Expozíciós rendszer

7. Lehetőség szerint az átfolyós hígítórendszert kell előnyben részesíteni a statikus megújítási rendszerrel szemben. Ha a vizsgált vegyi anyagok bármelyikének fizikai és/vagy kémiai tulajdonságai nem megfelelőek az átfolyós hígítórendszerhez, akkor eltérő expozíciós rendszer (pl. statikus megújítási rendszer) alkalmazható. A rendszer vízzel érintkező elemeinek üvegből, rozsdamentes acélból és/vagy politetrafluor-etilénből kell készülnie. Ugyanakkor a célnak megfelelő műanyagokat is lehet használni, ha azok nem veszélyeztetik a vizsgálatot. Expozíciós tartályként üvegből vagy rozsdamentes acélból készült, feltöltőcsővel felszerelt akváriumot kell használni, megközelítőleg 4,0 és 10,0 liter közötti tartálytérfogattal és 10–15 cm minimális vízmélységgel. A rendszernek képesnek kell lennie valamennyi expozíciós koncentráció és a kontroll számára megfelelő feltételeket biztosítani, kezelésként négy ismétlésben. Az egyes tartályok áramlási sebességének állandónak kell lennie a biológiai feltételek, valamint a vegyi anyaggal történő expozíció fenntartása (pl. 25 ml/perc) érdekében. Az expozíciós rendszeren belül a kezelési tartályokat véletlenszerűen kell egy-egy térbeli pozícióhoz rendelni, hogy csökkenteni lehessen a pozícióból fakadó lehetséges hatásokat, köztük a hőmérséklet, a fényerő stb. enyhe eltéréseit. Fluoreszcens megvilágítást kell alkalmazni 12-12 órás megvilágítási időszak mellett, 600–2 000 lux (lumen/m²) vízfelszínen mért fényerővel. A vizsgálati tartályokban a víz hőmérsékletét 22 ± 1 °C-on, a pH-t 6,5 és 8,5 között, az oldott oxigén koncentrációját pedig $> 3,5$ mg/l-es (a levegőteltettség > 40 %) szinten kell tartani. A víz hőmérsékletét, pH-ját és az oldott oxigén koncentrációját legalább hetente kell mérni; a hőmérsékletet ajánlott legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan mérni. Az 1. függelék ismerteti azokat a vizsgálati feltételeket, amelyek mellett a protokollt végre kell hajtani. Az átfolyós expozíciós rendszerek és/vagy a statikus megújítási rendszerek felállítására vonatkozó további információkért olvassa el az ASTM »Vizsgálati anyagok akut toxicitási vizsgálata halakon, makroszkopikus gerincteleneken és kétéltűeken« című standard útmutatóját (5) és az általános vízi toxikológiai vizsgálatok leírását.

Vízminőség

8. Bármely olyan helyben elérhető víz (pl. forrásvíz vagy faszénen szűrt csapvíz) használható, amelyben az *X. laevis* ebihalak normálisan növekednek és fejlődnek. Mivel a helyi vízminőség területenként lényegesen eltérhet, a víz minőségét elemezni kell, különösen ha nem állnak rendelkezésre korábbi adatok a víz *Xenopus* fajok tenyésztésére való alkalmasságáról. Különös figyelmet kell fordítani arra, hogy a víz réztől, klórtól és klóraminoktól mentes legyen, mivel ezek mindegyike mérgező a békák és ebihalak számára. Ajánlott továbbá megmérni a vízben a fluorid, a perklorát és a klorát háttérkoncentrációját (az ivóvíz-fertőtlenítés melléktermékei), mivel az összes ilyen anion a pajzsmirigy jódtanszporterének szubsztrátuma, és magas szintjük zavarhatja a vizsgálat eredményét. Az elemzést a vizsgálat megkezdése előtt kell elvégezni, és a vizsgálati víznek rendes körülmények között mentesnek kell lennie ezektől az ionoktól.

A vizsgálati víz jodidkoncentrációja

9. Annak érdekében, hogy a pajzsmirigy hormonokat tudjon szintetizálni, elegendő jodidnak kell elérhetőnek lennie a lárvák számára a vízben és a táplálékforrásokban. A minimális jodidkoncentráció tekintetében jelenleg nem állnak rendelkezésre empirikus iránymutatások. A jodid elérhetősége hatással lehet a pajzsmirigynek a pajzsmirigyre ható anyagokkal szembeni válaszkészségére, és ismert az is, hogy a jodid módosítja a pajzsmirigy alapaktivitását, ami egy olyan szempont, amelyet figyelembe kell venni a pajzsmirigy kórszöveti eredményeinek értelmezésénél. Ezért a vizsgálati vízben mért jodidkoncentrációt a jegyzőkönyvben meg kell adni. A validálási vizsgálatokból nyert adatok alapján a protokoll bizonyítottan jól működik, ha a vizsgálati víz jodid- (I^-) koncentrációja 0,5 és 10 $\mu\text{g/l}$ között van. Ideális esetben a vizsgálati víz jodidkoncentrációja legalább 0,5 $\mu\text{g/l}$. Ha a vizsgálati víz ioncserélt vízből mesterségesen készített víz, legalább 0,5 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban jódot kell hozzáadni. A vizsgálati víz jóddal vagy más sóval történő bármilyen további kiegészítését fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben.

Az állatok tartása

A felnőtt állatok gondozása és tenyésztése

10. A felnőtt állatokat szabványos iránymutatások szerint kell gondozni és tenyésztetni; részletesebb információkért lásd a békaembrió teratogenezis vizsgálat (FETAX) szabványos útmutatóját (6). E szabványos iránymutatások példaként szolgálnak a megfelelő gondozási és tenyésztési módszerek tekintetében, de szigorú betartásuk nem kötelező. A párosodás kiváltása érdekében a felnőtt nőstény és hím párokat (3–5) humán koriogonadotropinnal (HCG-vel) oltjuk be. A nőstény példányokba körülbelül 800–1 000 NE, a hím példányokba körülbelül 600–800 NE 0,6–0,9 %-os sóoldatban feloldott HCG-t injektálunk. A tenyészpárokat az amplexus elősegítése érdekében nagy tartályokban, zavartalan, statikus körülmények között tartjuk. A tenyésztőtartályok alján rozsdamentes acél vagy műanyag hálóból készült álfeneknek kell lennie, amely lehetővé teszi, hogy a petecsomók a tartály aljára essenek. A késő délután beinjektált békák a petéik többségét általában a következő nap délelőttjére rakják le. Miután elegendő mennyiségű petét raktak le és termékenyítettek meg, a felnőtt példányokat el kell távolítani a tenyésztőtartályokból.

A lárvák gondozása és kiválasztása

11. Miután a felnőtt példányokat eltávolítottuk a tenyésztőtartályokból, összegyűjtjük a petéket és – a tenyésztőtartályokból vett embriók egy kisebb, reprezentatív csoportjának segítségével – értékeljük az életképességüket. Az embriók életképessége és a megfelelő számú (minimum 1 500) embrió megléte alapján a legjobbnak minősített petecsomót (csomókat) (a csomók minőségének értékeléséhez 2–3 csomó ajánlott) kell megőrizni. A vizsgálatban használt organizmusoknak ugyanabból a peterakási eseményből kell származniuk (azaz a petecsomókat nem lehet összekeverni). Az embriókat egy nagy lapos serpenyőbe vagy edénybe helyezük át, és a nyilvánvalóan elpusztult vagy kóros elváltozást mutató petéket (a fogalom meghatározását lásd az (5) pontban) pipettával vagy szemcseppentővel eltávolítjuk. A három petecsomóból származó egészséges embriókat három különálló keltetőtartályba helyezük át. A keltetőtartályokba történő áthelyezés után négy nappal az életképesség és a kikelés sikeressége alapján kiválasztjuk a legjobb petecsomót, és a lárvákat megfelelő számú, 22 ± 1 °C hőmérsékletű nevelőtartályba helyezük át. Ezenkívül további lárvákat helyezünk át külön tartályokba, amelyekkel pótoljuk az első héten esetlegesen elhullott egyedeket a nevelőtartályokban. Ezzel az eljárással fenntartható az állandó egyedsűrűség, és ezáltal csökkenthetők a fejlődési eltérések az egy csomóból származó állományon belül. A nevelőtartályokat a víz kiszivattyúzásával naponta tisztítjuk. Elővigyázatosságból latexkesztyű helyett lehetőleg vinil- vagy nitrilkesztyűt használunk. Az elhullott állatokat naponta el kell távolítani és az első héten pótolni kell a lárvákat a tartályokban az egyedsűrűség fenntartása érdekében. Az állatokat legalább naponta kétszer kell etetni.

12. Az ebihalakat az expozíciót megelőző fázisban hozzá kell szoktatni a tényleges expozíció szakaszában fennálló feltételekhez, beleértve a táplálék típusát, a hőmérsékletet, a világos és sötét időszakok váltakozását és a tenyésztőközeget. Ezért az expozíció előtti fázisban és az expozíciós fázisban ugyanazt a tenyésztő-/hígítóvizet ajánlott használni. Ha az ebihalak tartására az expozíció előtti fázisban statikus tenyésztési rendszert használunk, a tenyésztőközeget legalább hetente kétszer teljesen ki kell cserélni. Az expozíciót megelőző időszakban el kell kerülni a magas lárvasűrűség okozta zsúfoltságot, mert az ilyen hatások jelentősen befolyásolhatják az ebihalak fejlődését a következő vizsgálati fázisban. Ezért a nevelési sűrűség nem haladhatja meg a körülbelül négy ebihal/l tenyésztőközeg (statikus expozíciós rendszer esetén) vagy a 10 ebihal/l tenyésztőközeg értéket (például 50 ml/perc áramlási sebesség mellett az expozíció előtti vagy a tenyésztőrendszerben). Ilyen körülmények között az ebihalaknak a 45/46. stádiumból tizenkét napon belül tovább kell fejlődniük az 51. stádiumba. Az expozíció megfelelő kezdő időpontjának meghatározása érdekében naponta meg kell vizsgálni a törzsállományból kiválasztott reprezentatív ebihalak fejlődési stádiumát. Gondoskodni kell róla, hogy az ebihalakat a lehető legkisebb stressz és trauma érje, különösen az akváriumok mozgatása és takarítása, valamint a lárvák kezelése közben. Kerülni kell a stresszhatást kiváltó körülményeket/tevékenységeket, mint például a hangos és/vagy szakadatlan zajt, az akváriumok kopogtatását, az akváriumokban okozott rezgést, a túlzott laboratóriumi aktivitást, és a környezeti elemek (fényes időszakok, hőmérséklet, pH, oldott oxigénkoncentráció, a víz áramlási sebessége stb.) gyors változását. Ha az ebihalak a megtermékenyítést követő 17 napon belül nem érik el az 51. stádiumot, a túlzott stresszt kell potenciális oknak tekinteni.

A lárvák tenyésztése és táplálása

13. Az ebihalakat pl. a validálási vizsgálatok során használt kereskedelmi forgalomban kapható ebihaltáppal kell etetni (lásd az 1. függelék) az expozíciót megelőző teljes időszakban (a Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 45/46. stádiumban (8)), illetve a 21 napos vizsgálati időszak teljes időtartama alatt, vagy olyan egyéb táplálékkal, amelyről kimutatták, hogy alkalmazása mellett a kételtű-átalakulási vizsgálat azonos eredménnyel végezhető el. Az expozíciót megelőző időszakban az etetés rendjét körültekintően kell kialakítani, hogy az megfeleljen a fejlődő ebihalak igényeinek. Ez azt jelenti, hogy a frissen kikelt ebihalaknak naponta több alkalommal (legalább kétszer) kis adag táplálékot kell biztosítani. Kerülni kell a túlzott mennyiségű táplálékot i) a vízminőség fenntartása és ii) a kopoltyúlemezek táplálékreszecskékkel és törmelékkel való eltömődésének megelőzése érdekében. A validálási vizsgálatok során használt ebihaltáp esetében a napi fejadagot az ebihalak növekedésével párhuzamosan növelni kell, amíg az rövidebb idővel a vizsgálat megkezdése előtt el nem éri a mintegy 30 mg/állat/nap értéket. Erről a kereskedelmi forgalomban kapható tápról a validálási vizsgálatok kimutatták, hogy elősegíti az *X. laevis* ebihalak megfelelő növekedését és fejlődését, valamint finom por állagú, amelynek következtében hosszú ideig lebeg a vízoszlopban, illetve a vízáramlás kimossa. Ezért a teljes napi táplálékmeny-nyiséget kisebb részekre kell osztani, és az állatokat legalább naponta kétszer kell etetni. A tápra vonatkozó etetési rendet az 1. táblázat mutatja be. Az etetés gyakoriságát fel kell jegyezni. A tápot szárazon vagy hígítóvízzel készített törzsolatként lehet adagolni. Minden második nap friss törzsolatot kell elkészíteni, és azt használaton kívül 4 °C-on kell tárolni.

1. táblázat

X. laevis ebihalak kereskedelmi forgalomban kapható, a validálási vizsgálatok során használt ebihaltáppal való etetésének rendje az AMA élő állatokon végzett szakasza során, átfolyásos feltételek mellett

Vizsgálati nap	Fejadag (mg táp/állat/nap)
0–4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analitikai kémia

14. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált vegyi anyag oldhatóságára, lebomlására és illékonyására vonatkozó meglévő információk alapján értékelni kell az anyag stabilitását. A vizsgálat kezdetén (0. nap), majd a vizsgálat során hetente legalább négy oldatmintát kell venni minden egyes koncentráció esetében minden egyes párhuzamos tartályából analitikai kémiai elemzés céljára. A rendszer működésének ellenőrzése céljából javasolt minden vizsgálati koncentrációt a vizsgálat megkezdése előtt, a rendszer előkészítése során is analizálni. Ezenkívül ajánlott a törzsoldatokat cseréjük esetén is elemezni, különösen akkor, ha a törzsoldat térfogata nem biztosít elegendő mennyiségű vegyi anyagot a rutinszerű mintavételi periódusok teljes időtartamának áthidalására. Olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket a vizsgálatban használt néhány vagy egyetlen koncentrációban sem lehet kimutatni, a névleges koncentrációk kiszámítása érdekében a törzsoldatokat le kell mérni és fel kell jegyezni a rendszer áramlási sebességét.

A vegyi anyag bejuttatása

15. A vizsgált vegyi anyag rendszerbe történő bejuttatására alkalmazott módszer a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően változhat. A vízben oldódó vegyi anyagokat fel lehet oldani a vizsgálati víz alikvot részeiben olyan koncentrációban, amely lehetővé teszi a vegyi anyag kívánt vizsgálati koncentrációban történő bejuttatását az átfolyásos rendszerbe. A szobahőmérsékleten folyékony és vízben rosszul oldódó vegyi anyagokat folyadék-folyadék telítési módszerek segítségével lehet bejuttatni. A szobahőmérsékleten szilárd és vízben rosszul oldódó vegyi anyagokat üvegyapot oszlopszaturátorok használatával lehet bejuttatni (7). Előnyben kell részesíteni a hordozómentes vizsgálati rendszereket; a különböző vizsgált vegyi anyagok azonban változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ami valószínűleg eltérő megközelítést igényel a vegyi anyagoknak való expozíciót szolgáló víz elkészítése során. Az oldószereket vagy hordozókat előnyös elkerülni, mivel: i) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt endokrinológiai válaszokat idézhetnek elő, ii) a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, és iii) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű »biofilmképződést« eredményezhet, amely a mikrobiális tevékenységgel jár együtt. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben oldószert lehet alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell »A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata« című OECD-iránymutatást (4). A megfelelő oldószert a vegyi anyag tulajdonságai határozzák meg. A vízi toxikológiai vizsgálatok céljára alkalmasnak talált oldószerek közé tartozik az aceton, az etanol, a metanol, a dimetil-formamid és a trietilén-glikol. Ha oldószert-hordozót használunk, az oldószert koncentrációjának a krónikus megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) alatt kell lennie; az OECD-iránymutatás legfeljebb 100 µl/l koncentrációt javasol; egy közelmúltban megjelent tanulmány azonban 20 µl/l hígítóvíz oldószert-koncentrációt javasol (12). Ha oldószert-hordozót használunk, a nem oldószertes kontrollok (tisztá víz) mellett a megfelelő oldószertes kontrollokat is értékelni kell. Ha a vegyi anyagot fizikai-kémiai jellemzői (alacsony oldhatóság) vagy korlátozott kémiai elérhetősége miatt nem lehet vízen keresztül bejuttatni, mérlegelni lehet a táplálékon keresztüli bevitelt. A táplálékon keresztüli expozícióval kapcsolatban előzetes vizsgálatokat már végeztek, de ezt az expozíciós útvonalat nem használják széles körben. A módszer kiválasztását dokumentálni és analitikusan ellenőrizni kell.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

A vizsgálati koncentráció felső határértékének meghatározása

16. A vizsgálati koncentráció felső határértékét e vizsgálat esetében a vizsgált vegyi anyag oldhatósági határával, vagy – akut mérgező hatású vegyi anyagok esetében – a legnagyobb tolerálható koncentrációval (maximum tolerated concentration, MTC) megegyező értékben, vagy 100 mg/l értékben kell megállapítani, aszerint, hogy ezek közül melyik a legalacsonyabb.
17. Az MTC a vegyi anyag azon legnagyobb vizsgálati koncentrációja, amely kevesebb mint 10 % akut mortalitást eredményez. E megközelítés használatának előfeltétele, hogy rendelkezésre álljanak olyan empirikus akut mortalitási adatok, amelyekből az MTC-t meg lehet becsülni. Az MTC becslése azonban pontatlan lehet, és jellemzően egyéni szakmai megítélés alapján kell róla dönteni. Bár az MTC becslésére a regressziós modellek használata tűnik a szakmailag legmegalapozottabb módszernek, a meglévő akut adatokból is használható becsült MTC érték vezethető le, az akut LC₅₀-érték 1/3-ának alkalmazásával. Előfordulhat azonban, hogy a vizsgálathoz használt faj esetében nem állnak rendelkezésre akut toxicitási adatok. Ha fajspecifikus akut toxicitási adatok nem állnak rendelkezésre, akkor 96 órás LC₅₀-vizsgálatot lehet végezni olyan ebihalakkal, amelyek reprezentatívak az AMA vizsgálathoz használt ebihalak szempontjából (azaz ugyanabban a fejlődési stádiumban vannak). Ha más vízi fajokra vonatkozó adatok rendelkezésre állnak (például halakra vagy más kétélűekre vonatkozó LC₅₀-vizsgálatokból), akkor fajok közötti extrapoláció révén, szakmai megítélés alapján is megbecsülhető a várható MTC.

18. Alternatív megoldásként, ha a vegyi anyag nem fejt ki akut toxikus hatást és 100 mg/l felett oldható, akkor a 100 mg/l értéket kell a vizsgálati koncentráció felső határának tekinteni, mivel ez a koncentráció általában »gyakorlatilag nem mérgezőnek« tekinthető.
19. Bár nem ez a javasolt eljárás, statikus megújítási módszereket is lehet használni, ha az átfolyósos módszerekkel nem lehet az MTC-t elérni. Ha statikus megújítási módszereket alkalmazunk, a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának stabilitását dokumentálni kell, és annak a működési követelmények szabta korlátokon belül kell maradnia. Huszonnégy órás megújítási időszakok használata ajánlott. A 72 órát meghaladó megújítási időszakok használata nem megengedett. Továbbá az egyes megújítási időszakok végén, közvetlenül a vízcserre előtt meg kell mérni a víz minőségi paramétereit (pl. oldott oxigénkoncentráció, hőmérséklet, pH stb.).

Vizsgálati koncentrációtartomány

20. Minimum három vizsgálati koncentráció, valamint egy tiszta vizes kontroll (és adott esetben egy hordozó-kontroll) szükséges. A legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentráció közötti minimális különbségnek körülbelül egy nagyságrendnek kell lennie. A dózisek közötti maximális távolság 0,1, a minimális távolság pedig 0,33.

ELJÁRÁS

A vizsgálat megkezdése és lefolytatása

0. nap

21. Az expozíciót akkor kell elkezdni, ha az expozíció előtti szakaszban kialakított törzspopulációban elegendő számú ebihal érte el a Nieuwkoop és Faber szerinti 51. fejlődési stádiumot (8) és koruk a megtermékenyítéstől számított legfeljebb 17 nap. A vizsgálathoz használandó állatok kiválasztásához a törzspopulációból egészséges és normális kinézetű ebihalakat kell összegyűjteni egy megfelelő mennyiségű hígítóvizet tartalmazó edénybe. A fejlődési stádium meghatározása céljából az ebihalakat egyenként el kell távolítani a gyűjtőtartályból egy kis háló vagy szűrő segítségével, és egy hígítóvizet tartalmazó átlátszó mérőkamrába (pl. 100 mm-es Petri-csészébe) kell áthelyezni őket. Előnyös, ha a stádium meghatározásához nem használunk érzéstelenítést; a kezelés előtt azonban lehet egyenként érzésteleníteni az ebihalakat nátrium-hidrogén-karbonáttal megfelelően puffertolt (pH = 7,0) 100 mg/l trikain-metán-szulfonáttal (például MS-222). Ha érzéstelenítést használunk, akkor pl. az MS-222 megfelelő alkalmazásának módszertanát ebben járatos laboratóriumoktól be kell szerezni és a vizsgálat eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell. Az állatokat az áthelyezés során óvatosan kell kezelni a kezeléssel járó stressz minimalizálása és a sérülések elkerülése érdekében.
22. Az állatok fejlődési stádiumát binokuláris preparálómikroszkóp segítségével határozzuk meg. A fejlődési stádium variabilitásának csökkentése érdekében fontos, hogy az osztályozás a lehető legpontosabban történjen. Nieuwkoop és Faber szerint (8) az 51. stádiumban lévő organizmusok kiválasztásának alapul szolgáló elsődleges fejlődési mérőföldkő a hátsó végtagok morfológiája. A hátsó végtagok morfológiai jellemzőit mikroszkóp alatt kell megvizsgálni. Míg az ebihalak osztályozásával kapcsolatos részletes információkért a teljes Nieuwkoop és Faber útmutatót (8) tanulmányozni kell, a fejlődési stádiumot a hangsúlyos morfológiai jellemzők alapján is megbízhatóan el lehet dönteni. A vizsgálat során – normális egyedfejlődést feltételezve – az alábbi táblázat használható a fejlődési stádium meghatározásának egyszerűsítésére és egységesítésére a különböző stádiumokhoz kapcsolódó hangsúlyos morfológiai jellemzők azonosítása útján.

2. táblázat

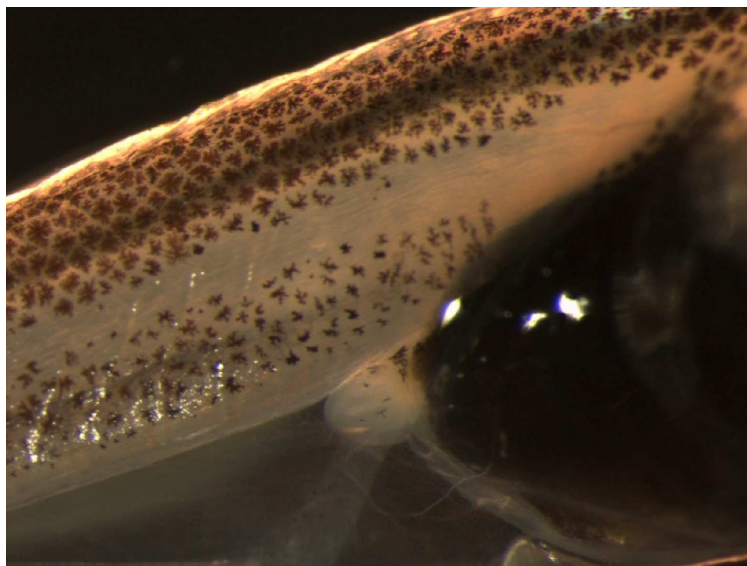
A fejlődési stádium meghatározásához használt jelentős morfológiai jellemzők Neuwkoop és Faber útmutatása alapján.

Jelentős morfológiai jellemzők	Fejlődési stádium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Hátsó végtagok	X	X	X	X	X	X	X									
Mellső végtagok						X	X	X	X	X						
Craniofaciális szerkezet										X	X	X	X			
Szaglóideg morfológiája											X	X	X			
Farok hossza													X	X	X	X

23. A vizsgálat megkezdéséhez minden ebihalnak az 51. stádiumban kell lennie. Ebben a stádiumban a legjelentősebb stádiumot meghatározó morfológiai jellemző a hátsó végtagok morfológia, amelyet az 1. ábra mutat be.

1. ábra

A hátsó végtagok morfológiája az 51. stádiumban lévő *X. laevis* ebihalaknál.



24. A fejlődési stádium szerinti kiválasztás mellett a kísérleti állatok választhatóan méret szerint is válogathatók. Ebből a célból egy körülbelül 20 db, Nieuwkoop és Faber szerinti 51. stádiumban lévő ebihalból álló kisebb mintán a 0. napon meg kell mérni a teljes testhosszt (és nem a farok nélküli testhosszt). A mintában lévő állatok átlagos teljes testhosszának kiszámítása után meghatározható a kísérleti állatok teljes testhosszának alsó és felső határértéke, amelyeknek az átlagérték ± 3 mm-es tartományon belül kell elhelyezkedniük (az 51. stádiumban lévő ebihalak teljes testhosszának átlagértéke 24,0 és 28,1 mm között ingadozik). Az egyes kísérleti állatok alkalmasságának meghatározása szempontjából azonban az elsődleges paraméter a fejlődési stádium. A szemmel jól látható rendellenességeket vagy sérüléseket mutató ebihalakat ki kell zárni a vizsgálatból.
25. A fenti stádiummeghatározási kritériumoknak megfelelő ebihalakat tiszta tenyésztővízzel töltött tartályban tartjuk, amíg a stádiummeghatározó vizsgálat befejeződik. A stádiummeghatározás befejezése után a lárvákat véletlenszerűen szétosztjuk az expozíciós kezelési tartályok között, úgy, hogy minden egyes tartály 20 lárvát tartalmazzon. Ezután ellenőrizzük, hogy az egyes kezelési tartályokban nincsenek-e rendellenes megjelenésű állatok (pl. sérülések, abnormális úszóviselkedés stb.). Az egyértelműen egészségtelen megjelenésű ebihalakat a kezelési tartályokból el kell távolítani, és a helyükre a gyűjtőtartályból újonnan kiválasztott lárvákat kell helyezni.

Megfigyelések

26. A vizsgálat befejezésének módjára és az ebihalak feldolgozására vonatkozó további részletes információkért olvassa el »A kételtűek pajzsmirigyszövetana« című OECD-iránymutatást (9).

Mérések a 7. napon

27. A 7. napon ismétléseként öt véletlenszerűen kiválasztott ebihalat távolítunk el az egyes vizsgálati tartályokból. Az alkalmazott véletlenszerű eljárásnak biztosítania kell, hogy minden vizsgálatban részt vevő szervezet egyenlő valószínűséggel legyen kiválasztható. Ez bármely randomizálási eljárással elérhető, feltéve, hogy minden esetben hálóbá fogjuk az összes ebihalat. A ki nem választott ebihalak visszakerülnek az eredeti tartályukba, a kiválasztott ebihalakat pedig pl. 150–200 mg/l MS-222 oldatban humánusan elaltatjuk, amelyet a pH = 7,0 eléréséhez nátrium-hidrogén-karbonáttal megfelelően puffertünk. A leölt ebihalakat vízzel leöblítjük és szárazra töröljük, majd testtömegüket a legközelebbi milligrammra kerekítve meghatározzuk. Meghatározzuk az egyes ebihalak hátsó végtagjának hosszát, farok nélküli testhosszát és fejlődési stádiumát (binokuláris preparálómikroszkóp segítségével).

Mérések a 21. napon (a vizsgálat befejezése)

28. A vizsgálat befejezésekor (21. nap) a maradék ebihalakat eltávolítjuk a vizsgálati tartályokból és pl. 150–200 mg/l MS-222 oldatban humánus módon elaltatjuk, amelyet nátrium-hidrogén-karbonáttal a fentiek szerint megfelelően puffertunk. Az ebihalakat vízzel leöblítjük és szárazra töröljük, majd a testtömegüket a legközelebbi milligrammra kerekítve meghatározzuk. Minden ebihal esetében megmérjük a fejlődési stádiumot, a fark nélküli testhosszt és a hátsó vétagok hosszát.
29. Az egész testes mintaként vagy az alsó állkapcsot tartalmazó vágott fejszövet-mintaként felhasznált lárvákat szövettani vizsgálatok céljára 48–72 órára Davidson-féle fixálókeverékbe helyezzük. Kórszövettani vizsgálat céljára összesen öt-öt ebihalat kell kivenni az egyes párhuzamos tartályokból. Mivel a follicularis sejtek magassága a fejlődési stádiumtól függ (10), a szövettani elemzés céljára leginkább megfelelő mintavételi megközelítés az, ha lehetőség szerint azonos stádiumban lévő példányokat használunk. Az azonos stádiumú példányok kiválasztása érdekében a lárvák fejlődési stádiumát a kiválasztás és az azt követő – az adatgyűjtés és megőrzés céljából végzett – feldolgozás előtt kell meghatározni. Erre azért van szükség, mert a fejlődésben megfigyelhető szokásos eltérések különböző stádiumeloszlást eredményeznek az egyes párhuzamos tartályokban.
30. A kórszövettenra kiválasztott állatoknak (n=5 minden párhuzamos tartályból) a kontrollok (az összes párhuzamos tartály) átlagos stádiumához kell igazodniuk. Ha vannak olyan párhuzamos tartályok, amelyekben több mint öt megfelelő stádiumban lévő lárva található, akkor azok közül öt lárvát véletlenszerűen kell kiválasztani.
31. Ha vannak olyan párhuzamos tartályok, amelyekben kevesebb mint öt megfelelő stádiumban lévő lárva van, akkor eggyel korábbi vagy eggyel későbbi fejlődési stádiumban lévő példányokat kell véletlenszerűen kiválasztani, hogy elérjük a párhuzamos tartályonként öt lárvából álló teljes mintaméretet. Azt, hogy eggyel korábbi vagy eggyel későbbi stádiumban lévő lárvákat választunk-e ki a mintához, lehetőleg a kontrollcsoportok stádiumeloszlása és a kezeléshez használt vegyi anyag átfogó értékelése alapján kell eldönteni. Azaz ha a vegyi anyaggal történő kezelés a fejlődésben való visszamaradással jár, a további lárvákat az eggyel korábbi fejlődési stádiumból kell kiválasztani a mintavétel során. Ezzel ellentétben ha a vegyi anyaggal történő kezeléshez a fejlődés felgyorsulása társul, akkor a további lárvákat az eggyel későbbi fejlődési stádiumból kell kiválasztani.
32. Elképzelhető, hogy a vizsgált vegyi anyaggal történő kezelés az ebihalak fejlődésében olyan súlyos elváltozást okoz, hogy nem lesz átfedés a vegyi anyaggal kezelt csoportok stádiumeloszlása és a kontroll számított átlagos fejlődési stádium között. Kizárólag ezekben az esetekben a kiválasztási folyamat módosítható, és a kontroll átlagos fejlődési stádiumától eltérő fejlődési stádium használható annak érdekében, hogy fejlődési stádium szerint összeillő lárvákat lehessen vételezni a pajzsmirigy kórszövettani vizsgálata céljára. Továbbá ha a stádiumok határozatlanok (azaz aszinkronia áll fenn), akkor az egyes párhuzamos tartályokból véletlenszerűen kell 5 ebihalat a szövettani elemzéshez kiválasztani. A jegyzőkönyvben meg kell indokolni bármely, a kontroll átlagos stádiumától eltérő fejlődési stádiumban lévő lárva kiválasztását a mintavétel során.

A biológiai végpontok meghatározása

33. Az elsődleges végpontok mérését a 21 napos expozíciós fázisban a 7. és a 21. napon végezzük, de szükséges a vizsgálati állatok napi megfigyelése is. A 3. táblázat áttekintést nyújt a mérési végpontokról és az azokhoz tartozó megfigyelési időpontokról. A apikális végpontok méréséről és a szövettani vizsgálatok céljára szolgáló technikai eljárásokról további részletes információ az OECD-iránymutatásokban található (9).

3. táblázat

Az elsődleges végpontok megfigyelési időpontjai az AMA vizsgálatban.

Apikális végpontok	Naponta	7. nap	21. nap
— Mortalitás	•		
— Fejlődési stádium		•	•
— Hátsó vétagok hossza		•	•
— Fark nélküli testhossz		•	•
— Nedves testtömeg		•	•
— Pajzsmirigyszövetten			•

Apikális végpontok

34. Az AMA apikális végpontjai a fejlődési stádium, a hátsó végtagok hossza, a fark nélküli testhossz és a nedves testtömeg. Az alábbiakban röviden mindegyik bemutatásra kerül. Ezen adatok gyűjtéséről a hivatkozott iránymutatásokban további technikai információk állnak rendelkezésre, beleértve az ajánlott számítógéppel támogatott elemzési eljárásokat is.

Fejlődési stádium

35. Az *X. laevis* ebihalak fejlődési stádiumát Nieuwkoop és Faber stádiummeghatározási kritériumai segítségével határozzuk meg (8). A fejlődési stádiumra vonatkozó adatok alapján megállapítjuk, hogy a fejlődés felgyorsult, aszinkron, késleltetett vagy változatlan. A fejlődés felgyorsulását vagy késleltetését úgy határozzuk meg, hogy összehasonlítjuk a kontroll- és a kezelt csoportok által elért fejlődési stádium mediánját. Aszinkron fejlődésről akkor lehet beszámolni, ha a vizsgált szövetek nem hibásak vagy rendellenesek, de a különböző szövetek morfogenezisének vagy fejlődésének egymáshoz viszonyított időzítése egy ebihalon belül megbomlik.

A hátsó végtagok hossza

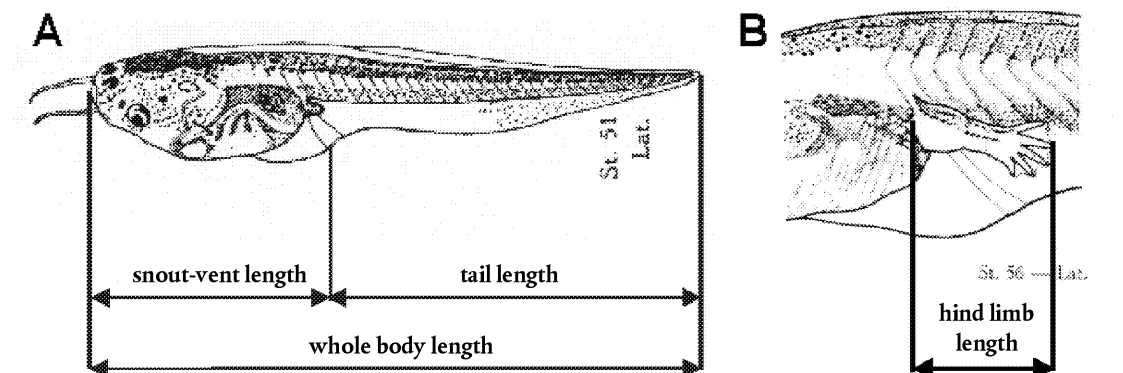
36. A hátsó végtagok differenciálódását és növekedését a pajzsmirigyhormonok szabályozzák, és olyan jelentős fejlődési mérföldkönek számít, amelyet már a fejlődési stádium meghatározása során is alkalmaztunk. A hátsó végtagok fejlődését minőségi szempontként használjuk a fejlődési stádium meghatározásakor, de itt mennyiségi végpontnak tekintjük. Ezért a hátsó végtagok hosszát a pajzsmirigytenhelyre gyakorolt hatás kimutatására szolgáló végpontként mérjük (2. ábra). A következetesség érdekében a hátsó végtagok hosszát a bal hátsó végtagon mérjük. A hátsó végtagok hosszát a vizsgálat 7. és 21. napján értékeljük. A hátsó végtagok hosszának a 7. napon történő mérése egyszerű, amint az a 2. ábrán is látható. A hátsó végtagok hosszának a 21. napon történő mérése azonban a végtagban lévő hajlatok miatt bonyolultabb. Ezért a hátsó végtagok hosszának a 21. napon történő mérését a test falánál kezdjük, és szögeltérések esetén is végig a végtag középvonalát követjük. A hátsó végtagok hosszának 7. napon megfigyelhető eltéréseit – akkor is, ha a 21. napon nem nyilvánvalóak – szignifikánsnak kell tekinteni a potenciális pajzsmirigy-aktivitás szempontjából. A hosszmeréseket digitális fényképeken, képelemző szoftver segítségével végezzük »A kétélűek pajzsmirigyszövetana« című OECD-iránymutatásban leírtak szerint (9).

Testhossz és nedves tömeg

37. A fark nélküli testhossz (2. ábra) és a nedves tömeg meghatározása a vizsgált vegyi anyagoknak az ebihalak – kontrollcsoporttal összehasonlított – növekedési ütemére gyakorolt lehetséges hatásainak értékelése céljából szerepel a vizsgálati protokollban, és hasznos a vizsgált vegyi anyag általános toxicitásának kimutatásában is. Mivel a rátapadó víz eltávolítása a testtömeg meghatározása érdekében stresszt okozhat az ebihalaknak, illetve bőrkárosodást is előidézhet, ezeket a méréseket csak az ebihalak a 7. napon kiválasztott kisebb mintáján végezzük el, a többi ebihalon pedig csak a vizsgálati befejezésekor (21. nap). A következetesség kedvéért a végbélnyílás cranialis vége legyen a mérés caudalis határa.
38. A fark nélküli testhosszt az ebihalak növekedésének 2. ábra szerinti értékeléséhez használjuk.

2. ábra

(A) A testhossz mérésének típusai és (B) Az *X. laevis* ebihalak hátsó végtagja hosszának mérése (1).



Pajzsmirigyszövettan

39. Míg a fejlődési stádium és a hátsó végtagok hossza fontos végpont az átalakulások fejlődés expozícióval összefüggő változásainak értékelésében, a fejlődésben jelentkező késedelem önmagában nem tekinthető a pajzsmirigyműködést gátló aktivitás diagnosztikai indikátorának. Egyes változások csak rutin kórszövetteni vizsgálattal figyelhetők meg. A diagnosztikai kritériumok között szerepel a pajzsmirigy hypertrophia/atrophia, a folliculáris sejthypertrophia, a folliculáris sejthyperplasia, illetve további minőségi kritériumként a folliculáris lumen területe, a kolloid minősége és a folliculáris sejtek magassága/alakja. A súlyossági fokot (4 fokozat) jegyzőkönyvezni kell. A szövettani elemzés céljára történő mintavételre és a minták feldolgozására, valamint a szövetminták szövettani elemzésére vonatkozó információk a következő kiadványban található: »Kétéltű-átalakulási vizsgálat: 1. rész – A morfológiai mintavételre és szövettani feldolgozásra vonatkozó technikai iránymutatás« és »Kétéltű-átalakulási vizsgálat: 2. rész – A vizsgálatok, a diagnosztikai kritériumok, a súlyossági besorolás és az atlasz értelmezésére vonatkozó megközelítés« (9). A vizsgálatot első alkalommal végző laboratóriumoknak a pajzsmirigy szövettani elemzése és értékelése előtt képzési célból tanácsot kell kérniük tapasztalt kórboncnokoktól. Az apikális végpontoknak a fejlődés felgyorsulását vagy aszinkroniáját jelző egyértelmű és jelentős változásai feleslegessé tehetik a pajzsmirigy kórszövetteni elemzését. Ugyanakkor a nyilvánvaló morfológiai elváltozások hiánya vagy a fejlődési késedelemre utaló bizonyíték indokoltá teszi a szövettani elemzést.

Mortalitás

40. Naponta ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati tartályokban vannak-e elpusztult ebihalak, és a kapott számot minden tartály esetében fel kell jegyezni. Minden mortalitási eseménynél fel kell jegyezni a dátumot, a koncentrációt és a tartály számát. Az elhullott állatokat észrevételüket követően azonnal el kell távolítani a vizsgálati tartályból. A 10 %-ot meghaladó mortalitási arány egyaránt jelezhet nem megfelelő vizsgálati körülményeket vagy a vizsgált vegyi anyag toxikus hatását.

További megfigyelések

41. Az abnormális viselkedést és a szabad szemmel látható fejlődési rendellenességek és elváltozások eseteit fel kell jegyezni. Bármilyen abnormális viselkedés és szabad szemmel látható fejlődési rendellenesség vagy elváltozás esetében fel kell jegyezni a dátumot, a koncentrációt és a tartály számát. A normális viselkedést a következők jellemzik: az ebihalak a vízszlopban lebegnek, farkuk a fejük fölé emelkedik, a farokúszójuk egyenletesen, ritmikusan mozog, időszakonként a felszínre emelkednek, a kopolyufedőjük mozog, és reagálnak az ingerekre. Kóros viselkedés például ha az ebihal a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, vagy nem reagál az ingerekre. Emellett a táplálékfogyasztásban a kezelések között mutatózó jelentős eltéréseket is fel kell jegyezni. A jelentős fejlődési rendellenességek és elváltozások közé tartoznak többek között a morfológiai rendellenességek (pl. végtagdeformitások), a vérzéses elváltozások és a bakteriális vagy gombás fertőzések. Ezek minőségi megállapítások, amelyeket a betegségek vagy stressz okozta klinikai tünetekhez hasonlóan kell mérlegelni, és a kontrollállatokkal összehasonlításban kell megtenni. Ha a rendellenességek előfordulása vagy előfordulási aránya nagyobb az expozíciós tartályokban, mint a kontrollokban, akkor ezt a nyilvánvaló toxicitás bizonyítékának kell tekinteni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatgyűjtés

42. Minden adatot a helyes laboratóriumi gyakorlatnak megfelelő elektronikus vagy manuális rendszerek segítségével kell összegyűjteni. A vizsgálati adatoknak az alábbiakat kell tartalmazniuk:

Vizsgált vegyi anyag:

- A vizsgált vegyi anyag jellemzése: fizikai-kémiai tulajdonságok; stabilitással és biológiai lebomlással kapcsolatos információk;
- Kémiai információk és adatok: a hígítás módja és gyakorisága. A vizsgált vegyi anyagra vonatkozó információ magában foglalja a vizsgált vegyi anyag – és bizonyos esetekben az átalakulási termék – tényleges és névleges koncentrációját. A vizsgált vegyi anyag mérésére lehet szükség a törzsoldatok, valamint a vizsgálati oldatok esetében;
- Oldószer (ha az nem víz): az oldószer kiválasztásának indoklása, az oldószer jellemzői (jelleg, alkalmazott koncentráció);

Vizsgálati feltételek:

- Operatív feljegyzések: ide kell sorolni a vizsgálati rendszer működésére, illetve a támogató környezetre és infrastruktúrára vonatkozó megfigyeléseket. Tipikus feljegyzések: környezeti hőmérséklet, vizsgálati hőmérséklet, megvilágítási időszak, az expozíciós rendszer kritikus komponenseinek állapota (pl. szivattyúk, ciklusszámlálók, nyomás), áramlási sebesség, vízszint, a törzssállomány változásai, és etetési feljegyzések. Az általános vízminőségi paraméterek a következők: pH, DO, vezetőképesség, összes jód, lúgosság és keménység;
- A vizsgálati módszertől való eltérések: a megadott információnak tartalmaznia kell a vizsgálati módszertől való eltérésekre vonatkozó minden információt, illetve azok szöveges leírását;

Eredmények:

- Biológiai megfigyelések és adatok: ide tartozik a napi mortalitás, a táplálékfogyasztás, az abnormális úszó viselkedés, a levertség, az egyensúly elvesztése, a fejlődési rendellenességek, elváltozások stb. Az előre meghatározott időközönként összegyűjtött megfigyelések és adatok a következők: fejlődési stádium, hátsó végtagok hossza, fark nélküli testhossz és nedves tömeg;
- Statisztikai elemzési technikák és az alkalmazott technikák indoklása; a statisztikai elemzés eredményei lehetőleg táblázatos formában;
- Szövetteni adatok: ide tartoznak a szöveges leírások, valamint az egyes megfigyelések súlyosságának és előfordulási gyakoriságának osztályozása a kórszövetteni iránymutatásban részletezettek szerint;
- Ad hoc megfigyelések: ezek közé a megfigyelések közé tartoznak a vizsgálatához fűzött olyan szöveges leírások, amelyek nem illenek bele az előzőleg ismertetett kategóriákba.

Adatszolgáltatás

43. A 2. függelék napi adatgyűjtési táblázatokat tartalmaz, amelyek iránymutatásként használhatóak a nyers adatok beviteléhez és az azokat összesítő statisztikai számításokhoz. Ezenkívül rendelkezésre állnak a jelentéshez használható táblázatok is, amelyek megkönnyítik a végponti adatokról készített összefoglalók közzétételét. A szövetteni vizsgálatok jelentésére szolgáló táblázatok a 2. függelékben találhatók.

Teljesítménykritériumok és a vizsgálat elfogadhatósága/érvényessége

44. A vizsgálati módszertől való jelentős eltérés általában olyan adatokat eredményez, amelyek értelmezhetetlenek vagy a jelentés céljára alkalmatlanok. Ezért iránymutatásként kifejlesztették a 4. táblázatban található kritériumokat, amelyek az elvégzett vizsgálat minőségének és a kontrollorganizmusok általános teljesítményének meghatározására vonatkoznak.

*Kritérium***Elfogadható határok**

Kritérium	Elfogadható határok
Vizsgálati koncentrációk	≤ 20 % KV (a mért vizsgálati koncentráció változékonysága) értéken kell tartani a 21 napos vizsgálat alatt
Mortalitás a kontrollokban	≤ 10 % – a mortalitás egyik kontrollismétlésben sem haladhatja meg a 2 ebihalat
A kontrollok fejlődési stádiumának minimális mediánja a vizsgálat végén	57
A fejlődési stádium szórása a kontrollcsoportban	A fejlődési stádium eloszlásának 10. és 90. percentilise közötti különbség nem lehet több 4 szakasznál
Oldott oxigén	A levegőteltettség (*) ≥ 40 %-a

Kritérium	Elfogadható határok
pH	A pH-t 6,5–8,5 között kell tartani. Az ismétlések/kezelések közötti különbség értéke nem haladhatja meg a 0,5-öt.
Víz hőmérséklet	22 ± 1 °C – az ismétlések/kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5 °C-ot
Vizsgálati koncentrációk nyilvánvaló toxicitás nélkül	≥ 2
Ismétlések teljesítménye	≤ 2 ismétlés lehet érvénytelen az egész vizsgálat során
Oldószer használatára vonatkozó különleges feltételek	Ha hordozó oldószert alkalmazunk, oldószeres kontrollt és tiszta vizes kontrollt is használni kell, a kapott eredményeket pedig jegyzőkönyvezni kell.
	Az oldószeres és a vizes kontrollcsoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket külön kezeljük. Lásd alább a részletes leírást.
A statikus megújítási rendszerre vonatkozó különleges feltételek	A megújítás előtti és utáni reprezentatív kémiai elemzéseket jegyzőkönyvezni kell
	Az ammónia szintjét közvetlenül a vízcseré előtt ellenőrizni kell
	Az 1. függelék 1. táblázatában felsorolt valamennyi vízminőségi paramétert közvetlenül a vízcseré előtt meg kell mérni
	A megújítási időszak nem haladhatja meg a 72 órát
	Megfelelő etetési rend (a kereskedelmi ebihalatból álló napi fejadag 50 %-a)

(*) A víz állandó levegőztetése buborékolókkal biztosítható. A buborékolókat olyan magasságban javasolt elhelyezni, ahol nem okoznak indokolatlan stresszt az ebihalaknak.

A vizsgálat érvényessége

45. A vizsgálat elfogadhatóságához/érvényességéhez az alábbi követelményeknek kell teljesülniük:

Érvényes, a pajzsmirigyre kifejtett aktivitás szempontjából negatívnak tekintett kísérlet egy vizsgálat során:

- (1) Bármely kezelés esetében (ideértve a kontrollokat is) a mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot. A mortalitás egyik ismétlés esetében sem haladhatja meg a három ebihalat, ellenkező esetben az ismétlést érvénytelennek kell tekinteni
- (2) Legalább két – mind a négy érvényes ismétlést bevonó – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia az elemzéshez
- (3) Legalább két – nyilvánvaló toxicitást nem mutató – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia az elemzéshez

Érvényes, a pajzsmirigyre kifejtett aktivitás szempontjából pozitívnak tekintett kísérlet egy vizsgálat során:

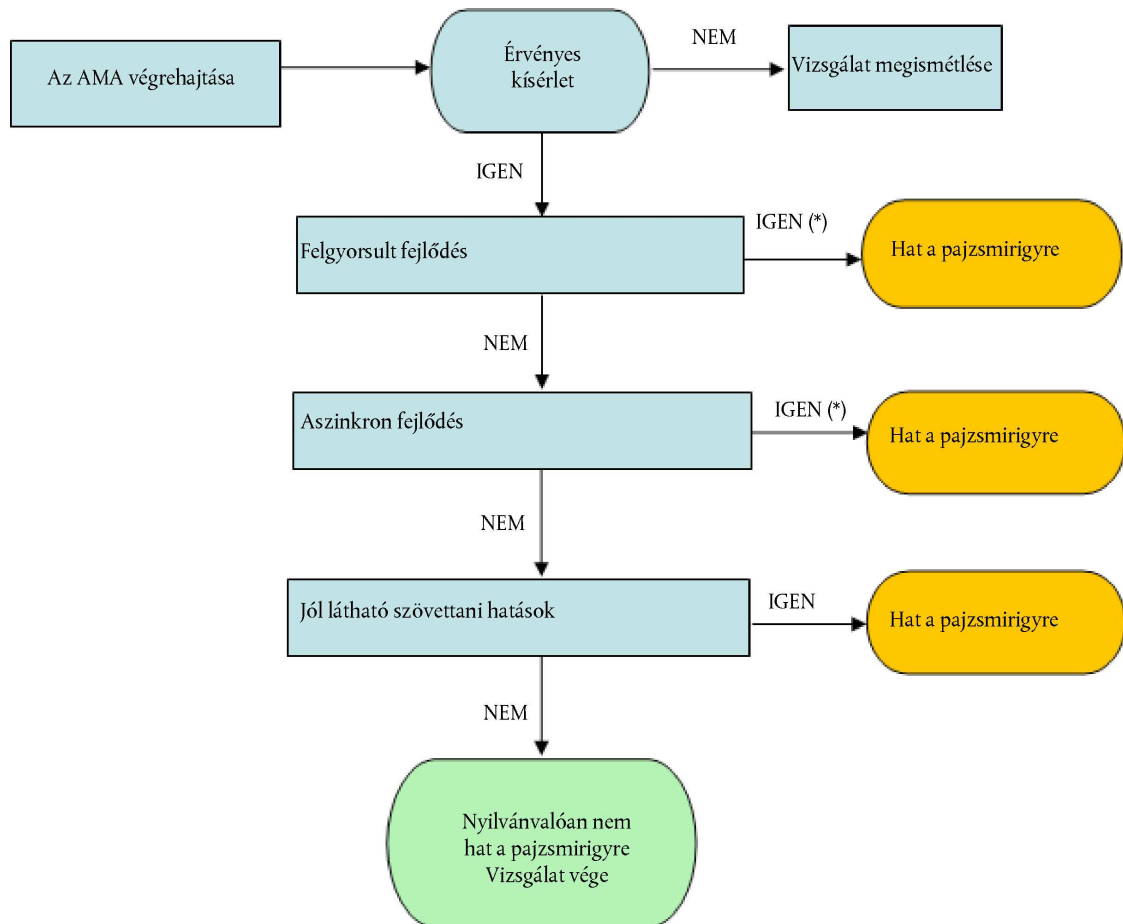
- (1) A kontrollcsoportban a mortalitás legfeljebb két ebihal/ismétlés lehet

Döntési diagram az AMA végrehajtásához

46. Az AMA számára kifejlesztettek egy döntési diagramot, amely logikai segítséget nyújt a biológiai vizsgálat végrehajtásához és az eredmények értelmezéséhez (lásd a 3. ábrán látható folyamatábrát). A döntési diagram lényegében a végpontokat súlyozza: a felgyorsult fejlődés, az aszinkron fejlődés, valamint a pajzsmirigy-kórszövetten nagyobb súlyt kap, míg az általános toxicitással is befolyásolható paraméterek: a késleltetett fejlődés, a fark nélküli testhossz és a nedves testtömeg kisebb súllyal kerülnek beszámításra.

3. ábra

Döntési diagram az AMA végrehajtásához



(*) Egyes szabályozó hatóságok annak ellenére is megkövetelhetik a szövettani vizsgálatot, hogy a felgyorsult és az aszinkron fejlődés esetében jelentős különbségek mutatkoznak. Ajánlott, hogy a vizsgálatot végző szervezet a vizsgálat elvégzése előtt egyeztesse a megfelelő hatósággal, hogy melyik végpontra van szükség

Felgyorsult fejlődés (a fejlődési stádium, az fark nélküli testhossz és a hátsó végtagok hosszának segítségével meghatározva)

47. Felgyorsult fejlődés ismereteink szerint csak olyan hatások következtében fordul elő, amelyek összefüggésben vannak a pajzsmirigyhormonokkal. Ezek lehetnek perifériás szöveti hatások, mint például a pajzsmirigyhormon-receptorral (például a T4-receptorral) való közvetlen interakció, vagy olyan hatások, amelyek megváltoztatják keringő pajzsmirigyhormonok szintjét. Mindkét eset elegendő bizonyítéknak tekinthető arra, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre. A felgyorsult fejlődést kétféleképpen értékelhetjük. Egyrészt meghatározhatjuk az általános fejlődési stádiumot a Nieuwkoop és Faber által részletezett standard módszerrel (8). Másrészt olyan specifikus morfológiai jellemzőket lehet számszerűsíteni – például a hátsó végtagok hosszát a 7. és a 21. napon –, amelyek pozitív összefüggésben vannak a pajzsmirigyhormon-receptorra kifejtett agonista hatással. Ha statisztikailag szignifikáns előrehaladás figyelhető meg a fejlődésben vagy a hátsó végtagok hosszában, akkor a vizsgálat azt jelzi, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre.
48. A következő négy végpont statisztikai elemzése alapján értékeljük ki azt, hogy a kísérleti állatok fejlődése a kontrollcsoporthoz képest felgyorsult-e:
 - hátsó végtagok hossza (a fark nélküli testhosszal normálva) a vizsgálat 7. napján
 - hátsó végtagok hossza (a fark nélküli testhosszal normálva) a vizsgálat 21. napján
 - fejlődési stádium a vizsgálat 7. napján
 - fejlődési stádium a vizsgálat 21. napján
49. A hátsó végtagok hosszának statisztikai elemzését a bal hátsó végtag hossza alapján kell elvégezni. A hátsó végtagok hosszát az egyes egyedek hátsóvégtag-hosszának és fark nélküli testhosszának arányával normalizáljuk. Ezután az egyes kezelési szinteken összehasonlítjuk a normált értékek átlagát. A fejlődés felgyorsulását az jelzi, ha a hátsó végtagok hosszának a vizsgálat 7. és/vagy 21. napján számított (normált) átlaga a kontroll csoporttal összehasonlítva jelentősen megnövekszik a vegyi anyaggal kezelt csoportban (lásd a 3. mellékletet).
50. A fejlődési stádiumra vonatkozó statisztikai elemzéseket a fejlődési stádiumok Nieuwkoop és Faber által leírt morfológiai kritériumok szerinti meghatározása alapján kell elvégezni (8). A fejlődés felgyorsulását az jelzi, ha a kontrollcsoporttal összehasonlítva a multikvantális analízis a fejlődési stádium szignifikáns növekedését mutatja ki a vegyi anyaggal kezelt csoportban a vizsgálat 7. és/vagy 21. napján.
51. Az AMA vizsgálati módszerben a fentebb említett négy végpont bármelyikére kifejtett jelentős hatás elegendő a felgyorsult fejlődés kimutatására. Ennek értelmében a hátsó végtagok hosszára egy adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatást nem kell megerősítenie sem a hátsó végtagok hosszára egy másik időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak, sem pedig a fejlődési stádiumra ebben az adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak. Hasonlóképp, a fejlődési stádiumra egy adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatást sem kell megerősítenie a fejlődési stádiumra egy másik időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak, vagy a hátsó végtagok hosszára ebben az adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak. A felgyorsult fejlődésre vonatkozó bizonyítékok azonban meggyőzőbbek, ha több mint egy végpont esetében észlelünk szignifikáns hatást.

Aszinkron fejlődés (a stádiummeghatározási kritériumok alapján meghatározva)

52. Az aszinkron fejlődést az jellemzi, ha a különböző szövetek morfogenezisének vagy fejlődésének egymáshoz viszonyított időzítése egyetlen ebihalon belül megbomlik. Ha egy szervezet fejlődési stádiumát az egyes stádiumokat jellemző morfológiai végpontegyüttes segítségével nem lehet egyértelműen meghatározni, az azt jelzi, hogy a szövetek az átalakulás során aszinkron módon fejlődnek. Az aszinkron fejlődés a pajzsmirigyre kifejtett hatás indikátora. Az egyetlen ismert hatásmechanizmus, amely aszinkron fejlődést okoz, az a vegyi anyagoknak a pajzsmirigyhormonok perifériás hatására és/vagy a pajzsmirigyhormonok fejlődő szövetekben való metabolizmusára gyakorolt hatása, mint például a deiodinázgátlók esetében megfigyelt hatás.
53. A vizsgált állatok kontrollpopulációhoz viszonyított aszinkron fejlődésének értékelése a kísérleti állatok 7. és 21. vizsgálati napon elvégzett makroszkópos morfológiai értékelésén alapul.
54. A *Xenopus laevis* normális fejlődésének Nieuwkoop és Faber által készített leírása (8) megfelelő keretet biztosít a szövetek normál átalakulási sorrendjének azonosításához. Az »aszinkron fejlődés« kifejezés kimondottan az

ebihalak általános morfológiai fejlődésében jelentkező azon eltérésekre vonatkozik, amelyek nem teszik lehetővé a fejlődési stádium Nieuwkoop és Faber kritériumai szerinti egyértelmű meghatározását (8), mivel a kulcsfontosságú morfológiai jellemzők különböző stádiumok jellegzetességeit mutatják.

55. Amint az »aszinkron fejlődés« kifejezés is jelzi, csak azokat az eseteket kell figyelembe venni, ahol eltérés figyelhető meg bizonyos szövetek szerkezeti átalakulási folyamatában más szövetek szerkezeti átalakulási folyamatához képest. A klasszikus fenotípusok közé tartozik a mellső végtag megjelenésének késedelve vagy hiánya a hátsó végtagok és a farok szöveteinek normális vagy felgyorsult fejlődése ellenére, illetve a kopolytűk korai felszívódása a hátsó végtagok morfogeneziséhez és a farok reszorpciójához viszonyítva. Egy állat aszinkron fejlődést mutató egyedként kerül feljegyzésre, ha nem lehet hozzárendelni egyetlen fejlődési stádiumhoz sem, mert nem felel meg a Nieuwkoop és Faber szerinti, stádiumra jellemző fejlődési kritériumok többségének (8), vagy ha rendkívül nagy késedelem vagy felgyorsulás figyelhető meg egy vagy több főbb jellemző tekintetében (pl. a farok teljesen felszívódott, de a mellső végtagok még nem alakultak ki). Az értékelést kvalitatív alapon végezzük el, és keretében a Nieuwkoop és Faber által felsorolt összes jellemzőt (8) kell vizsgálni. Nem szükséges azonban feljegyezni az állatok különböző jellemzőin megfigyelhető fejlettségi állapotot. Az aszinkron fejlődést mutató állatokat nem rendeljük hozzá egyetlen Nieuwkoop és Faber szerinti fejlődési stádiumhoz (8) sem.
56. A rendellenes morfológiai fejlődés »aszinkron fejlődésként« történő meghatározásának központi kritériuma tehát, hogy a szövetek szerkezeti átalakulásának és a szövetek morfogenezisének relatív időzítése megbomlott, miközben az érintett szövetek morfológiája nem mutat nyilvánvaló rendellenességet. Az általános morfológiai rendellenességek ilyen jellegű értelmezésének illusztrálása képpen, a hátsó végtagok más szövetek fejlődéséhez képest megfigyelhető retardált morfogenezise például teljesíti az »aszinkron fejlődés« kritériumait, míg a hiányzó hátsó végtagok, ujffejlődési rendellenességek (pl. ectrodactylia, polydactylia) vagy más nyilvánvaló végtagfejlődési rendellenességek nem tekinthetők »aszinkron fejlődésnek«.
57. Ebben az összefüggésben a következő fontosabb morfológiai jellemzők metamorf folyamatainak összehangoltságát kell megvizsgálni: a hátsó végtagok morfogenezise, a mellső végtagok morfogenezise, a mellső végtagok megjelenése, a farok reszorpciójának stádiuma (különösen a farokszó felszívódása) és a fej morfológiája (pl. a kopolytű mérete és a kopolytű reszorpciójának stádiuma, az alsó állkapocs morfológiája, a Meckel-porc kiemelkedése).
58. A kémiai hatástól függően különböző morfológiai fenotípusok is előfordulhatnak. A klasszikus fenotípusok közé tartozik a mellső végtag megjelenésének késedelve vagy hiánya a hátsó végtagok és a farok szöveteinek normális vagy felgyorsult fejlődése ellenére, illetve a kopolytűk korai felszívódása a hátsó végtagok és a farok szövetszerkezeti átalakulásához viszonyítva.

Kórszöveti vizsgálatok

59. Ha a vegyi anyag nem okoz nyilvánvaló toxicitást, nem gyorsítja fel a fejlődést vagy nem okoz aszinkron fejlődést, akkor a pajzsmirigy kórszövettanát a megfelelő iránymutatás segítségével értékeljük ki (9). A fejlődési visszamaradás – toxicitás hiányában – jól jelzi a pajzsmirigygátló hatást, de a fejlődési stádium elemzése kevésbé érzékeny és kisebb diagnosztikus erejű, mint a pajzsmirigy kórszöveti vizsgálata. Ezért ebben az esetben pajzsmirigy-kórszöveti vizsgálatot kell végezni. Fejlődési hatások hiányában is kimutattak már a pajzsmirigy szövettanára gyakorolt hatásokat. Ha változások észlelhetők a pajzsmirigy szövetében, akkor a vegyi anyag pajzsmirigyre ható anyagnak minősül. Ha a pajzsmirigyben nem figyelhető meg fejlődési visszamaradás vagy szövettani elváltozások, akkor a vegyi anyag pajzsmirigyre nem ható anyagnak minősül. A fenti döntést az alapozza meg, hogy a pajzsmirigy a pajzsmirigyserkentő hormon (TSH) hatása alatt áll, és minden vegyi anyag, amely elegendő mértékben megváltoztatja a keringő pajzsmirigyhormon mennyiségét ahhoz, hogy megváltozzon a TSH kiválasztása, kórszöveti elváltozásokat idéz elő a pajzsmirigyben. Különböző hatások és hatásmechanizmusok változtathatják meg a keringő pajzsmirigyhormon mennyiségét. Tehát míg a pajzsmirigyhormon szintje pajzsmirigyvel összefüggő hatásra utal, önmagában nem elegendő annak meghatározásához, hogy melyik hatás vagy hatásmechanizmus kapcsolódik a válaszhoz.
60. Mivel ez a végpont az alapvető statisztikai módszerekkel nem értékelhető, a vegyi anyagnak való kitettséggel összefüggő hatást kórszöveti szakvélemény segítségével kell meghatározni.

Késletetett fejlődés (a fejlődési stádium, a hátsó végtagok hossza, a nedves testtömeg és a farok nélküli testhossz segítségével meghatározva)

61. A késletetett fejlődés pajzsmirigygátló mechanizmusokon és közvetett toxicitáson keresztül valósulhat meg. A nyilvánvaló toxikus tünetekhez társuló enyhe fejlődési késedelmek valószínűleg nem specifikus toxikus hatást jeleznek. A nem pajzsmirigyre ható toxicitás értékelése lényeges eleme a vizsgálatnak az alpozitív eredmények

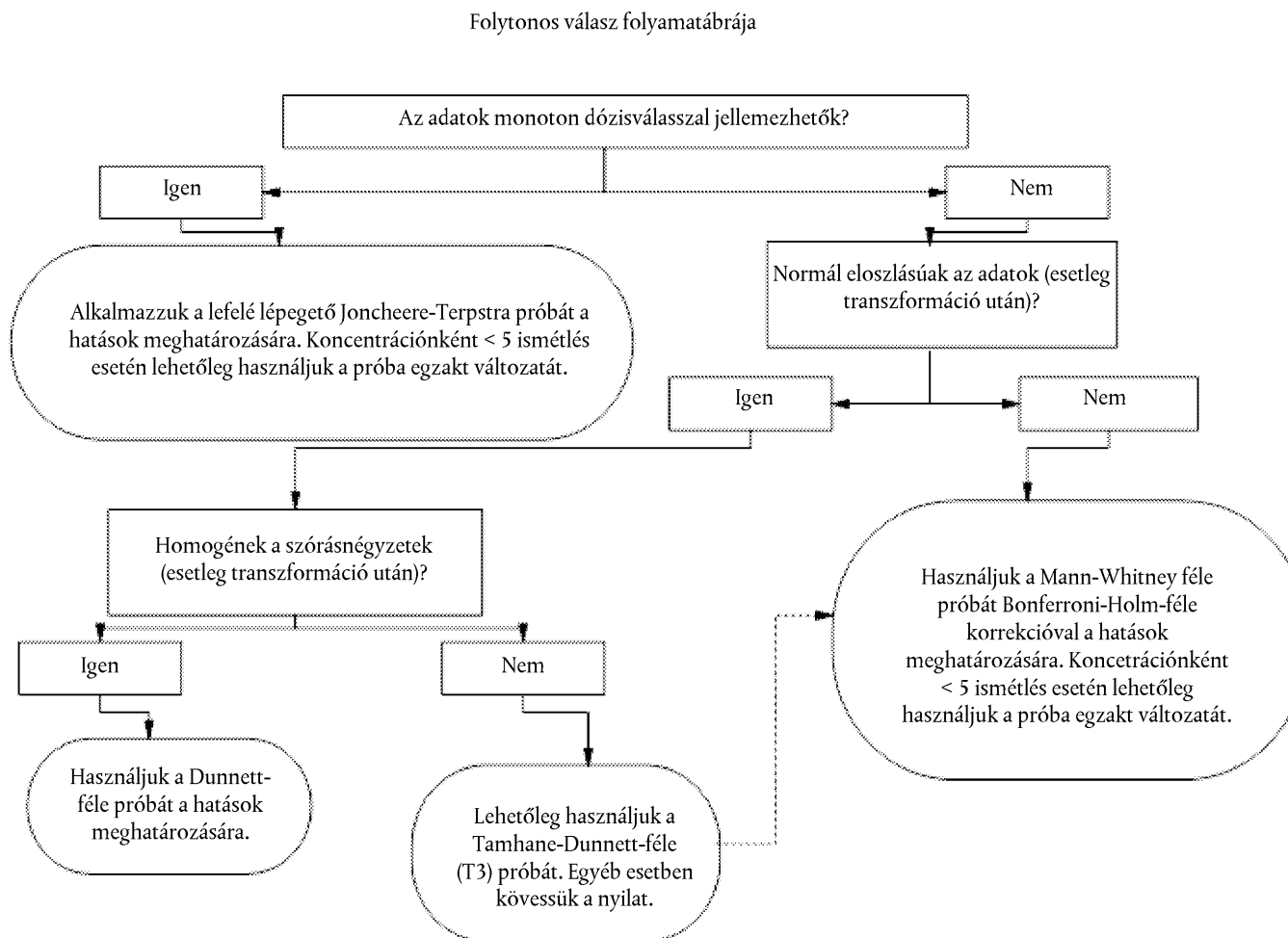
valószínűségének csökkentése érdekében. A túlzott mortalitás nyilvánvaló jele annak, hogy más mérgező mechanizmusok is működésben vannak. Hasonlóképpen a növekedés nedves testtömegén és/vagy a fark nélküli testhosszon észrevehető enyhe csökkenése is nem a pajzsmirigyre ható toxicitásra utal. A növekedés nyilvánvaló fokozódása gyakran megfigyelhető a normális fejlődésre negatívan ható vegyi anyagok esetében. Következésképpen a nagyobb állatok jelenléte nem feltétlenül utal a nem a pajzsmirigyre ható toxicitásra. Nem szabad azonban kizárólag a növekedésre hagyatkozni a pajzsmirigyre ható toxicitás meghatározásakor. Inkább a növekedés, a fejlődési stádium és a pajzsmirigy-kórszövetten együttesét kell használni a pajzsmirigyre kifejtett hatás megállapításához. További végpontokat is figyelembe kell venni a nyilvánvaló toxicitás meghatározása során, köztük az ödémát, a vérzéses elváltozásokat, a levertséget, a csökkent táplálékfelvételt, a szabálytalan/megváltozott úszási viselkedést stb. Ha minden vizsgálati koncentráció nyilvánvaló toxicitás tüneteit mutatja, a vizsgált vegyi anyagot újra kell értékelni alacsonyabb vizsgálati koncentrációk mellett, mielőtt megállapítanánk, hogy a vegyi anyag potenciálisan pajzsmirigyre ható anyag-e vagy sem.

62. A statisztikailag szignifikáns fejlődési késedelmek – a nyilvánvaló toxicitás egyéb jeleinek hiányában – azt jelzik, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre (antagonisztikus hatás). Statisztikailag megjelenő határozott jelek hiányában a pajzsmirigy kórszövetten eredményeivel lehet kiegészíteni ezt az eredményt.

Statisztikai elemzések

63. Az adatok statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az »Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató« (11) című dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A monoton dóziszválasszal jellemezhető folytonos mennyiségi végpontok (hátsó végtagok hossza, fark nélküli testhossz, nedves testtömeg) esetében a Jonckheere–Terpstra-próbát kell lefelé lépegető eljárással alkalmazni a szignifikáns kezelési hatás meghatározása érdekében.
64. Az olyan folytonos végpontok esetében, amelyek nem jellemezhetők monoton dóziszválasszal, meg kell vizsgálni az adatok normalitását (lehetőleg a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-próba alkalmazásával) és szórás-homogenitását (lehetőleg a Levene-féle próba használatával). Mindkét próbát egy varianciaanalízis (ANOVA) reziduálisain végezzük. Ezeket a formális normalitási és szórás-homogenitási próbákat a szakértői megítélés is helyettesítheti, de a formális próbákat kell előnyben részesíteni. Normalistól eltérő eloszlás vagy szórás-heterogenitás esetén normalizáló vagy szórásstabilizáló transzformációt kell keresni. Ha az adatok (esetleg a transzformáció után) normál eloszlásúak homogén szórással, a szignifikáns kezelési hatást a Dunnett-féle próbával határozzuk meg. Ha az adatok (esetleg a transzformáció után) normál eloszlásúak heterogén szórással, a szignifikáns kezelési hatást a Tamhane–Dunnett-féle vagy a T3-próbával, illetve a Mann–Whitney–Wilcoxon-féle U-próbával határozzuk meg. Amennyiben nem található normalizáló transzformáció, a szignifikáns kezelési hatást a Mann–Whitney–Wilcoxon-féle U-próbával határozzuk meg, a p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekciója segítségével. A Dunnett-féle próbát bármely ANOVA F-próbától függetlenül alkalmazzuk, illetve a Mann–Whitney-féle próbát bármely általános Kruskal–Wallis-féle próbától függetlenül alkalmazzuk.
65. Szignifikáns mortalitás nem várható, de meg kell vizsgálni lefelé lépegető eljárással alkalmazott Cochran–Armitage-féle próbával, ha az adatok összhangban vannak a dóziszválasszal monotonitással, egyébként pedig a Fisher-féle egzakt próbával, Bonferroni–Holm-féle korrekcióval.
66. A kezelés fejlődési stádiumra gyakorolt szignifikáns hatását az ismétlések középértékeire alkalmazott lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra próbával határozzuk meg. Alternatív megoldásként – és ez részesítendő előnyben – a 20–80. percentilisből végzett multikvantális Jonckheere-féle próbát kell használni a hatás meghatározásához, mivel ez figyelembe veszi az eloszlási profil változásait.
67. Az elemzés egysége az ismétlés, így az adatok az ismétlések középértékeiből állnak, ha a Jonckheere–Terpstra-féle próbát vagy a Mann–Whitney-féle U-próbát használjuk, illetve az ismétlések átlagaiból, ha a Dunnett-féle próbát használjuk. A dóziszválasszal monotonitását vizuálisan lehet értékelni az ismétlések és a kezelések átlagaiból vagy középértékeiből, vagy az előzőekben leírt formális próbákból (11). Ha a kezelések vagy a kontrollok kevesebb mint öt ismétlésből állnak, a Jonckheere–Terpstra-féle és a Mann–Whitney-féle próba pontos permutációs változatait kell használni, ha rendelkezésre állnak. A megadott összes vizsgálat statisztikai szignifikanciáját 0,05-os szignifikanciaszint mellett ítéljük meg.
68. A 4. ábrán látható folyamatábra a statisztikai vizsgálatok folytonos adatokon történő elvégzését szemlélteti.

A folytonos válaszadatokon alkalmazható statisztikai módszerek folyamatábrája.



Különleges adatelemzési szempontok

Érvénytelen kezelési szintek használata

69. Számos tényezőt kell figyelembe venni annak eldöntésekor, hogy az ismétlés vagy a teljes kezelés nyilvánvaló toxicitást mutat-e, melynek következtében ki kell zárni az elemzésből. A nyilvánvaló toxicitás meghatározása: > 2 elhullás bármelyik ismétlésben, amely csak toxicitással magyarázható, technikai hibával nem. A nyilvánvaló toxicitás egyéb tünetei közé tartoznak a vérzés, a rendellenes viselkedés, a rendellenes úszásminták, az anorexia és bármely egyéb betegségre utaló klinikai tünet. A toxicitás szubletális jelei tekintetében kvalitatív értékelésre lehet szükség, amelyet mindig a tiszta vizes kontrollcsoporthoz viszonyítva kell elvégezni.

Oldószeres kontrolllok

70. Oldószer használatát csak a legvégső esetben szabad megfontolni, ha már minden egyéb kémiai bejuttatási lehetőséget számításba vettünk. Ha oldószert használunk, akkor párhuzamosan egy tiszta vizes kontrollt is kell futtatni. A vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a tiszta vizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végezzük el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a fejlődési stádium, a farok nélküli testhossz és a nedves tömeg, mivel a pajzsmirigyre nem ható toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatunk ki a tiszta vizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a vizsgálati végpontokhoz kapcsolódó válaszártékeket a tiszta vizes kontroll segítségével határozzuk meg. Ha nincs statisztikailag szignifikáns különbség a tiszta vizes és az oldószeres kontroll között a mért válaszváltozók tekintetében, a vizsgálati végpontokhoz kapcsolódó válaszártékeket az összevont hígítóvizes és oldószeres kontrollok segítségével határozzuk meg.

A 60. és afeletti fejlődési stádiumokat elérő kezelési csoportok

71. A 60. stádium után – a szöveti reszorpció és az abszolút víztartalom csökkenése miatt – az ebihalak mérete és tömege csökken. Emiatt a nedves tömeg és a farok nélküli testhossz mért értékeit nem lehet felhasználni a növekedési sebességben mutatkozó különbségek kimutatását célzó statisztikai vizsgálatokhoz. Ezért a > 60. Nieuwkoop és Faber szerinti fejlődési stádiumban lévő szervezetekről felvett nedvestömeg- és testhosszadatokat cenzúrázni kell, és nem használhatók az ismétlések átlagainak vagy az ismétlések középértékeinek elemzése során. Két különböző megközelítést lehet alkalmazni ezeknek a növekedéssel kapcsolatos paramétereknek az elemzésére.
72. Az egyik megközelítés szerint a nedves tömeg és/vagy a farok nélküli testhossz statisztikai elemzése során csak a 60. vagy korábbi fejlődési stádiumokban lévő ebihalakat lehet figyelembe venni. Erről úgy vélik, hogy kellően megbízható információt szolgáltat a lehetséges növekedési hatások súlyossága tekintetében, feltéve, hogy a kísérleti állatoknak csak egy kis hányadát zárják ki az elemzésekből ($\leq 20\%$). Ha egy vagy több névleges koncentráció esetében nagyobb mennyiségű ebihal mutat a 60. stádiumon túli fejlettséget ($\geq 20\%$), akkor az összes ebihalon kéttényezős ANOVA-t kell végrehajtani beágyazott varianciastruktúrával a vegyi anyaggal történt kezelések következtében fellépő növekedési hatások felméréséhez, figyelembe véve a fejlődés késői stádiumának hatását a növekedésre. A 3. függelék útmutatást ad a tömeg és a testhossz kéttényezős ANOVA elemzése tekintetében.

SZAKIRODALOM

- (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. függelék

1. táblázat

A 21 napos kétéltű-átalakulási vizsgálat kísérleti feltételei

Vizsgált állat	<i>Xenopus laevis</i> lárvák	
Lárvák kezdeti fejlődési stádiuma	Nieuwkoop és Faber szerinti 51. stádium	
Expozíciós időtartam	21 nap	
Lárvák kiválasztási kritériumai	Fejlődési stádium és teljes testhossz (választható)	
Vizsgálati koncentrációk	Minimum 3 koncentráció körülbelül egy nagyságrenden belül	
Expozíciós rendszer	Átfolyásos (preferált) és/vagy statikus megújítási rendszer	
Vizsgálati rendszer áramlási sebessége	25 ml/perc (a teljes térfogat cseréje kb. 2,7 óránként)	
Elsődleges végpontok / Meghatározás napja	Mortalitás	Naponta
	Fejlődési stádium	7. és 21. nap
	Hátsó végtagok hossza	7. és 21. nap
	Farok nélküli testhossz	7. és 21. nap
	Nedves testtömeg	7. és 21. nap
	Pajzsmirigy szövettana	21. nap
Hígítóvíz / Laboratóriumi kontroll	Klórmentes csapvíz (faszénrel szűrt) vagy ezzel egyenértékű laboratóriumi vízforrás	
Lárvasűrűség	20 lárva/vizsgálati edény (5/l)	
Vizsgálati oldat / Vizsgálati edény	4–10 l (10–15 cm minimális vízszint) / üveg vagy rozsdamentes acél vizsgálati edény (pl. 22,5 cm x 14 cm x 16,5 cm)	
Ismétlések	4 párhuzamos vizsgálati edény / vizsgálati koncentráció és kontroll	
Elfogadható mortalitási arány a kontrollokban	≤ 10 % párhuzamos vizsgálati edényenként	
Pajzsmirigy fixálása	Fixált állatok száma	Minden ebihal (kezdetben ismétlésenként 5 db állatot értékelünk)
	Testtáj	Fej vagy teljes test
	Fixálóoldat	Davidson-féle fixálószer

Táplálás	Táplálék	Sera Micron® vagy azzal egyenértékű
	Mennyiség / Gyakoriság	A Sera Micron®-ra vonatkozó etetési rendet lásd az 1. táblázatban
Megvilágítás	Megvilágítási időszak	12 óra világos: 12 óra sötét
	Erősség	600–2 000 lux (a víz felszínén mérve)
Víz hőmérséklet		22 ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Oldott oxigén (DO) koncentrációja		> 3,5 mg/l (a levegőteltettség > 40 %-a)
Mintavételi ütemterv analitikai kémiai vizsgálatokhoz		Egyszer / Hetente (4 mintavételezés / vizsgálat)

2. függelék

Táblázat a nyers és összesített adatok jegyzőkönyvezéséhez

1. táblázat

Általános információ a vizsgált vegyi anyagról

Kémiai információ		
Adja meg a vizsgált vegyi anyagot, a koncentrációt és a kezeléseket		
Vizsgált vegyi anyag:		
Koncentrációegységek:		
1. kezelés		
2. kezelés		
3. kezelés		
4. kezelés		
Dátum (0. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)
Dátum (7. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)
Dátum (21. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)

2. táblázat

Adatgyűjtő lapok a nyers adatok rögzítéséhez, 7. és 21. nap

X. NAP

DÁTUM 00/00/00

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes szervezet nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátso végtagok hossza (mm)	Teljes szervezetes nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
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							

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes szervezet nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
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							

	Koncentráció	Kezelés sorszama	Ismétlés sorszama	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes szervezet nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

3. táblázat

A 7. és a 21. napon mért végpontra vonatkozó adatok összegzése

KEZE- LÉS	ISMÉTLÉ- S	Fejlődési stádium			Farak nélküli test- hossz (mm)		Hátsó végtagok hossza (mm)		Tömeg (mg)	
		MINIMU- M	KÖZÉP- ÉRTÉK	MAXIM- UM	ÁTLAG	SZÓRÁS	ÁTLAG	SZÓRÁS	ÁTLAG	SZÓRÁS
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!

Megjegyzések: A cellákban lévő számítások a 2. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

4. táblázat

Napi mortalitási adatok

Vizsgálati nap	Dátum	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!																
Ismétlések száma		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezelések száma		0				0				0				0			

Megjegyzések: A cellákban lévő számítások a 1. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

Kémiai név:

CAS-szám:

Vizsgálati nap	Dátum	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!																				

Megjegyzés: A cellákban lévő számítások a 1. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

7. táblázat

Táblázatok az alapvető kórszövettani kritériumok jegyzőkönyvezéséhez

Dátum:

Vegyianyag:

Kórboncnok:

Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés	Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		Pajzsmirigy- hypertrophia	Pajzsmirigy- atrophia	Folikulárissejt- hypertrophia	Folikulárissejt- hyperplasia
Összesen:						

Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés	Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		Pajzsmirigy- hypertrophia	Pajzsmirigy- atrophia	Folikulárissejt- hypertrophia	Folikulárissejt- hyperplasia
Összesen:						

Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés	Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		Pajzsmirigy- hypertrophia	Pajzsmirigy- atrophia	Folikulárissejt- hypertrophia	Folikulárissejt- hyperplasia
Összesen:						

Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés	Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		Pajzsmirigy- hypertrophia	Pajzsmirigy- atrophia	Folikulárissejt- hypertrophia	Folikulárissejt- hyperplasia
Összesen:						

8. táblázat

Kiegészítő kórszöveti kritériumok

Dátum:

Vegyi anyag:

Kórboncnok:

Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		Folikuláris lumen kitágulása	Folikuláris lumen összeszűkülése
Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés			
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója - 1. ismétlés		Folikuláris lumen kitágulása	Folikuláris lumen összeszűkülése
Kezelt állat azonosítója - 2. ismétlés			
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója - 1. ismétlés		Folikuláris lumen kitágulása	Folikuláris lumen összeszűkülése
Kezelt állat azonosítója - 2. ismétlés			
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója - 1. ismétlés		Folikuláris lumen kitágulása	Folikuláris lumen összeszűkülése
Kezelt állat azonosítója - 2. ismétlés			
Összesen:			

9. táblázat

A kórszövetteni vizsgálatok eredményeinek szöveges leírása

Dátum:

Vegyianyag:

Kórboncnok:

Szöveges leírás

Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		
Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója - 1. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója - 2. ismétlés		

Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója - 2. ismétlés		

Kontrollállat azonosítója - 1. ismétlés		
Kontrollállat azonosítója - 2. ismétlés		

10. táblázat:

Összefoglaló mintatáblázat az AMA x. (7. vagy 21.) napi adatainak jegyzőkönyvezéséhez

Végpont	Ismétlés	Kontroll				1. dózis					2. dózis					3. dózis				
		Átlag	Szór- ás	KV	N	Átlag	Szór- ás	KV	N	p-érték	Átlag	Szór- ás	KV	N	p-érték	Átlag	Szór- ás	KV	N	p-érték
Hátsó végtagok Hossz (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			
Farok nélküli testhossz (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			
Nedves tömeg (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			

Összefoglaló mintatáblázat az AMA × (7. vagy 21.) napi fejlődési stádiumra vonatkozó adatainak jegyzőkönyvezéséhez

	Ismétlés	Kontroll				1. dózis					2. dózis					3. dózis				
		Közép- érték	Min	Max	N	Közép- érték	Min	Max	N	p-érték	Közép- érték	Min	Max	N	p-érték	Közép- érték	Min	Max	Közép- érték	p-érték
Fejlődési stádium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			

3. függelék

A tömeg és a hosszúság alternatív elemzése, ha egy vagy több koncentrációnál a fejlődés késői stádiuma figyelhető meg az ebihalak több mint 20 %-ánál

Ha egy vagy több névleges koncentráció esetében nagyobb mennyiségű ebihal mutat a 60. stádiumon túli fejlettséget ($\geq 20\%$), akkor az összes ebihalon kéttényezős ANOVA-t kell végrehajtani beágyazott varianciastruktúrával a vegyi anyaggal történt kezelések következtében fellépő növekedési hatások felméréséhez, figyelembe véve a fejlődés késői stádiumának hatását a növekedésre.

A javasolt eljárás lényege, hogy minden adatot fel kell használni, de figyelembe kell venni a késői fejlődési stádium hatását. Ezt beágyazott varianciastruktúrával végzett kéttényezős ANOVA-val lehet elérni. A KésőiStád. = »Igen« legyen egy adott állat esetében, ha a fejlődési stádiuma 61 vagy annál nagyobb. Ellenkező esetben a KésőiStád. = »Nem« legyen. Ezután el lehet végezni a kéttényezős ANOVA elemzést a koncentráció és a KésőiStád., valamint azok kölcsönhatásának használatával, ahol az Ism.(Konc.) egy véletlen tényező és az Ebihal(Ism.) egy másik véletlen hatás. Ez az eljárás változatlanul az ismétléseket (Ism.) kezeli az elemzés egységeként és lényegében ugyanazt az eredményt adja, mint az ismétlés*késői stádium átlagok súlyozott elemzése, az átlagonkénti állatok számával súlyozva. Ha az adatok nem felelnek meg az ANOVA normalitásra vagy szóráshomogenitásra vonatkozó alkalmazási feltételeinek, normalizált rangsorolós transzformációt lehet végezni e kifogás kiküszöbölése érdekében.

A Konc., illetve a KésőiStád. hatásainak és azok kölcsönhatásának szokásos ANOVA F-próbái mellett az interakciós F-próbát szét lehet »vágni« két további ANOVA F-próbára: az egyik próba az egyes koncentrációk mellett adott átlagos válaszokra vonatkozik, ha KésőiStád. = »Nem«, a másik pedig az egyes koncentrációk mellett adott átlagos válaszokra, ha KésőiStád. = »Igen«. A KésőiStád. valamennyi további szintjén összehasonlításokat végzünk a kezelések átlagai és a kontrollok között. Trendtípusú elemzést lehet végezni megfelelő ellentétek használatával, vagy egyszerű páronkénti összehasonlításokat is lehet készíteni, ha nem monoton dóziszválaszra vonatkozó bizonyíték van a Késői stád. változó valamely szintjén belül. A p-értékek Bonferroni-Holm-féle korrekcióját csak akkor kell elvégezni, ha a hozzá tartozó F-próbarész nem szignifikáns. Ezt az SAS-ban és feltehetően más statisztikai szoftverekben is el lehet végezni. Komplikációk léphetnek fel, ha bizonyos koncentrációkban nincsenek késői stádiumú állatok, de ezeket a helyzeteket egyszerűen lehet kezelni.

*4. függelék***Fogalommeghatározások**

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

C.39. UGRÓVILLÁSOK SZAPORODÁSÁNAK TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 232. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Ezt a vizsgálati módszert a vegyi anyagok ugróvillások talajban megfigyelhető szaporodási teljesítményére kifejtett hatásának vizsgálatára tervezték. A vizsgálati módszer meglévő eljárásokon alapul (1) (2). A partenogenetikus (szűznemzéses) *Folsomia candida* és az ivaroson szaporodó *Folsomia fimetaria* az ugróvillások két leginkább elérhető faja, amelyek tenyésztethetők és kereskedelmi forgalomban is kaphatók. Amikor olyan élőhelyeket kell értékelni ahol e két faj nincs jelen, az eljárás kiterjeszhető más ugróvillás fajokra is, ha azok képesek teljesíteni a vizsgálat érvényességi kritériumait.
2. A talajlakó ugróvillások ökológiailag releváns fajok az ökotoxikológiai vizsgálatok szempontjából. Az ugróvillások hexapod állatok, amelyeknek vékony, levegő és víz számára nagymértékben átjárható külső vázuk van, és a földgilisztákhoz és a televényféreghez képest eltérő expozíciós útvonalat és sebességet mutató izeltlábú fajt képviselnek.
3. Számos szárazföldi ökoszisztémában az ugróvillások populációsűrűsége a talajban és az avarrétegben gyakran eléri a $10^5/m^2$ értéket (3) (4). A felnőtt egyedek jellemzően 0,5–5 mm méretűek, és hozzájárulásuk a talaj összes állati biomaszájához és légzéséhez alacsony, 1–5 %-ra becsülhető (5). A legfontosabb szerepet ezért vélhetően különféle folyamatok szabályozásában töltik be a mikroorganizmusok és a mikrofauna elfogyasztása révén. Az ugróvillások zsákmányállatok a legkülönbözőbb endogeikus és epigeikus gerinctelenek, például az atkák, a százlábúak, a pókok, a futrinkafélék és a holyvafélék számára. Az ugróvillások a savanyú talajokban hozzájárulnak a bomlási folyamatokhoz. Ezekben a talajfajtákban talán a legfontosabb talajlakó gerincteleneknek számítanak a televényféreg mellett, hiszen innen a földgiliszták és az ikerszelvényesek jellemzően hiányoznak.
4. A *F. fimetaria* az egész világon elterjedt és több talajtípusban is fellelhető a homokos talajoktól az agyagos talajokig, illetve a mull talajoktól a mor talajokig. Szem nélküli, nem pigmentált ugróvillás. Mezőgazdasági talajokban való előfordulását Európa-szerte feljegyezték (6). Mindenevő, beleértve a gombafonalakat, baktériumokat, egysejtűeket és törmeléket. A legelésen keresztül kölcsönhatásba lép a növénypatogén gombák okozta fertőzésekkel (7), és befolyásolhatja a mikorrhizákat, amint az a *F. candida* tekintetében közismert. A legtöbb ugróvillás fajhoz hasonlóan ivaroson szaporodik és a peték megtermékenyítéséhez a hímek állandó jelenléte szükséges.
5. A *F. candida* is világszerte előfordul. Bár a legtöbb természetes talajban ritka, a humuszban gazdag területeken gyakran rendkívül nagy számban fordul elő. Szem nélküli, nem pigmentált ugróvillás. Jól fejlett furcával (ugróvillával) és aktív futó mozgással rendelkezik, és azonnal elugrik, ha megzavarják. A *F. candida* ökológiai szerepe hasonló a *F. fimetaria*-éhoz, de élőhelyei szerves anyagokban gazdagabb talajok. Szűznemzéssel szaporodik. A hímek előfordulási aránya kevesebb, mint 1 ezrelék.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Szinkron kifejtett (*F. fimetaria*) vagy fiatal (*F. candida*) ugróvillásokat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag 5 % szervesanyag-tartalmú módosított mesterséges talajba (8) (vagy alternatív talajba) kevert különböző koncentrációinak. A vizsgálati forgatókönyv két lépésre osztható:
 - Dózisbehatároló vizsgálat (ha nem áll rendelkezésre elegendő információ a toxicitás tekintetében), amelynek során a fő végpontok a mortalitás és a szaporodás, amelyeket 2 hét után értékelünk a *F. fimetaria* és 3 hét után a *F. candida* esetében.
 - Meghatározó szaporodási vizsgálat, amelyben a szülőállatok által nemzett fiatal állatok teljes számát, valamint a szülőállatok túlélési arányát értékeljük. A meghatározó vizsgálat időtartama 3 hét a *F. fimetaria* és 4 hét a *F. candida* esetében.

A vizsgált vegyi anyagnak a felnőtt állatok mortalitására és reprodukciós teljesítményére kifejtett toxikus hatását az LC_x és az EC_x értékekkel fejezzük ki (az adatoknak nemlineáris regresszió útján egy megfelelő modellhez történő illesztésével, hogy megbecsülhessük azt a koncentrációt, amely x % mortalitást okozna vagy a reprodukciós teljesítmény x %-os csökkenését okozná), vagy alternatív megoldásként a NOEC/LOEC értékekkel (9).

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. Lehetőleg ismerni kell a vizsgált vegyi anyag fizikai tulajdonságait, vízben való oldhatóságát, $\log K_{ow}$ értékét, talaj/víz megoszlási hányadosát és gőznyomását. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk is, mint például a fotolízis, a hidrolízis és a biotikus lebomlás sebessége. Amennyiben rendelkezésre áll, dokumentálni kell a vizsgált vegyi anyag IUPAC-nómenklatúra szerinti kémiai azonosítását, CAS-számát, tételszámát, szerkezeti képletét és tisztaságát.
8. E vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő/víz megoszlási hányadosa egynél nagyobb, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

9. A vizsgálati eredmény érvényességéhez a kezeletlen kontrolloknak a következő kritériumoknak kell megfelelniük:
 - A kifejlett egyedek átlagos mortalitása a vizsgálat végén nem haladja meg a 20 %-ot;
 - A fiatal egyedek átlagos száma a vizsgálat végén edényenként legalább 100;
 - A fiatal egyedek átlagos számának relatív szórása a meghatározó vizsgálat végén nem haladja meg a 30 %-ot.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

10. A választott vizsgálati talajtípus esetében szabályos időközönként vagy esetleg minden egyes vizsgálatba beépítve egy referencia-vegyianyagot is vizsgálni kell az anyag EC_{50} koncentrációjában annak ellenőrzésére, hogy a vizsgálati rendszerben részt vevő vizsgálati organizmusok a normális szinteken belül reagálnak. Megfelelő referencia-vegyianyag a bórsav, amelynek 100 mg/kg száraz talaj koncentrációja mindkét faj esetében körülbelül 50 %-kal kell, hogy csökkentse a szaporodást (10) (11).

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és berendezések

11. Megfelelő vizsgálati edények a 30 g nedves talaj tárolására alkalmas tartályok, amelyeknek üvegből vagy inert (nem toxikus) műanyagból kell lenniük. A műanyag tartályok használatát azonban el kell kerülni, ha a szorpció miatt a vizsgált vegyi anyagnak való expozíció csökken. A vizsgálati edény keresztmetszetének akkorának kell lennie, hogy a vizsgálati edényben 2–4 cm-es tényleges talajmélység legyen elérhető. Az edényeknek (pl. üveg vagy polietilén) fedéllel kell rendelkezniük, amely csökkenti a víz párolgását, miközben lehetővé teszi a gázcserét a talaj és a légkör között. A tartálynak legalább részben átlátszónak kell lennie, hogy átértesse a fényt.
12. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:
 - szárítószekrény;
 - sztereomikroszkóp;
 - pH-mérő és megvilágításmérő;
 - megfelelő, pontos mérlegek;
 - megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;
 - megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeket fedél takarja);
 - szabályozott hőmérsékletű inkubátor vagy kis helyiség;
 - csipesz vagy alacsony szívóhatású levegőáramoltató eszköz.

A vizsgálati talaj előkészítése

13. Módosított mesterséges talajt (8) használunk 5 % szervesanyag-tartalommal. Alternatív megoldásként természetes talajt is lehet használni, mivel a mesterséges talaj nem hasonlít a természetes talajokra. A mesterséges talaj javasolt összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on tömegállandóságig szárítva):

- 5 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2 ± 1 mm-es részecskeméret elfogadható);
- 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);
- körülbelül 74 % levegőn szárított kvarchomok (a CaCO_3 szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, legalább 50 %-ban 50–200 mikron közötti részecskemérettel. A homok pontos mennyisége a CaCO_3 mennyiségétől függ (lásd lent), együttes mennyiségüknek el kell érnie a 75 %-ot.
- 1,0 % kalcium-karbonát (CaCO_3 , porított, analitikai tisztaságú) pH = $6,0 \pm 0,5$ eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ (lásd az 1. megjegyzést).

1. megjegyzés: A szükséges CaCO_3 mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ és előzetesen inkubált nedvestalaj-részminták pH-jának közvetlenül a vizsgálat előtt történő mérése útján kell meghatározni.

2. megjegyzés: Javasolt megmérni a talaj pH-ját és adott esetben C/N arányát, kationcserélő kapacitását (Cation Exchange Capacity, CEC) és szervesanyag-tartalmát is a későbbi normalizáció és az eredmények jobb értelmezése érdekében.

3. megjegyzés: Szükség esetén – például specifikus vizsgálati célokból – nem szennyezett területről származó természetes talajok is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztőszubsztrátumként. Ha természetes talajt használunk, annak jellemzői közül legalább az eredetét (gyűjtőhely), pH-ját, textúráját (szemcseméret-eloszlás), CEC-értékét és szervesanyag-tartalmát fell kell jegyezni. A természetes talajok meghatározó vizsgálatban történő használata előtt ajánlatos igazolni azok vizsgálatra és a vizsgálat érvényességi kritériumainak teljesítésére való alkalmasságát.

14. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 5. függelékében leírt eljárásokkal összhangban határozzuk meg. A vizsgálati talaj nedvességtartalmát optimalizálni kell, hogy laza, porózus talajszerkezetet kapjunk, amely lehetővé teszi az ugróvillások számára a pórusokba való bejutást. Ez általában a maximális WHC 40–60 %-a közé esik.
15. A savasság kiegyensúlyozása/stabilizálása érdekében a száraz mesterséges talajt a vizsgálat kezdete előtt 2–7 nappal előnedvesítjük annyi ioncserélt víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom körülbelül felét érjük el. A pH-érték meghatározása céljából talaj és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid (CaCl_2) oldat 1:5 arányú keverékét használjuk (a 6. függelék szerint). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb, a pH-t megfelelő mennyiségű CaCO_3 hozzáadásával állíthatjuk be. Ha a talaj túl lúgos, pH-ját az ugróvillásokra ártalmatlan szervetlen sav hozzáadásával állíthatjuk be.
16. Az előnedvesített talajt a vizsgálati koncentrációk (és adott esetben a referencia-vegyianyagok), illetve a vizsgálatban használt kontrollok számának megfelelő számú részre osztjuk. Hozzáadjuk a vizsgált vegyi anyagokat, és a víztartalmat a 24. pont szerint beállítjuk.

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

17. Az ajánlott faj a partenogenetikus *F. candida*, mivel ez a faj a vizsgálati módszer körvizsgálatában (11) gyakrabban teljesítette a túlélési arányra vonatkozó érvényességi kritériumokat, mint a *F. fimetaria*. Ha más faj használunk, annak meg kell felelnie a 9. pontban felvázolt érvényességi kritériumoknak. A vizsgálat elején a vizsgálati állatoknak jól tápláltnak és a *F. fimetaria* esetén 23–26 napos, a *F. candida* esetén pedig 9–12 napos korúnak kell lenniük. Minden ismétlésnek 10 hím és 10 nőstény *F. fimetaria* ugróvillást kell tartalmaznia, a *F. candida* esetében pedig 10 nőstényt kell használni (lásd a 2. és 3. függelékét). A szinkron állatokat véletlenszerűen választjuk ki az edényekből, és az ismétlésekhez adott minden adag ugróvillás esetében ellenőrizzük az állatok egészségi és fizikai állapotát. A 10/20 egyedből álló csoportokat véletlenszerűen kiválasztott vizsgálati tartályokba tesszük, és a *F. fimetaria* nőstényei közül nagy egyedeket választunk ki, hogy azok jól megkülönböztethetők legyenek a *F. fimetaria* hímeitől.

A vizsgálati koncentrációk elkészítése

18. A vizsgált vegyi anyag bevitelére négy módszer használható: 1) a vizsgált vegyi anyag vízzel mint hordozóval történő bekeverése a talajba, 2) a vizsgált vegyi anyag szerves oldószer hordozóval történő bekeverése a talajba, 3) a vizsgált vegyi anyag homok hordozóval történő bekeverése a talajba, vagy 4) a vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása. A vegyi anyag tulajdonságai és a vizsgálat célja határozzák meg, hogy melyik a megfelelő módszer. Általánosságban a vizsgált vegyi anyag talajba történő bekeverése ajánlott. Ugyanakkor olyan bejuttatási eljárásokra is szükség lehet, amelyek összhangban vannak a vizsgált vegyi anyag gyakorlati alkalmazásával (például folyékony készítmény permetezése vagy olyan speciális növényvédőszer-készítmények használata, mint a granulátumok vagy csávázószerkezetek). A talajt az ugróvillások hozzáadása előtt kezeljük, kivéve, amikor a vizsgált vegyi anyagot a talaj felszínén alkalmazzuk. Ilyenkor előbb hagyjuk, hogy az ugróvillások bejussanak a talajba.

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált anyagból ioncserélt vízben olyan mennyiségű oldatot készítünk, amely az adott vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. A vizsgálati edénybe történő bejuttatás előtt a vizsgált vegyi anyagból készített minden oldatot alaposan összekeverünk egy adag előnedvesített talajjal.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. Vízen oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldható vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani egy megfelelő oldószer (például aceton) olyan lehető legkisebb mennyiségében, amely mellett a vegyi anyag még megfelelően elkeveredik a talajban, majd össze kell keverni a szükséges kvarchomok egy részével. Csak illékony oldószereket szabad használni. Amikor szerves oldószert használunk, minden vizsgálati koncentrációnak és a kiegészítő negatív oldószeres kontrollnak is a hordozó azonos minimális mennyiségét kell tartalmaznia. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásához használt tartályokat egy ideig fedetlenül kell hagyni, hogy a vizsgált vegyi anyag beviteléhez használt oldószer elpárologhasson, de meg kell előzni, hogy a toxikus vegyi anyag ezen idő alatt esetleg eltávozzon.

Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vegyi anyagok

21. Vízen és szerves oldószerekben rosszul oldódó vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez – a talajhoz hozzáadott teljes homokmennyiség részét képező – kvarchomokot keverünk össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, miután alaposan elkevertük megfelelő mennyiségű ioncserélt vízzel ahhoz, hogy a szükséges nedvességtartalmat kialakítsuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást megismételjük minden vizsgálati koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítünk.

A vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása

22. Ha a vizsgált vegyi anyag növényvédő szer, helyénvaló lehet azt a talaj felszínére történő permetezéssel bejuttatni. A talajt az ugróvillások hozzáadása után kezeljük. A vizsgálati tartályokat először megtöltjük a nedvesített talajszubsztrátummal, majd hozzáadjuk az állatokat, és ezután lemérjük a vizsgálati tartályokat. Annak érdekében, hogy elkerüljük az állatok vizsgált vegyi anyaggal való közvetlen érintkezés útján történő expozícióját, a vizsgált vegyi anyagot legalább fél órával az ugróvillások behelyezése után alkalmazzuk. A vizsgált vegyi anyagot – alkalmas laboratóriumi permetező segítségével – lehetőleg egyenletesen kell a talajfelszínen alkalmazni, szimulálva a valós viszonyok közötti permetezést. Az alkalmazást ± 2 °C szórású hőmérsékleti tartományon belül kell végezni, illetve vizes oldatok, emulziók vagy diszperziók esetében vizet a kockázatelemzési ajánlások szerinti arányban kell használni. Az arányt megfelelő kalibrációs technikával kell hitelesíteni. A különleges készítményformákat, úgymint a granulátumokat vagy csávázószerkezeteket a mezőgazdasági felhasználással megegyező módon lehet alkalmazni. A táplálékot a permetezés után adjuk hozzá.

ELJÁRÁS

Vizsgálati körülmények

23. A vizsgálat hőmérséklete 20 ± 2 °C-os hőmérsékleti tartományon belül mozoghat, és átlagos hőmérséklete 20 ± 1 °C lehet. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok mellett végezzük (lehetőleg 12 óra világos és 12 óra sötét), a vizsgálati edények területén 400–800 lux megvilágítással.

24. A talajnedvesség ellenőrzése érdekében az edényeket a vizsgálat kezdetén, közepén és végén lemérjük. A 2 %-ot meghaladó tömegvesztésüket ionmentesített víz hozzáadásával pótoljuk. Megjegyzendő, hogy a vízvesztés csökkenthető, ha a vizsgálati inkubátorban magas levegő-páratartalmat (> 80 %) tartunk fenn.
25. A pH-t a dózisbehatóró vizsgálat és a meghatározó vizsgálat elején és végén egyaránt meg kell mérni. A méréseket egy extra kontrollmintán és a kezelt talajok egy olyan extra mintáján is el kell végezni (az összes koncentráció esetében), amelyet ugyanúgy készítünk és tartunk fenn, mint a vizsgálati tenyészeteket, de ugróvillásokat nem tartalmaz.

Vizsgálati eljárás és mérések

26. Minden vizsgálati koncentráció esetében 30 g friss tömegnek megfelelő mennyiségű vizsgálati talajt töltünk a vizsgálati edénybe. A vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó vizes kontrollokat is készítünk. Ha hordozót használunk a vizsgált vegyi anyag bevitelére, a vizsgálati sorozat mellett egy hordozót tartalmazó kontrollsorozatot is le kell futtatni. Az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációjának meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval.
27. Az ugróvillásokat óvatosan tesszük át az edényekbe (az állatokat a vizsgálati edények között véletlenszerűen szétosztva), és a talaj felszínére helyezzük őket. Az állatok hatékony áthelyezéséhez alacsony szívóhatású levegőáramoltató eszközt használhatunk. A vizsgálati koncentrációk és kontrollok ismétléseinek száma az alkalmazott vizsgálati tervtől függ. A vizsgálati edényeket véletlenszerűen helyezzük el a vizsgálati inkubátorban, és az edények pozícióját hetente véletlenszerűen megváltoztatjuk.
28. A *F. fimetaria*-val végzett vizsgálatokhoz vizsgálati edényenként húsz felnőtt állatot kell használni, egyenként 10–10 db 23–26 napos hímmel és nősténnyel. A 21. napon az ugróvillásokat kiemeljük a talajból és megszámloljuk. A *F. fimetaria* esetében az ivarokat a vizsgálatokhoz használt szinkron állatállományban az állatok mérete alapján különböztetjük meg. A nőstények jellegzetesen nagyobbak, mint a hímek (lásd a 3. függelék).
29. A *F. candida*-val végzett vizsgálatban tíz db 9–12 napos fiatal egyedeket kell használni vizsgálati edényenként. A 28. napon az ugróvillásokat kiemeljük a talajból és megszámloljuk.
30. Táplálékforrásként a vizsgálat elején, majd körülbelül két hét múlva megfelelő mennyiségű, pl. 2–10 mg – kereskedelmi forgalomban kapható háztartási célú – granulált szárított sütőélesztőt adunk mindegyik tartályhoz.
31. A vizsgálat végén elemezzük a mortalitást és a szaporodást. Az ugróvillásokat 3 hét (*F. fimetaria*) vagy 4 hét (*F. candida*) múlva kiemeljük a vizsgálati talajból (lásd a 4. függelék), és megszámloljuk őket (12). Az ugróvillás példány elhullotként kerül rögzítésre, ha nincs jelen a talajból kiemelt állatok között. A kiemelési és számlálási módszert validálni kell. Az érvényességhez a fiatal egyedek kiemelésében 95 %-ot meghaladó hatásfokot kell elérni, amelyet pl. ismert számú példány talajhoz adásával lehet ellenőrizni.
32. A vizsgálati eljárás gyakorlati összefoglalója és ütemezése a 2. függelékben található.

Vizsgálati terv

Dózisbehatóró vizsgálat

33. Szükség esetén dózisbehatóró vizsgálatot végzünk, például a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával (0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg száraz talaj), a kezeléseket és a kontrollokat egyaránt két ismétlésben. A hasonló vegyi anyagokkal végzett vizsgálatokból vagy a szakirodalomból származó, az ugróvillások mortalitására és szaporodására vonatkozó egyéb információk is hasznosak lehetnek a dózisbehatóró vizsgálatban használandó koncentrációtartomány meghatározásakor.
34. A dózisbehatóró vizsgálat időtartama két hét a *F. fimetaria* és 3 hét a *F. candida* esetében, amellyel biztosítható, hogy az ugróvillások nemzzenek egy generációnyi fiatal egyedeket. A vizsgálat végén értékeljük az ugróvillások mortalitását és szaporodását. A felnőtt egyedek számát és a fiatal példányok előfordulását fel kell jegyezni.

Meghatározó vizsgálat

35. Az EC_x (például EC_{10} , EC_{50}) kiszámításához tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden vizsgálati koncentráció esetében legalább két ismétlés és hat kontrollismétlés bevonása javasolt. A szorzótényező a dóziszválasz mintától függően változhat.
36. A NOEC/LOEC meghatározásához legalább öt, mértani sorozatba rendezett koncentrációt kell vizsgálni. Minden vizsgálati koncentráció esetében négy ismétlés plusz nyolc kontroll bevonása javasolt. A koncentrációk közötti távolság nem haladhatja meg az 1,8-as szorzótényezőt.
37. Egy kombinált módszer lehetővé teszi mind a NOEC/LOEC, mind az EC_x meghatározását. A kombinált megközelítéshez nyolc, mértani sorozatot alkotó kezelési koncentrációt kell használni. Kezelésként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A koncentrációk közötti távolság nem haladhatja meg az 1,8-as szorzótényezőt.
38. Ha a dózisbehatóró vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb (azaz az 1 000 mg/kg-os) koncentráció esetében, a szaporodási vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg vizsgálati koncentráció és a kontroll használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget biztosít annak igazolására, hogy a határkoncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása. A kezelt talaj és a kontroll esetében egyaránt nyolc ismétlést kell használni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

39. A fő végpont a szaporodási teljesítmény (pl. a fiatal egyedek száma vizsgálati edényenként). A statisztikai elemzés (például ANOVA eljárások) során Student-féle t-próbával, Dunnett-féle próbával vagy Williams-féle próbával hasonlítjuk össze a kezeléseket. Kiszámítjuk az egyes kezelések átlagának 95 %-os konfidenciaintervallumát.
40. Jelentős érvényességi kritérium a túlélő felnőtt egyedek száma a kezeletlen kontrollokban, ezért azt dokumentálni kell. A dózisbehatóró vizsgálatához hasonlóan minden egyéb károsodásra utaló jelet fel kell tüntetni a záró jegyzőkönyvben is.

LC_x és EC_x

41. Az EC_x -értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os konfidenciaintervallumokat, a megfelelő statisztikai módszerekkel számítjuk ki (pl. logisztikus vagy Weibull-függvény, csonkolt Spearman–Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). Az EC_x -értéket úgy kapjuk meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztünk egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a teljes adathalmazt regresszióanalízisnek kell alávetni. Az LC_{50} -értéket általában probitanalízissel vagy olyan hasonló elemzéssel becsüljük, amely figyelembe veszi a binomiális eloszlású mortalitási adatokat.

NOEC/LOEC

42. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az »Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató« című 54. OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni (9). A vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlított káros hatásait általában egyoldali hipotézis-vizsgálattal vizsgáljuk ($p \leq 0,05$).
43. A normál eloszlást és a szóráshomogenitást megfelelő statisztikai próbával, pl. a Shapiro–Wilk-féle, illetve a Levene-féle próbával ($p \leq 0,05$) lehet tesztelni. Egyutas varianciaanalízist (ANOVA) és azt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Többszörös összehasonlításokkal (pl. Dunnett-féle próba) vagy lefelé lépegető trendpróbákkal (pl. Williams-féle próba) lehet kiszámítani, hogy vannak-e jelentős különbségek ($p \leq 0,05$) a kontrollok és a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi között (az ajánlott próbát az 54. OECD-dokumentum (9) szerint kell kiválasztani). Ellenkező esetben nem parametrikus módszereket (pl. a Holm szerinti Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–Terpstra trendpróbát) lehet használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

44. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztünk, és a parametrikus vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat a Student-féle próba (t-próba) alapján értékelhetjük. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann–Whitney-féle U-próba alkalmazható.
45. A kontrollok (a kontroll és az oldószeres kontroll) közötti szignifikáns különbség meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint lehet vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontrollok és az oldószeres kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószeres kontrollal kell összehasonlítani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

46. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

- a vizsgált vegyi anyag azonosítása, tétel- és CAS-száma, tisztasága;
- a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log Kow, vízdoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó esetleges információk), ha rendelkezésre állnak;
- ha nem a tiszta vegyi anyagot vizsgáljuk, meg kell adni a vizsgált vegyi anyag formulázását és az adalékokat;

A vizsgálathoz használt organizmusok

- a faj azonosítása és a vizsgálathoz használt organizmusok szállítója, tenyésztési feltételek és a vizsgálathoz használt organizmusok életkor-tartományának leírása;

Vizsgálati körülmények

- a vizsgálati terv és eljárás leírása;
- a vizsgálati talaj elkészítésének részletei; részletes leírás, ha természetes talajt használunk (eredet, történet, szemcseméret-eloszlás, pH, szervesanyag-tartalom);
- a talaj víztartó képessége;
- a vizsgált vegyi anyag talajba történő bejuttatásához használt technika leírása;
- vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;
- az etetési rend leírása, a vizsgálatban használt táplálék típusa és mennyisége, etetési dátumok;
- a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat kezdetén és végén (kontroll és mindegyik kezelés);
- a kiemelési eljárás részletes leírása és a kiemelés hatásfoka;

Vizsgálati eredmények

- a fiatal egyedek vizsgálat végén meghatározott száma az egyes edényekben;
- a felnőtt egyedek száma és mortalitása (%) az egyes edényekben a vizsgálat végén;
- a nyilvánvaló fiziológiai vagy patológias tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;
- a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;
- a NOEC/LOEC értékek, a mortalitás LC_x és a szaporodás EC_x értékei (többnyire LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} és EC_{10}) a 95 %-os konfidenciaintervallumokkal együtt. A számításhoz használt illesztett modell grafikonja, függvényegyenlete és paraméterei (lásd (9));

- az eredmények értelmezéséhez segítséget nyújtó minden információ és megfigyelés;
- ha hipotézisvizsgálatot végeztünk (9), a tényleges vizsgálat ereje;
- az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérés és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény;
- a vizsgálat érvényessége;
- a minimális kimutatható különbség a NOEC esetében, ha azt becsüljük.

SZAKIRODALOM

- (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) E melléklet C.36. fejezete: »Ragadozó atkák (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) szaporodásának talajban végzett vizsgálata«.
- (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. *Toxic. 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. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben a következő fogalommeghatározások alkalmazandók (a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálati talaj száraz tömegének hányadosaként vannak kifejezve):

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely mellett még nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak adott expozíciós idő alatt a kontrollal összehasonlítva nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$).

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legkisebb koncentrációja, amelynek van adott expozíciós idő alatt statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest.

ECx (hatáskoncentráció x %-os hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely adott expozíciós idő alatt a kontrollal összehasonlítva valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati organizmusokban. Például az EC₅₀ az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a meghatározott expozíciós idő alatt a neki kitett populáció 50 %-ában okoz hatást.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

Az ugróvillás-vizsgálat végrehajtásának főbb lépései és ütemezése

A vizsgálat lépései a következőképpen foglalhatók össze:

Idő (nap)	Lépés
-23-tól -26-ig	A szinkron <i>F. fimetaria</i> -tenyészet elkészítése
-14	A mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése) A mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése és beállítása szükség szerint A talaj maximális WHC értékének mérése
-9-től -12-ig	A szinkron <i>F. candida</i> -tenyészet elkészítése
-2-től -7-ig	A talaj előnedvesítése
-1	A fiatal egyedek több állományra osztása Törzsoldatok készítése és a vizsgált vegyi anyag alkalmazása, ha oldószerre van szükség
0	Törzsoldatok készítése és a vizsgált vegyi anyag alkalmazása, ha szilárd, illetve vízben oldható vegyi anyagról van szó vagy felszíni alkalmazás szükséges. A talaj pH-jának és a tartályok tömegének mérése. Táplálék hozzáadása. Az ugróvillások bejuttatása.
14	Dózisbehatóró vizsgálat a <i>F. fimetaria</i> esetében: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízvesztés mérése (tömeg) Meghatározó vizsgálatok: A nedvességtartalom mérése és a víz pótlása, valamint 2–10 mg élesztő hozzáadása
21	Meghatározó <i>F. fimetaria</i> -vizsgálat: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízvesztés mérése (tömeg) Dózisbehatóró vizsgálat a <i>F. candida</i> esetében: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízvesztés mérése (tömeg)
28	Meghatározó <i>F. candida</i> -vizsgálat: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízvesztés mérése (tömeg)

3. függelék

Iránymutatás a *F. fimetaria* és a *F. candida* neveléséhez és szinkronizálásához

Az ebben az iránymutatásban megadott időpontokat és időtartamokat minden konkrét ugróvillás törzs esetében ellenőrizni kell, hogy az időzítés révén megfelelő mennyiségű szinkron fiatal egyed jöjjön létre. A petegyűjtés és a szinkron fiatal egyedek gyűjtésének megfelelő napját alapvetően a felnőtt példányok friss tenyésztőközegbe történő átvitelét követő peterakás, illetve a peték kikelése határozza meg.

Javasolt egy pl. 50 tartályból/Petri-csészéből álló állandó törzstenyészetet fenntartani. A törzstenyészet heti etetés, itatás, valamint a régi táplálék és a tetemek eltávolítása révén jól táplált állapotban kell tartani. Ha túl kevés ugróvillás van a tenyésztőközegben, annak a fokozottabb gombanövekedés miatt gátló hatása lehet. A törzstenyészet kifáradhat, ha túl gyakran használják petetermelésre. Az elhullott felnőtt egyedek és a tenyésztőközegen megjelenő penész a fáradtság jele. A szinkron állatok tenyésztése során megmaradt petéket a tenyészet felfrissítésére lehet használni.

A *F. fimetaria* szinkron tenyészetben a hímeket elsősorban a méretük alapján lehet megkülönböztetni a nőstényektől. A hímek egyértelműen kisebbek, mint a nőstények, és a hímek gyorsabban mozognak a nőstényeknél. Az állatok ivarok szerinti helyes kiválasztása kis gyakorlást igényel, és megerősíthető az ivarszervek területének mikroszkópos vizsgálatával (13).

1. Nevelés**1.a. A tenyésztőközeg elkészítése**

A tenyésztőközeg gipsz (kalcium-szulfát) aktív faszénnel. Ez egy nedves közeget biztosít, a faszén funkciója pedig az, hogy megkösse a gázokat és a salakanyagokat (14) (15). A faszénet különböző alakokban lehet alkalmazni az ugróvillások megfigyelésének megkönnyítésére. Porított faszénet használunk például a *F. candida* és *F. fimetaria* esetében (amellyel fekete/szürke gipszet kapunk):

A tenyésztőközeg összetevői:

- 20 ml aktív faszén
- 200 ml desztillált víz
- 200 ml gipsz

vagy

- 50 g porított aktív faszén
- 260–300 ml desztillált víz
- 400 g gipsz.

A közeghez használt keveréket használat előtt állni hagyjuk.

1.b. Tenyésztés

Az ugróvillásokat tartályokban – például Petri-csészékben (90 mm × 13 mm) – tartjuk, amelyek alját a tenyésztőközeg 0,5 cm-es rétege fedi. A tenyésztési hőmérséklet 20 ± 1 °C, a világos-sötét ciklus 12–12 óra (400–800 lux). A tartályokat mindenkor nedvesen tartjuk, hogy a bennük lévő levegő relatív páratartalma 100 % legyen. Ez úgy biztosítható, ha szabad víz van a porózus gipszben, de el kell kerülni, hogy összefüggő vízréteg alakuljon ki a gipsz felületén. A vízvesztés úgy előzhető meg, hogy párás külső levegőt biztosítunk. A tartályokból az elpusztult egyedeket, valamint a penészes táplálékot el kell távolítani. A peterakás ösztönzése érdekében a felnőtt állatokat át kell tenni újonnan előállított gipsz/faszén tenyésztőközeget tartalmazó Petri-csészékbe.

1.c. Táplálékforrás

A granulált szárított sütőélesztő az egyedüli táplálékforrás az *F. candida* és a *F. fimetaria* esetében egyaránt. A gombaképződés elkerülése érdekében hetente egyszer vagy kétszer biztosítunk friss táplálékot. A táplálékot közvetlenül a gipszre helyezjük egy kis halomban. Az állatoknak adott sütőélesztő mennyiségét az ugróvillás-populáció méretéhez kell igazítani, de általában 2–15 mg elegendő.

2. Szinkronizálás

A vizsgálatot szinkron állatokkal kell végezni, hogy ugyanolyan stádiumú és méretű homogén vizsgálati állatokat tudjunk használni. A szinkronizálás révén továbbá 3 hetes koruktól kezdődően megkülönböztethetők egymástól a *F. fimetaria* hímek és nőstények az ivari kétalakúság miatt létrejövő méretbeli különbségek alapján. Az alábbiakban egy javasolt eljárást mutatunk be a szinkron állatok létrehozására (a gyakorlati lépések nem kötelező jellegűek).

2.a. Szinkronizálás.

- Készítsünk elő 0,5 cm vastag gipsz-faszén tenyésztőközeget tartalmazó tartályokat.
- A törzstenyészet 4–8 hetes tenyésztőközeget tartalmazó legjobb 15–20 tartályából peterakás céljából tegyünk át a tartályokba 150–200 felnőtt *F. fimetaria* és 50–100 *F. candida* egyed, és adjunk az állatoknak 15 mg élesztőt. Ne tegyünk át a felnőttekkel együtt fiatal példányokat, mivel a fiatal egyedek jelenléte gátolhatja a petetermelést.
- Tartsuk a tenyészetet 20 ± 1 °C-on (az átlagos hőmérséklet 20 °C legyen), a világos-sötét ciklus pedig 12–12 óra (400–800 lux) legyen. Gondoskodjunk arról, hogy friss táplálék álljon rendelkezésre és a levegő vízzel telített legyen. A táplálék hiánya ahhoz vezethet, hogy az állatok a petékre ürítenek, amelynek következtében gombák szaporodhat el a petéken, illetve a *F. candida* ilyen esetben megeheti saját petéit. 10 nap múlva túlv és spatulával óvatosan gyűjtsük össze a petéket és tegyük őket »petepapírra« (gipsz-faszén szuszpenzióba mártott kis szűrőpapír-darabokra), majd helyezzük őket egy friss gipsz/faszén tenyésztőközeget tartalmazó tartályba. Adjunk pár szem élesztőt a tenyésztőközeghez, amely odavonzza a fiatal példányokat, így azok elhagyják a petepapírt. Fontos, hogy a petepapír és a tenyésztőközeg nedves legyen, máskülönben a peték kiszáradnak. Alternatív megoldásként a kifejtett állatokat 2 vagy 3 napos peterakás után is el lehet távolítani a szinkronizáló tenyésztődobozokból.
- Három nap múlva a petepapíron lévő legtöbb pete kikel, és a petepapír alatt is lehet esetleg néhány fiatal egyed.
- Annak érdekében, hogy megegyező korú fiatal egyedek álljanak rendelkezésre, a petepapírt a ki nem kelt petékkel együtt csipesszel eltávolítjuk a Petri-csészéből. A fiatal, ekkor 0–3 napos példányok az edényben maradnak, és élesztővel etetjük őket. A ki nem kelt petéket kidobjuk.
- A petéket és a kikelt fiatal egyedeket ugyanolyan módon tenyésztjük, mint a felnőtteket. Az *F. fimetaria* esetében különösen az alábbi intézkedéseket kell tenni: megfelelő mennyiségű friss táplálékot kell biztosítani, a régi, penészedő táplálékot el kell távolítani, 1 hét után a fiatal egyedeket szét kell osztani új Petri-csészékbe, feltéve, hogy az egyedsűrűség meghaladja a 200-at.

2.b. Az ugróvillások kezelése a vizsgálat kezdetén

- A 9–12 napos *F. candida* vagy 23–26 napos *F. fimetaria* egyedeket összegyűjtjük (pl. szívással), és egy nedves gipsz-faszén tenyésztőközeget tartalmazó kis tartályban szabadon engedjük, majd pedig binokuláris mikroszkóp alatt ellenőrizzük a fizikai állapotukat (a sérült és károsodott állatokat eltávolítjuk). Minden lépést úgy kell végrehajtani, hogy közben az ugróvillásokat – a szárazság okozta stressz elkerülése érdekében – nedves környezetben tartjuk, pl. nedvesített felületek, stb. használatával.
- Fordítsuk a tartályt fejjel lefelé és ütögessük meg, hogy az ugróvillásokat átmozgassuk a talajba. A statikus elektromosságot semlegesíteni kell, különben az állatok csak a levegőbe repülnek, vagy a vizsgálati tartály oldalára tapadnak és kiszáradnak. A semlegesítéshez ionizáló vagy a tartály alá helyezett nedves ruhát használhatunk.
- A táplálékot a talaj teljes felszínén szét kell teríteni, nem szabad egy kupacban lerakni.

- A szállítás és a vizsgálati időszak alatt el kell kerülni a vizsgálati tartályok ütögetését és az egyéb fizikai behatásokat, mivel az fokozhatja a talaj tömörödését, és akadályozhatja az ugróvilások közötti interakciót.

3. Alternatív ugróvilás fajok

Az e vizsgálati módszer szerinti vizsgálathoz egyéb ugróvilás fajokat is lehet választani, például a *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta* nevű fajokat. Az alternatív fajok használata előtt számos előfeltételt kell teljesíteni, így:

- A fajt egyértelműen azonosítani kell;
- A faj kiválasztását meg kell indokolni;
- Biztosítani kell, hogy a vizsgálati fázis magában foglalja a reprodukzív biológiát is, hogy az is az expozíció potenciális célpontja legyen;
- Ismerni kell a faj életciklusát: ivarérettségi kor, petefejlődés időtartama, az expozíciónak kitett lárvastádium;
- A vizsgálati közegnek és a táplálékforrásnak optimális körülményeket kell biztosítania a növekedéshez és a szaporodáshoz;
- A változékonyságnak elég alacsonynak kell lennie a toxicitás precíz és pontos becsléséhez.

—

4. függelék

Az állatok kiemelése és számlálása

1. A kiemelést két módszerrel lehet végezni.

- 1.a. Első módszer: Használhatunk MacFadyen elvein alapuló szabályozott hőmérsékleti gradiensű extraktort (1). A hő az extrakciós doboz tetején található fűtőelemből érkezik (a talajminta felületére helyezett termisztor szabályozza). A gyűjtőedényt körülvevő hűtött folyadék hőmérsékletét a gyűjtődoboz felszínén található termisztor szabályozza (a talaj magja alatt elhelyezve). A termisztorok egy programozható vezérlőegységhez csatlakoznak, amely egy előre programozott ütemterv szerint emeli a hőmérsékletet. Az állatokat a hűtött gyűjtődobozban gyűjtjük (2 °C), amelynek alján gipsz-faszén réteg található. Az extrakciót 25 °C-on kezdjük, majd a hőmérsékletet 12 óránként 5 °C-kal automatikusan megemeljük. Az extrakció teljes időtartama 48 óra. Az extrakciót 12 óra elteltével 40 °C-on fejezzük be.
- 1.b. Második módszer: A fiatal ugróvillások számát a kísérleti inkubációs idő eltelte után flotáció útján mérjük. Ehhez a vizsgálatot körülbelül 250 ml térfogatú edényekben végezzük. A vizsgálat végén kb. 200 ml desztillált vizet adunk az edényhez. A talajt egy finom ecsettel óvatosan megmozgatjuk, hogy az ugróvillások felemelkedjenek a víz felszínére. A számlálás megkönnyítésére kis mennyiségű (kb. 0,5 ml) fekete Kentmere fényképészeti festéket adhatunk a vízhez, amely növeli a víz és a fehér ugróvillások közötti kontrasztot. A festék az ugróvillások számára nem mérgező.

2. Számlálás:

A számlálás szabad szemmel vagy fénymikroszkóp alatt végezhető a lebegtető edény fölé helyezett rács segítségével, vagy úgy, hogy lefényképezzük az edények felszínét, és az ugróvillásokat a kinagyított és kinyomatott vagy kivetített fényképen számoljuk meg. A számlálás digitális képfeldolgozási technikák segítségével is elvégezhető (12). Minden technikát validálni kell.

5. függelék

A talaj maximális WHC értékének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének (WHC) meghatározására az alábbi módszer találták megfelelőnek. A módszert az ISO DIS 11268-2 C. melléklete (Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra kifejtett hatások meghatározása) írja le.

Alkalmas mintavevő eszköz (csigás cső stb.) használatával gyűjtünk össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati talajt. Fedjük le a cső alját egy darab nedves szűrőpapírral és helyezük egy vízfürdőben elhelyezett keretre. A csövet fokozatosan kell a vízbe meríteni, amíg a víz szintje a talaj szintje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet körülbelül három órán át a vízben kell hagyni. Mivel a talaj kapillárisai nem tudják az összes felszívott vizet megtartani, hagyni kell, hogy a talajminta lecsöpögjön, mégpedig úgy, hogy a csövet egy lefedett edényben (mellyel a kiszáradást előzzük meg) két órára finomra őrölt, nagyon nedves kvarchomok-ágyra tesszük. A mintát ezután 105 ° C-on tömegállandóságig szárítjuk és mérjük. A víztartó képességet (WHC) a következő módon kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% -ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített talaj + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (a cső tömege + a szűrőpapír tömege)

D = a talaj száraz tömege

*6. függelék***A talaj pH-értékének meghatározása**

A talaj pH-értékének meghatározására szolgáló alábbi módszer az ISO DIS 10390: Talajminőség. A pH meghatározása című szabványban szereplő leírás alapján.

Meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten legalább 12 órán át szárítunk. Ezután legalább 5 gramm talajt tartalmazó, a talaj térfogatának ötszörösére hígított talajszuszpenziót készítünk 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid (CaCl₂) oldattal. A szuszpenziót ezután öt percig alaposan összerázzuk, majd legalább 2, de legfeljebb 24 órán keresztül ülepedni hagyjuk. Ezután a folyékony fázis pH-ját megmérjük egy pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálunk.

C.40. ÁRVASZÚNYOGOK ÉLETCIKLUSÁRA HATÓ TOXICITÁS VIZSGÁLATA ÜLEDÉK-VÍZ RENDSZERBEN, SZENNYEZETT VÍZ VAGY SZENNYEZETT ÜLEDÉK HASZNÁLATÁVAL

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 233. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vizsgálat célja a vegyi anyagoknak való élethosszig tartó expozíció hatásának felmérése a *Chironomus* fajokba tartozó édesvízi kétszárnyúak esetében, teljesen lefedve az 1. generációt (P generáció) és a 2. generáció (F1 generáció) korai életszakaszát. A vizsgálat a meglévő C.28 (1) vagy C.27 (15) vizsgálati módszert szennyezett vízre, illetve szennyezett üledékre alapuló expozíciós forgatókönyvvel bővíti. A vizsgálat figyelembe veszi a *Chironomus riparius* és a *Chironomus dilutus* (korábbi nevén *C. tentans* (2)) fajokkal végzett meglévő toxicitási vizsgálati protokollokat, amelyeket Európában és Észak-Amerikában dolgoztak ki (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), majd ezt követően körvizsgálatok keretében ellenőriztek (1) (7) (10) (11) (12). Egyéb olyan árvaszúnyog fajok is használhatók, amelyekről a szakirodalomban megfelelő mennyiségű információ áll rendelkezésre, így például a *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Az expozíció teljes időtartama kb. 44 nap a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében, és kb. 100 nap a *C. dilutus* esetében.
2. A vizsgálati módszer leírja mind a víz-, mind az üledékexpozíciós forgatókönyvvel végzett vizsgálatokat. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat rendeltetési céljától függ. A vízben való expozíción alapuló forgatókönyv, amelyben a vízszlopot szennyezzük, a növényvédő szerek permetezéssel történő vízbe jutását hivatott szimulálni, és a felszíni vizekben mérhető kezdeti csúcskoncentrációkra terjed ki. A víz szennyezése egyéb típusú expozíciók vizsgálata esetén is hasznos (beleértve a vegyi anyagok kiömlését), de nem alkalmas az üledékben történő felhalmozódási folyamatok vizsgálatára, amelyek a vizsgálat időtartamánál hosszabb ideig tartanak. Ehhez, és olyan esetek vizsgálatakor, amikor a növényvédő szerek fő belépési útvonala a vizekbe a bemosódás, a szennyezett üledéket alkalmazó forgatókönyv megfelelőbb lehet. Ha egyéb expozíciós forgatókönyvek vizsgálata a cél, a vizsgálati terv könnyen adaptálható. Például ha nem fontos a vizsgált vegyi anyag eloszlása a vizes fázis és az üledékréteg között, illetve az üledékhez történő adszorpciót minimalizálni kell, számításba lehet venni valamilyen helyettesítő mesterséges üledék (pl. kvarchomok) használatát.
3. Az olyan vegyi anyagok, amelyek az üledékben élő organizmusok vizsgálatát teszik szükségessé, hosszú időn keresztül megmaradhatnak az üledékben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága, illetve az az időtartam, amely alatt az egyes expozíciós útvonalak képesek a teljes toxikus hatáshoz hozzájárulni, a vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő vegyi anyagok esetében fontos expozíciós útvonala lehet a szennyezett táplálék felvétele. Annak érdekében, hogy elkerüljük az erősen lipofil vegyi anyagok toxicitásának alulbecslését, megfontolandó, hogy a vizsgált vegyi anyaggal való szennyezést megelőzően táplálékot keverjünk az üledékbe (lásd a 31. pontot). Így minden expozíciós útvonalat és minden életszakaszt be lehet vonni a vizsgálatba.
4. A mért végpontok a következők: a kifejlett felnőtt egyedek száma (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), a fejlődési sebesség (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), az ivararány a teljes mértékben kifejlett és élő felnőtt egyedek körében (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), a petecsomók száma nőstényenként (csak az 1. generáció esetében) és a petecsomók termékenysége (csak az 1. generáció esetében).
5. Kifejezetten ajánlott a formulázott üledék használata. A formulázott üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékekkel szemben:
 - a kísérlet variabilitása kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható »szabványosított közeget« biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledéket keresni;
 - a vizsgálatot bármikor el lehet kezdeni anélkül, hogy szezonális eltéréseket tapasztalnánk a vizsgálati üledékben, és nincs szükség az üledék előkezelésére sem az üledékben természetes módon eleve előforduló fauna eltávolításához;
 - a rutinvizsgálathoz szükséges mennyiség helyszíni gyűjtéséhez viszonyítva a költségek alacsonyabbak;
 - a formulázott üledék lehetővé teszi a különböző vizsgálatokban megfigyelt toxicitás összehasonlítását és a vegyi anyagok ennek megfelelő rangsorolását (3).
6. A leírásban használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési stádiumban lévő árvaszúnyoglárvaakat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak egy üledék-víz rendszerben. A vizsgálatot az első fejlődési stádiumban lévő lárvák (1. generáció) szennyezett üledéket tartalmazó vizsgálati főzőpoharakba helyezésével kezdjük, vagy alternatív megoldásként a vizet szennyezzük a vizsgált vegyi anyaggal, miután a lárvákat a főzőpohárba tettük. Értékeljük az árvaszúnyogok kikelését, a kikelésig eltelt időt, valamint az ivarok arányát a kifejlett és életben lévő szúnyogok között. A kikelt felnőtt egyedeket a rajzás, párzás és peterakás megkönnyítése érdekében tenyésztőketrecekbe helyezük át. Értékeljük a lerakott petecsomók számát és termékenységet. Ezekből a petecsomókból nyerjük a 2. generáció első fejlődési stádiumban lévő lárváit. A lárvák frissen előkészített vizsgálati főzőpoharakba kerülnek (a szennyezési eljárás megegyezik az 1. generációnál alkalmazottal), hogy a kikelés, a kikelésig eltelt idő, valamint a kifejlett és életben lévő szúnyogok ivararányának felmérése segítségével meghatározzuk a 2. generáció életképességét (az életciklus-vizsgálat vázlatos bemutatása az 5. függelékben található). Az adatokat regressziós modellel elemezzük a vonatkozó végpontot X %-kal csökkentő koncentráció becsüléséhez, vagy hipotézisvizsgálatot végzünk az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) megállapítása céljából. Utóbbi esetben szükség van a kezelésre adott válaszok és a megfelelő kontrollválaszok statisztikai próbákkal történő összehasonlítására is. Megjegyzendő, hogy a szennyezett vizes forgatókönyvben gyorsan lebomló vegyi anyagok esetén az egyes generációk későbbi életszakaszai (pl. báb fázis) során az állatok lényegesen alacsonyabb koncentrációsintnek lehetnek kitéve a fedővízben, mint az első fejlődési stádiumban lévő lárvák. Ha ez problémát jelent, mivel hasonló expozíciós szintre van szükség minden életszakaszban, a vizsgálati módszer az alábbiak szerint módosítható:

- párhuzamos vizsgálat sorozat végzése különböző életszakaszokban történő szennyezéssel, vagy
- a vizsgálati rendszer ismételt szennyezése (vagy a fedővíz cseréje) mindkét vizsgálati fázisban (1. és 2. generáció), amelyhez a szennyezési (megújítási) időközöket a vizsgált vegyi anyag lebomlási jellemzőihez igazítjuk.

Ezek a módosítások csak a szennyezett vizes forgatókönyvben alkalmazhatók, a szennyezett üledékes forgatókönyvben nem.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált vegyi anyag vízdoldékonyságát, gőznyomását és $\log K_{ow}$ -értékét, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint a stabilitását vízben és üledékben. Rendelkezésre kell állnia egy megbízható analitikai módszernek a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált vegyi anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. A vizsgált vegyi anyag kémiai sorsára (pl. szétterjedés, abiotikus és biotikus lebomlás, stb.) vonatkozó információk is hasznosak. A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (16) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. Rendszeres időközönként referencia-vegyianyagokat is lehet vizsgálni annak ellenőrzésére, hogy a laboratóriumi populáció érzékenysége nem változott. A vízibolhákhoz hasonlóan elegendő lehet egy 48 órás akut vizsgálatot végezni (a 17. pontban hivatkozott szakirodalom szerint). Addig azonban, amíg nem áll rendelkezésre validált akut vizsgálati iránymutatás, az e melléklet C.28 fejezete szerinti krónikus vizsgálatot lehet megfontolni. A körvizsgálatokban és a validációs vizsgálatokban sikeresen alkalmazott referencia-mérgezőanyagok közé tartozik például a lindán, a trifluralin, a fenol, a kadmium-klorid és a kálium-klorid. (1) (3) (6) (7) (18).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYSÉGE

10. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:
- a kontrollkezelésben az átlagos kikelési arálynak az expozíciós idő végén legalább 70 %-nak kell lennie mindkét generációban (1) (7);
 - a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében a kontrollkezelésben kikelt összes felnőtt szúnyog 85 %-ának mindkét generációban 12–23 nappal az első fejlődési stádiumban lévő lárvák edényekbe helyezése után kell megjelennie; a *C. dilutus* esetében a 20–65 napos időtartam fogadható el;

- a kontrollkezelésben az ivarok átlagos arányának a kifejelett, élő felnőtt egyedek körében (nőstény vagy hím frakcióként) mindkét generációban legalább 0,4-nek kell lennie, de nem haladhatja meg a 0,6-et;
- az 1. generáció kontrolljaiban a petecsomók tenyésztőketrecenkénti számának a tenyésztőketrecbe helyezett nőstények számára vetítve legalább 0,6-nek kell lennie;
- az 1. generáció kontrolljaiban a termékeny petecsomók arányának minden tenyésztőketrecben legalább 0,6-nek kell lennie;
- az expozíciós idő végén mindkét generáció esetében meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját az összes edényben. Az oxigénkoncentrációnak minden vizsgálati edényben el kell érnie a levegőteltettségi érték (ASV ⁽¹⁾) 60 %-át, a fedővíz pH-jának pedig 6 és 9 között kell lennie;
- a víz hőmérséklete legfeljebb $\pm 1,0$ °C-kal változhat.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és tenyésztőketrecek

11. A lárvák expozíciójához 600 ml űrtartalmú és kb. 8,5 cm átmérőjű üveg főzőpoharakat használunk (lásd az 5. függelékét). Amennyiben biztosított az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm² nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya kb. 1:4 legyen. A tetején és minimum az egyik oldalán gézzel (lyukbőség: körülbelül 1 mm) lefedett tenyésztőketrecek (mindhárom irányban legalább 30 cm) kell használni (lásd az 5. függelékét). A peterakás céljára minden ketrecbe vizsgálati vizet és üledéket tartalmazó, 2 l űrtartalmú kristályosító csészét helyezünk. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya a kristályosító csésze esetében is kb. 1:4 legyen. A petecsomók a kristályosító csészéből történő begyűjtés után egy 12-lyukú mikrotiterlemezre kerülnek (lyukanként egy szalag; minden lyuk legalább 2,5 ml vizet tartalmaz a szennyezett kristályosító edényből), majd a lemezeket egy fedővel lefedjük, hogy megakadályozzuk a jelentős mértékű párolgást. A petecsomók tartására egyéb alkalmas edények is használhatók. A mikrotiterlemezekon kívül minden vizsgálati tartálynak és a vizsgált rendszerrel érintkezésbe kerülő egyéb berendezésnek teljes mértékben üvegből vagy más, kémiaiilag semleges anyagból kell készülniük (pl. politetrafluor-etilénből).

A faj kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal kell végezni. A *C. yoshimatsui* faj is használható. A *C. dilutus* is megfelelő, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. A *C. riparius* tenyésztésének módját a 2. függelék ismerteti részletesen. A tenyésztési körülményekre vonatkozó információ a *C. dilutus* (5) és a *C. yoshimatsui* (14) tekintetében is rendelkezésre áll. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg formulázott üledéket (más néven kevert, mesterséges vagy szintetikus üledéket) kell használni. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szecseméret-eloszlás vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyeződéstől, valamint az árszűnyog-lárvákkal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az üledéket a vizsgálat előtt ajánlott hét napig vizsgálati körülmények között kondicionálni. A következő – az (1) szakirodalmi hivatkozásban leírt – formulázott üledék használata ajánlott (1) (20) (21):
 - a. 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg: a lehető legközelebb a pH = 5,5–6,0 értékhez; a tőzeget finomra őrölt por formájában kell használni (részecskeméret ≤ 1 mm), és csak levegőn szárított tőzeg használható;
 - b. 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinitartalommal);

⁽¹⁾ 20 °C-on és normál légköri nyomáson az édesvíz ASV-értéke 9,1 mg/l (a 60 % 5,46 mg/l értéknek felel meg)

- c. 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomórészt finom homok, amely részecskéinek több mint 50 %-a 50 és 200 µm közötti szemcsemérettel rendelkezik);
- d. Annyi ioncserélt víz, amennyi ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30–50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk;
- e. A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának $7,0 \pm 0,5$ értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát (CaCO_3);
- f. A végtermékként kapott keveréknek 2 % ($\pm 0,5$ %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával kell beállítani.
14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben előfordulnak-e kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek). A 3. függelék példával szemlélteti a formulázott üledék elkészítését. A száraz összetevők összekeverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és vizsgálati vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függelék) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árszűnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, összes keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg CaCO_3/l értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált vegyi anyag között kölcsönhatás alakul ki (ezért ebben az esetben az Elandt-féle M4 közeg nem alkalmazható). Ugyanazt a víztípust kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer meg kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok: szennyezett víz

16. a. A vizsgálathoz használt koncentrációk kiszámítása a vízoszlopban – azaz az üledék feletti vízrétegben – mérhető koncentrációk alapján történik. A kiválasztott koncentrációk vizsgálathoz használt oldatait általában egy törzsoldat hígításával készítjük el. A törzsoldatokat lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgálathoz használt vízben való feloldásával kell elkészíteni. Egyes esetekben oldószer vagy diszpergálószer használatára lehet szükség a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószeres példák a következők: aceton, etilén-glikol-monoetiléter, etilén-glikol-dimetiléter, dimetilformamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószeresek: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz (0,01 %-os) és HCO-40. Az oldódást segítő szer csak minimális (azaz $\leq 0,1$ ml/l) koncentrációban lehet jelen a végtermékként kapott, vizsgálathoz használandó közegben, és minden kezeléshez ugyanazt a szert kell használni. Amennyiben oldódást segítő szert alkalmazunk, annak nem lehet jelentős hatása a túlélési arányra, amit egy negatív (vizes) kontrollal összehasonlított oldószeres kontrollal lehet igazolni. Az ilyen anyagok használatát azonban lehetőség szerint kerülni kell.

Törzsoldatok: szennyezett üledék

16. b. A kiválasztott koncentrációjú szennyezett üledéket általában úgy készítjük el, hogy a vizsgált vegyi anyag oldatát közvetlenül az üledékhez adjuk. A vizsgált vegyi anyag ioncserélt vízben oldott törzsoldatát hengerszék vagy tápkeverő segítségével, vagy pedig kézzel keverjük el a mesterséges üledékkel. Ha a vizsgált vegyi anyag rosszul oldódik vízben, akkor a lehető legkisebb mennyiségű, célnak megfelelő szerves oldószerben (például hexán, aceton vagy kloroform) lehet feloldani. Ezt követően a kapott oldatot vizsgálati edényenként 10 g finom kvarchomokkal keverjük el. Az oldószert hagyjuk elpárologni, mivel azt teljes egészében el kell távolítani a homokból; a homokot ezután összekeverjük a megfelelő mennyiségű üledékkel. A vizsgált vegyi anyag oldódásának megkönnyítéséhez, diszpergálásához vagy emulgeálásához csak gyorsan

párolgó szer használható. Nem szabad elfelejteni, hogy az üledék elkészítése során a vizsgált vegyi anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell elkészíteni). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált vegyi anyag egyenletes eloszlását az üledékben. A homogenitás fokát szükség esetén részminták analizálásával kell meghatározni.

VIZSGÁLATI TERV

17. A vizsgálati terv a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkhoz használt edények számának, a lárvák edényenkénti számának, valamint a kristályosító csészék és tenyésztőketrecek számának megválasztását jelenti. Az EC_x és NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálat tervét az alábbiakban ismertetjük.

A regresszióanalízis megtervezése

18. A vizsgálatnak le kell fednie a hatáskoncentrációt (EC_x) és azt a koncentrációtartományt, amelyben a vizsgált vegyi anyag hatása releváns, hogy a végpontot ne kelljen a keletkezett adatok határain kívül extrapolálni. El kell kerülni a jóval a legalsó koncentráció alatti vagy a jóval a legmagasabb koncentráció feletti extrapolációt. A C.27. vagy C.28. vizsgálati módszer szerinti előzetes dózisbehatóró vizsgálat hasznos segítséget nyújthat a megfelelő vizsgálati koncentrációtartomány kiválasztásában.
19. Az EC_x értékének pontosításához legalább öt koncentráció és minden koncentráció esetében nyolc ismétlés szükséges. Minden koncentráció esetében két tenyésztőketrecet kell használni (A és B). A nyolc ismétlést két négy ismétlésből álló csoportra kell osztani, amelyeket egy-egy tenyésztőketrechez kell rendelni. Az ismétlések egyesítésére azért van szükség, hogy elérhető legyen a megfelelő reprodukciós értékeléshez szükséges szunyogszám a ketrecekben. Ugyanakkor a 2. generációban ismét nyolc ismétlés lesz, amelyeket a tenyésztőketrecekben expozíciónak kitett populációból kell képezni. Minden soron következő koncentráció legfeljebb az előző kétszerese lehet (kivételet képeznek azok az esetek, amikor a dózisválasz görbéje lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám hatra csökkenthető (tenyésztőketrecenként három). Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk közötti intervallum szűkítése általában az EC_x konfidenciaintervallumának csökkenéséhez vezet.

A NOEC becslésének megtervezése

20. A NOEC értékének pontosításához öt vizsgálati koncentrációt kell használni legalább nyolc ismétlésben (4 mindkét [A és B] tenyésztőketrecben), és a koncentrációk aránya nem lehet kettőnél nagyobb. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megfelelő erejű statisztikai próbát biztosítson a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbség 5 %-os szignifikanciaszint ($\alpha = 0,05$) melletti kimutatásához. A fejlődés üteme, a fekunditás és a termékenység esetében általában megfelelő módszer a varianciaanalízis (ANOVA), amelyet Dunnett-féle próbának vagy Williams-féle próbának kell követnie (22–25). A kikelési arány és az ivararány esetében a Cochran–Armitage-féle próba, a Fisher-féle egzakt próba (Bonferroni-korrekcióval) vagy a Mantel–Haentzál-próba lehet alkalmas módszer.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálat (egy vizsgálati koncentráció és kontroll(ok)) végezhető akkor, ha az opcionális előzetes dózisbehatóró vizsgálat során a maximum koncentrációig nem tapasztalunk hatást. A határérték-vizsgálat célja annak jelzése, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgált határérték-koncentrációnál magasabb szinteken fejt-e ki toxikus hatást. Víz esetében 100 mg/l, üledék esetében 1 000 mg/kg (száraz tömeg) használata javasolt. Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább nyolc ismétlés szükséges. Bizonyítani kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbség 5 %-os szignifikanciaszint ($\alpha = 0,05$) mellett statisztikai próbával megfelelő valószínűséggel kimutatható. A metrikus válaszok (pl. fejlődési ütem) esetében a t-próba alkalmas statisztikai módszer, amennyiben az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon–Mann–Whitney-próba alkalmazható. A kikelési arány esetében a Fisher-féle egzakt próba a megfelelő.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények*A víz-üledék rendszer elkészítése (szennyezett víz)*

22. a. Formulázott üledéket (lásd a 13. és 14. pontot, valamint a 3. függelék) helyezünk minden vizsgálati edénybe, illetve kristályosító csészébe, hogy legalább 1,5 cm-es (a kristályosító csésze esetében ez valamivel alacsonyabb is lehet), de maximum 3 cm-es réteget kapjunk. A rendszerhez annyi vizet (lásd a 15. pontot) adunk, hogy az üledékréteg mélységének és a víz mélységének aránya nem haladja meg az 1:4 értéket. A vizsgálati edény előkészítése után az üledék-víz rendszert az első fejlődési stádiumban lévő 1. vagy 2. generációs lárvák hozzáadása előtt kb. hét napig enyhén levegőztetni kell (lásd a 14. pontot és a 3. függelék). A kristályosító csésze üledék-víz rendszerét a vizsgálat során nem levegőztetjük, mivel annak nem kell elősegítenie a lárvák túlélését (a petecsomókat már a peték kikelése előtt összegyűjtjük). Az üledéket a vizsgálatához használt víz ráöntése közben letakarhatjuk egy műanyag lappal, hogy a víz hozzáadása során az üledék ne essen szét összetevőire és a vízrétegben ne kavardjon fel a finom anyag. A lemezt ezután rögtön eltávolítjuk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

A víz-üledék rendszer elkészítése (szennyezett üledék)

22. b. A 16b. pont szerint előállított szennyezett üledékek az edényekbe, illetve a kristályosító csészébe kerülnek, és annyi fedővizet adunk hozzá, hogy az üledék-víz térfogatarány 1:4 legyen. Az üledékréteg mélységének 1,5 és 3 cm között kell lennie (a kristályosító csésze esetében valamivel alacsonyabb is lehet). Az üledéket a vizsgálatához használt víz ráöntése közben letakarhatjuk egy műanyag lappal, hogy a víz hozzáadása során az üledék ne essen szét összetevőire és a vízrétegben ne kavardjon fel a finom anyag. A lemezt ezután rögtön eltávolítjuk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag az üledékből a vízfázisba kerüljön, és abban eloszoljon (4) (5) (7) (18). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A kiegyensúlyozódási idő üledék- és vegyianyag-specifikus, tartama órától napokig terjedhet, de ritka esetekben öt hetet is igénybe vehet. Mivel ez alatt az idő alatt számos vegyi anyag lebomolhat, az egyensúlyi állapot beállításának megvárása helyett 48 órás kiegyensúlyozódási időszak alkalmazása ajánlott. Ha azonban a vegyi anyag üledékben való bomlási felezési ideje közismerten hosszú (lásd a 8. pontot), a kiegyensúlyozódási időt meg lehet hosszabbítani. E kiegyensúlyozódási idő elteltével meg kell mérni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a fedővízben, a pórúsvízben és az üledékben, legalább a vegyi anyag legnagyobb és egy alacsonyabb koncentrációja esetében (lásd a 38. pontot). Ezek a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömeggyensúly kiszámítását és az eredmények mért koncentrációk alapján történő kifejezését.
23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során elpárolgott vizet szükség esetén pótolni lehet. A sófelhalmazódás elkerülése érdekében desztillált vagy ioncserélt vizet kell használni. A tenyésztőketrecekben található kristályosító csészék nincsenek lefedve, és nem szükséges (de lehet) pótolni bennük a vizsgálati időszak alatt bekövetkezett vízvesztésért, mivel a petecsomók mindössze körülbelül egy napig érintkeznek a vízzel, és a csészéket a vizsgálatnak csak egy rövid szakaszában használjuk.

A vizsgálatához használt organizmusok hozzáadása

24. A petecsomókat négy-öt nappal az első fejlődési stádiumban lévő 1. generációs lárvák hozzáadása előtt ki kell venni a tenyésztőből, és kis edényekben előkészített tenyésztőközegbe kell helyezni. A törzstenyésztőből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Minden esetben kis mennyiségű táplálékot (például finomra őrölt pelyhesített haleledel leszűrt szuszpenziójának néhány cseppjét) kell hozzáadni a tenyésztőközeghez (lásd a 2. függelék). Csak a frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák rendszerint a peterakást követő egy-két napon belül kezdenek kikelni (a *C. riparius* esetében 20 °C-on 2–3 napon belül, míg a *C. dilutus* esetében 23 °C-on, illetve a *C. yoshimatsui* esetében 25 °C-on 1–4 napon belül), és fejlődésük négy lárvastádiumban következik be, amelyek mindegyike 4–8 nap időtartamú. A vizsgálatban első fejlődési stádiumban lévő (a kikelés utáni maximum 48 óras korú) lárvákat kell használni. Az első fejlődési stádiumban lévő lárvákat a fejkapszula szélessége alapján lehet azonosítani (7).

25. Tompa pipettával 20-20 darab első stádiumban lévő 1. generációs lárvát helyezünk el véletlenszerűen az üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edényekbe. A víz levegőztetését a lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása közben szüneteltetjük, és nem is indítjuk újra az ezt követő 24 órában (lásd a 32. pontot). Az alkalmazott vizsgálati tervtől függően (lásd a 19. és 20. pontot) a koncentrációnként felhasznált lárvák száma legalább 120 (koncentrációnként 6 ismétlés) az EC_x értékének pontosítása esetében és 160 (koncentrációnként 8 ismétlés) a NOEC értékének pontosítása esetében. A szennyezett üledékes forgatókönyvben az expozíció a lárvák hozzáadásával kezdődik.

A fedővíz szennyezése

26. Az üledéket fedő vízoszlopot az 1. generációs első stádiumú lárvák hozzáadását követő huszonnégy óra múlva beszenyezzük a vizsgált vegyi anyaggal, majd ismét enyhe levegőztetést biztosítunk (a vizsgálati terv esetleges módosításával kapcsolatban lásd a 7. pontot). A vizsgált vegyi anyag törzsoldatából pipettával kis mennyiségeket juttatunk a vízfelszín alá. Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavardjon fel. A szennyezett vizes vizsgálati tervben az expozíció a víz szennyezésével kezdődik (azaz egy nappal a lárvák hozzáadása után).

A kikelt, kifejtett példányok összegyűjtése

27. A kikelt 1. generációs szúnyogokat a vizsgálati edényekből naponta legalább egyszer, de inkább kétszer gyűjtjük össze (lásd a 36. pontot) aspirátorral, szippantóval vagy hasonló eszközzel (lásd az 5. függelék). Különös gondot kell fordítani arra, hogy a felnőtt egyedek ne sérüljenek meg. Az egy kezeléshez tartozó négy vizsgálati edényből összegyűjtött szúnyogok abba a tenyésztőketrebe kerülnek, amelyhez korábban hozzárendeltük őket. Az első (hím) egyed kikelésének napján a kristályosító csészéket beszenyezzük a vizsgált vegyi anyag kis mennyiségű törzsoldatával, amelyet pipettával a vízfelszín alá juttatunk (szennyezett vizes vizsgálati terv). Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavardjon fel. A vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kristályosító csészében névlegesen megegyezik az adott tenyésztőketrechez rendelt kezelési edényekben lévő koncentrációval. A szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében a kristályosító csészéket körülbelül 11 nappal az expozíció kezdete (azaz az 1. generációs lárvák hozzáadása) után készítjük el, hogy körülbelül 48 óra kiegyensúlyozódási idő telhessen el az első petecsomók lerakása előtt.
28. A petecsomókat csipesszel vagy tompa pipettával gyűjtjük be a tenyésztőketreben lévő kristályosító csészéből. A petecsomókat egy olyan edénybe helyezjük, amely abból a kristályosító csészéből származó tenyésztőközeget tartalmaz, amelyikből az adott petecsomót gyűjtöttük (pl. egy lyuk a 12-lyukú mikrotiterlemezen legalább 2,5 ml közeggel). A petecsomókat tartalmazó edényt lefedjük, hogy megakadályozzuk a jelentős mértékű párolgást. A petecsomókat a lerakásuk után legalább hat napig megfigyelés alatt tartjuk annak megállapítására, hogy termékenynek vagy terméketlennek minősülnek-e.

A 2. generációhoz legalább három, de lehetőleg hat termékeny petecsomót választunk ki az egyes tenyésztőketrekekből, és bizonyos mennyiségű táplálékot biztosítva hagyjuk őket kikelni. Ezeknek a petecsomóknak a peterakás csúcán lerakott petecsomók közül kell származniuk, amely a kontrollok esetében rendszerint körülbelül a vizsgálat 19. napjára esik. Ideális esetben ugyanazon a napon kezdjük az összes kezelés 2. generációjának vizsgálatát, de a lárvák fejlődésére gyakorolt – a vegyi anyaggal összefüggő – hatások miatt ez nem mindig lehetséges. Ilyen esetben a magasabb koncentrációkkal való vizsgálat később kezdhető, mint az alacsonyabb koncentrációjú kezelések és a (oldószeres) kontroll.

29. a. A szennyezett vizes vizsgálati terv esetében a 2. generáció üledék-víz rendszere úgy készül, hogy a fedővizet az első stádiumú lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása előtt kb. 1 órával szennyezzük be a vizsgált vegyi anyaggal. Pipettával kis mennyiségeket juttatunk a vizsgált vegyi anyag oldatából a vízfelszín alá. Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavardjon fel. A szennyezést követően enyhe levegőztetést biztosítunk.
29. b. A szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében a 2. generáció üledék-víz rendszerét befogadó expozíciós edényeket az 1. generációval megegyező módon készítjük el.
30. Tompa pipettával 20–20 darab első stádiumban lévő (a kikelés utáni maximum 48 órás korú) 2. generációs lárvát helyezünk el véletlenszerűen a szennyezett üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edényekbe. A víz

levegőztetését a lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása közben szüneteltetjük, és nem is indítjuk újra az ezt követő 24 órában. Az alkalmazott vizsgálati tervtől függően (lásd a 19. és 20. pontot) a koncentrációnként felhasznált lárvák száma legalább 120 (koncentrációnként 6 ismétlés) az EC_x értékének pontosítása esetében és 160 (koncentrációnként 8 ismétlés) a NOEC értékének pontosítása esetében.

Táplálék

31. A vizsgálati edényekben a lárvákat lehetőleg naponta vagy legalább hetente háromszor meg kell etetni. Napi 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg a *C. yoshimatsui* esetében) haleledel (vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, pl. Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben) lárvánként megfelelő mennyiségű táplálék a fiatal lárvák számára fejlődésük első 10 napjában. Valamivel több táplálékra lehet szükség az idősebb lárvák esetében: lárvánként napi 0,5–1,0 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie a vizsgálat hátralévő részében. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontroll edényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni.

A lenyeléssel történő expozíció toxikológiai jelentősége általában nagyobb a szerves szénnel nagy affinitást mutató vegyi anyagok és az üledékhez kovalensen kötődő vegyi anyagok esetében. Ezért az ilyen tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatakor a lárvák túléléséhez és természetes növekedéséhez szükséges táplálék mennyiség – a szabályozási követelménytől függően – a stabilizációs időszak előtt is hozzáadható a formulázott üledékhez. A vízminőség romlásának megelőzése érdekében haleledel helyett növényi anyagot kell használni, például 0,5 % (száraz tömeg) finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*) vagy paraj- (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl*-t vagy alfa-cellulózt). A teljes organikus forrásból származó táplálékadag szennyezés előtti hozzáadása az üledékhez – a vízminőséget és a biológiai teljesítőképességet tekintve véve – nem triviális eljárás (21) és nem is szabványosított módszer, de a legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy működik (19) (26). A tenyésztőketrechen elhelyezett felnőtt szünyogoknak alapesetben nincs szükségük táplálékra, de a fertilitás és a termékenység növekszik, ha a kikelt felnőtt egyedeknek telített szacharóz oldatba áztatott vattát biztosítunk táplálékforrásként (34).

Inkubációs körülmények

32. A vizsgálati edényekben 24 órával mindkét generáció első stádiumú lárváinak hozzáadása után biztosítjuk a fedővíz enyhe levegőztetését, és a levegőztetést a vizsgálat végéig folytatjuk (ügyelni kell arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne essen az ASV 60 %-a alá). A levegőztetést üveg Pasteur-pipettával oldjuk meg, amelynek kimenetét 2–3 cm-rel az üledékréteg felett rögzítjük, és amely néhány buborékot bocsát ki másodpercenként. Illékony vegyi anyagok vizsgálatakor meg kell fontolni az üledék-víz rendszer levegőztetésének elhagyását, ugyanakkor azonban teljesítsük az ASV minimum 60 %-ára vonatkozó érvényességi kritériumot (10. pont). További útmutatás a (16) szakirodalomban olvasható.
33. A *C. riparius* vizsgálatát 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérsékleten kell végezni. *C. dilutus* használata esetén az ajánlott hőmérséklet 23 °C, *C. yoshimatsui* esetén pedig 25 °C (± 2 °C). 16 órás megvilágítási időszakot alkalmazunk, 500–1 000 lux fényerővel. A tenyésztőketrecek esetében egyórás hajnali és alkonyati fázist is be lehet iktatni.

Expozíciós időtartam

34. Szennyezett vizes vizsgálati terv: Az 1. generáció expozíciós időszaka akkor kezdődik, amikor a vizsgálati edényekben lévő fedővizet beszennyezzük a vizsgált vegyi anyaggal (ami egy nappal a lárvák elhelyezése után történik – az expozíciós terv esetleges módosításával kapcsolatban lásd a 7. pontot). A 2. lárvageneráció expozíciója azonnal elkezdődik, mivel ezeket olyan üledék-víz rendszerbe helyezjük, amelyet korábban már beszennyeztünk. A *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében az 1. generáció maximális expozíciós időtartama 27 nap, a 2. generációé 28 nap (az 1. generációs lárvák egy napot expozíció nélkül töltenek az edényekben). Az átfedést is figyelembe véve a vizsgálat teljes időtartama kb. 44 nap. A *C. dilutus* esetében az expozíció maximális időtartama az 1. és a 2. generáció esetében 64, illetve 65 nap. A vizsgálat teljes időtartama körülbelül 100 nap.

Szennyezett üledékes vizsgálati terv: az expozíció a lárvák hozzáadásával kezdődik, és az időtartama maximum 28 nap a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* mindkét generációja esetében, illetve legfeljebb 65 nap a *C. dilutus* mindkét generációja esetében.

Megfigyelések

Kikelés

35. Mindkét generáció esetében meghatározzuk a fejlődési időt és a kifejlett, élő hím és nőtény szúnyogok teljes számát. A hímek könnyen azonosíthatók tollas antennájuk és vékony testalkatuk alapján.
36. A vizsgálati edényeket mindkét generáció esetében legalább hetente háromszor meg kell figyelni a lárvák kontrollal összehasonlítva mutatott abnormális viselkedésének (pl. üledék elhagyása, szokatlan úszómozgás) szemrevételezéses ellenőrzése céljából. A kikelési időszak alatt – amely kb. 12 nappal a *C. riparius* és *C. yoshimatsui* (illetve 20 nappal a *C. dilutus*) lárvák edénybe helyezése után kezdődik – a kikelt szúnyogokat naponta legalább egyszer, de inkább kétszer (kora reggel és késő délután) megszámláljuk, és megállapítjuk az ivarukat. Azonosítás után az 1. generációba tartozó szúnyogokat óvatosan eltávolítjuk az edényekből, és áthelyezzük egy tenyésztőketrecbe. A 2. generációs szúnyogokat azonosítás után eltávolítjuk és elpusztítjuk. A vizsgálati edényekben lerakott 1. generációs petecsomókat külön-külön kell összegyűjteni, és legalább 2,5 ml eredeti közegükből származó vízzel együtt 12-lyukú mikrotiterlemezre (vagy más alkalmas edénybe) kell áthelyezni, amelyet a jelentős mértékű párolgás megelőzése érdekében fedéllel kell lefedni. Az elhullott lárvák és a látható, ki nem kelt bábok számát is fel kell jegyezni. A tenyésztőketrec, a vizsgálati edény és a szippantó szemléltetése az 5. függelékben található.

Szaporodás

37. A szaporodásra kifejlett hatást az 1. generációs szúnyogok által lerakott petecsomók száma és termékenysége alapján értékeljük. A petecsomókat naponta egyszer gyűjtjük össze az egyes tenyésztőtartályokba helyezett kristályosító csészékből. A petecsomókat legalább 2,5 ml eredeti közegükből származó vízzel együtt kell begyűjteni és áthelyezni egy 12-lyukú mikrotiterlemezre (egy petecsomót minden lyukba) vagy más alkalmas edénybe, amelyet a jelentős mértékű párolgás megelőzése érdekében fedéllel kell lefedni. Az egyes petecsomók esetében az alábbi jellemzőket dokumentáljuk: a lerakás napja, méret (normál, azaz $1,0 \pm 0,3$ cm vagy kisebb; jellemzően $\leq 0,5$ cm), szerkezet (normál, azaz banán alakú, spirális petelánccal vagy abnormális, pl. nem spirális petelánc) és termékenység (termékeny vagy terméketlen). A lerakást követő hat nap során értékeljük a petecsomó termékenységét. A petecsomót termékenynek tekintjük, ha a peték legalább egyharmada kikel. A nőtényenként lerakott petecsomók és a nőtényenkénti termékeny petecsomók számának kiszámításához a tenyésztőketrechez adott összes nőtény számát használjuk. A petecsomóban lévő peték számát szükség esetén roncsolásmentesen is meg lehet becsülni a gyűrűszámálási módszer segítségével (részletek a 32. és 33. pontban).

Analitikai mérések

A vizsgált vegyi anyag koncentrációja

38. A fedővíz, a pórúsvíz és az üledék legnagyobb és egy kisebb koncentrációnál vett mintáit legalább az expozíció kezdetén (szennyezett víz esetében lehetőleg egy órával a szennyezést követően) és végén analizáljuk. Ezt mindkét generáció edényei esetében el kell végezni. A tenyésztőketrecekben lévő kristályosító csészékből csak a fedővizet elemezzük, mivel a petecsomók ezzel kerülnek érintkezésbe (a szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében meg lehet fontolni az üledék-koncentráció analitikus módszerrel való megerősítését). Ha szükségesnek ítéljük, a vizsgálat alatt további méréseket lehet végezni az üledékkel, a pórúsvízzel vagy a fedővízzel. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározása tájékoztatást nyújt a vizsgált vegyi anyag viselkedéséről/megoszlásáról a víz-üledék rendszerben. Az üledékből és a pórúsvízből a vizsgálat elején és a vizsgálat során vett mintákhoz (lásd a 39. pontot) az analitikai meghatározások elvégzéséhez további vizsgálati edényeket szükségesek. A szennyezett vizes vizsgálati terv esetében az üledékben nem szükséges méréseket végezni, ha a vizsgált anyag víz és üledék közötti megoszlását egy összehasonlítható feltételek mellett (pl. üledék-víz arány, szennyezés módja, az üledék szerves széntartalma) végzett víz-üledék vizsgálat során egyértelműen meghatároztuk, vagy ha a fedővízben mért koncentrációkról kimutattuk, hogy a névleges vagy mért kezdeti koncentrációk 80–120 %-án belül maradnak.
39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. és/vagy a 14. napon), és az analízishez olyan nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők be a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati tervre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálatához használt organizmusok jelenlétét is beleértve), de biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni.

40. A szemcseközi víz (= pórusvíz) elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g gyorsulással történő centrifugálás 4 °C-on, 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált vegyi anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a pórusvízben lévő koncentráció.

Fizikai és kémiai paraméterek

41. Megfelelő módon kell mérni a pH-t, az oldott oxigént a vizsgálati vízben, valamint a víz hőmérsékletét a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben (lásd a 10. pontot). A vízkeménységet és az ammóniát a vizsgálat elején és végén kell mérni a kontrollokban, valamint a legmagasabb koncentrációt tartalmazó egyik vizsgálati edényben és kristályosító csészében.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

42. Ennek az életciklus-vizsgálatnak a célja a vizsgált vegyi anyag szaporodásra és – két generáción át – a teljesen kikelt és élő hím és nőtény szűnyogok fejlődési ütemére és teljes számára kifejtett hatásának megállapítása. A kikelési arány esetében a hímek és nőtények adatait össze kell vonni. Ha nincs statisztikailag szignifikáns különbség a különböző ivarok fejlődési ütemének érzékenysége között, a hímek és nőtények eredményeit a statisztikai elemzéshez össze lehet vonni.
43. A fedővízben (szennyezett vizes vizsgálat) vagy az üledékben (szennyezett üledékes vizsgálat) lévő koncentrációban kifejezett hatáskonzentrációkat általában az expozíció elején mért koncentrációk alapján számítjuk ki (lásd a 38. pontot). Ezért a szennyezett vizes vizsgálati terv esetében minden kezelésnél átlagoljuk a mindkét generáció edényeinek fedővizében jellemzően az expozíció elején mért koncentrációkat, valamint a kristályosító csészékben mért koncentrációkat. A szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében minden kezelésnél átlagoljuk a mindkét generáció edényeiben (és esetleg a kristályosító csészékben) jellemzően az expozíció elején mért koncentrációkat.
44. Egy becslő pont – azaz az EC_x – kiszámításához az edényenkénti és a tenyésztőketrecenkénti statisztikákat lehet valódi ismétléseként használni. Bármely EC_x konfidenciaintervallumának kiszámítása során figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket azonban az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.
45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC meghatározása hipotézisvizsgálat segítségével, figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, amit az ANOVA módszerek használata garantál (pl. Williams- és Dunnett-féle próba). A Williams-féle próba megfelelő lehet, ha elméletben monoton dózisválasz várható, a Dunnett-féle próba pedig akkor lehet megfelelő, ha a monotonitási hipotézis nem állja meg a helyét. Alternatívaként ennél robusztusabb próbák (27) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek (31).

Kikelési arány

46. A kikelési arányok diszkrét adatok, amelyek a Cochran–Armitage-próbával elemezhetők lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózisválasz függvénye monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel–Haentzsal-próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran »extra-binomiális« variánciának neveznek), akkor a (27) szakirodalmi hivatkozásban javasolthoz hasonló robusztus Cochran–Armitage- vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni.

Meghatározzuk az edényenként kikelt élő szúnyogok (hímek plusz nőstények) összegét (n_e), és elosztjuk az edénybe helyezett lárvák (n_a) számával:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt élő árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = az edényekbe helyezett lárvák egy edényre jutó száma (általában 20)

Amikor n_e nagyobb, mint n_a (azaz, ha véletlenül több lárvát vittünk be a tervezett létszámnál), n_a -t egyenlővé kell tenni n_e -vel.

47. Leginkább nagy mintaméret esetén megfelelő alternatív megközelítés, olyan esetekben, amikor extra-binomiális variancia áll fenn, ha a kikelési arányt folytonos változóként kezeljük, és az ilyen ER-adatokkal összhangban álló eljárásokat alkalmazunk. A nagy mintát itt úgy kell értelmezni, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.
48. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az ER-értékeket először négyzetgyök arkusz-színusz vagy Tukey–Freeman-transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálhoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran–Armitage-, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel–Haentzsal-próbát lehet használni. A négyzetgyök arkusz-színusz transzformáció az ER négyzetgyökének az arkusz szinusztát (\sin^{-1}) adja.
49. A kelési arányok esetében az EC_x -értékeket regresszióanalízissel számítjuk ki (pl. probit, logit vagy Weibull-modell (28)). Ha a regresszióanalízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt lehet használni.

Fejlődési ütem

50. A fejlődési idő átlaga megmutatja a lárvák elhelyezése (a vizsgálat 0. napja) és a szúnyogok kísérleti csoportban való kikelése közötti időtartamot (a valós fejlődési idő kiszámításához a lárvák elhelyezés idején elért korát is figyelembe kell venni). A fejlődési ütem (egysége: 1/nap) a fejlődési idő reciproka, és a lárvafejlődésben egy nap alatt elért előrehaladást fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálhoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem nagyobb statisztikai erejű paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folytonos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x -értékek becslésére regresszióanalízist használunk (például (29) (30)). Az átlagos fejlődési ütem NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg. Mivel a hímek előbb kelnek ki, mint a nőstények, azaz nagyobb a fejlődési ütemük, az összes szúnyog fejlődési üteme mellett érdemes külön-külön is kiszámítani a két ivar fejlődési ütemét.
51. A statisztikai próbához feltételezzük, hogy az x . ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x . nap és az $x - 1$. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet (\bar{x}) a következő képlettel számítjuk ki:

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

ahol:

\bar{x} : az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i : az ellenőrzési intervallum indexe

m : az ellenőrzési intervallumok maximális száma

f_i : az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_i : a kikelt árvaszúnyogok összesített száma a kísérlet végén ($\sum f_i$)

x_i : az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

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

ahol:

nap_i : az ellenőrzési nap (a lárvák elhelyezése óta eltelt napok száma)

l_i : az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Ivarok aránya

52. Az ivarok aránya diszkrét adat, ezért a Fisher-féle egzakt próba vagy egyéb megfelelő módszerek segítségével értékeljük. Az ivarok természetes aránya a *C. riparius* esetében egy, azaz a hímek és nőstények egyenlő számban vannak jelen. A két generáció esetében az ivararányra vonatkozó adatokat ugyanolyan módon kell kezelni. Mivel a szúnyogok edényenkénti maximális száma (azaz 20) túl alacsony az érdemi statisztikai elemzéshez, az egy kezeléshez tartozó összes edényben lévő kifejlett, élő szúnyogok számát ivaronként összeadjuk. Ezeket a nem transzformált adatokat a (oldószeres) kontroll vagy az összevont kontrolladatokkal összehasonlítva vizsgáljuk egy 2×2 kontingenciátáblázatban.

Szaporodás

53. A szaporodást – a fekunditással megegyezően – az egy nőstényre jutó petecsomók számával számítjuk. Még pontosabban az adott tenyésztőketrecben lerakott petecsomók számát elosztjuk a ketrechez adott élő és sértetlen nőstények számával. A fekunditás NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg.
54. A petecsomók termékenységet az egy nőstényre jutó termékeny petecsomók számának meghatározására használjuk. Az adott tenyésztőketrecben lerakott termékeny petecsomók számát elosztjuk az adott ketreche bevitt élő és sértetlen nőstények számával. A termékenység NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg.

Vizsgálati jegyzőkönyv

55. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

- fizikai jelleg, valamint fizikai-kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, gőznyomás, $\log K_{ow}$, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben és üledékben, stb.);
- kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám stb.), beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásához használt analitikai módszert.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

- vizsgálati organizmusok: faj, tudományos név, az organizmusok beszerzési forrása és a tenyésztési körülmények;
- a petecsomók és lárvák kezelésére vonatkozó információk;

- az 1. generációs kikelt felnőtt egyedek szippantó segítségével történő kezelésére, stb. vonatkozó információk (lásd az 5. függelék);
- a vizsgálati organizmusok életkora az 1. és a 2. generáció vizsgálati edényben történő elhelyezés idején.

Vizsgálati feltételek:

- az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy formulázott (mesterséges) üledék;
- természetes üledék: az üledék mintavételi helye és leírása, beleértve, ha lehetséges, a szennyeződéssel kapcsolatos információkat; az üledék jellemzői: pH, szerves széntartalom, C/N arány, szemcseméret-eloszlás (adott esetben);
- formulázott üledék: elkészítés, összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvesség stb. a vizsgálat kezdetén mérve);
- a vizsgálatához használt víz elkészítése (mesterséges víz használata esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, keménység stb. a vizsgálat kezdetén mérve);
- az üledék és a fedővíz mélysége a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben;
- a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és anélkül a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben;
- vizsgálati edények (anyag és méret);
- kristályosító csészék (anyag és méret);
- tenyésztőketrecek (anyag és méret);
- a vizsgálati edényekbe és a kristályosító csészékbe kerülő törzsoldatok és vizsgálati koncentrációk elkészítésének módszere;
- a vizsgált vegyi anyag bevitele a vizsgálati edényekbe és a kristályosító csészékbe: vizsgálati koncentrációk, ismétlések száma és oldószerek, ha szükségesek;
- a vizsgálati edények inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő, levegőztetés (buborékszám másodpercenként);
- a tenyésztőketrecek és a kristályosító csészék inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő;
- a mikrotiterlemezre (vagy más edénybe) helyezett petecsomók inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő;
- a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

- névleges vizsgálati koncentrációk, mért vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására használt analízisek eredményei;
- vízminőség a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben, azaz pH-érték, hőmérséklet, oldott oxigén, keménység és ammóniatartalom;
- az elpárolgott vizsgálati víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha történik ilyen;
- a kikelt hím és nőstény szúnyogok száma edényenként és naponta az 1. és a 2. generációban;
- a kifejlett és élő szúnyogok ivararánya kezelésként az 1. és a 2. generációban;
- a ki nem kelt lárvák száma edényenként az 1. és a 2. generációban;
- kikelési százalék/arány ismétlésként és vizsgálati koncentrációnként (hím és nőstény szúnyogok összevonva) az 1. és a 2. generációban;
- a kifejlett és élő szúnyogok átlagos fejlődési üteme ismétlésként és kezelési arányonként (hím és nőstény szúnyogok külön-külön, illetve összevonva) az 1. és a 2. generációban;

- a kristályosító csészékben lerakott peteszalagok száma tenyésztőketrecenként és naponta;
- a petecsomók jellemzői (méret, forma és termékenység);
- fekunditás – a petecsomók száma osztva a tenyésztőketrecben elhelyezett nőstények számával;
- termékenység – a termékeny petecsomók száma osztva a tenyésztőketrecben elhelyezett nőstények számával;
- a toxicitási végpontok – például az EC_x (és a hozzá tartozó konfidenciaintervallum), valamint a NOEC – becült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;
- az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltéréseknek a vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

- (1) E melléklet C.28. fejezete: Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett víz használatával.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRC, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) E melléklet C.27. fejezete: Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett üledék használatával.

- (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. függelék***Fogalommeghatározások**

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Formulázott üledék, más néven kevert, mesterséges vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek imitálására használt anyagkeverék.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék fölé kerülő víz.

Szemcseközi víz vagy pórusvíz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett víz: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett víz.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben lehet tenyészteni. Az edény aljára vékony rétegben (kb. 5–10 mm) kvarchomokot szórunk. A kovaföld (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő tenyésztőközegnek bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméteres réteg is elegendő). Ezt követően néhány centiméternyi, célnak megfelelő vizet töltünk az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében az elpárolgott vizet szükség szerint pótolni kell. A vizet ki is lehet cserélni, ha szükséges. Gyenge levegőztetést kell biztosítani. A lárvatenyésztő edényeket megfelelő ketrecben kell tartani, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben elegendő helynek kell lennie a kifejlett példányok rajzásához, különben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).
2. A ketreceket szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben kell tartani, 16 órán keresztül világosban (fényerő kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. A 60 % RH alatti légnedvesség dokumentáltan gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy mesterséges víz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle »M4« vagy »M7« közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. A tenyésztéshez használt vizet szükség esetén ki lehet cserélni. Ehhez a használt vizet leöntjük vagy kiszívjuk a tenyésztőedényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket ne pusztítsuk el.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyog-lárvákat pelyhesített haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy más márkájú hasonló haleledel) kell etetni, edényenként naponta körülbelül 250 mg mennyiségben. A haleledelt száraz, őrölt por vagy vizes szuszpenzió formájában lehet adagolni: 1,0 g pelyhesített eledelet adunk 20 ml hígítóvízhez, és összekeverjük, hogy homogén keveréket kapjunk. Ezt a készítményt körülbelül 5 ml/edény/nap arányban lehet az állatoknak adni. (Használat előtt felrázandó.) Az idősebb lárvák többet is kaphatnak.
5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az táplálékadagot szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.
6. Az újonnan létesített tenyésztőedényekhez zöldalga- (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek alapján a kifejlett példányok számára telített cukoroldatba mártott vattakorong adható táplálékként.

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk és vékony testalkatuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a felnőtt egyedek a tenyésztőketrecbe kerültek, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell, hogy raktak-e le kocsonyás petecsomókat. Ha vannak ilyen petecsomók, óvatosan el kell távolítani azokat. A petecsomókat át kell helyezni a tenyésztővízből vett mintát tartalmazó kis csészébe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.
10. Az első fejlődési stádiumban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

Az »M4« és »M7« vizsgálati oldat elkészítése

12. Az »M4« közeg leírása ElenDt (1990) munkájában található. Az »M7« közeget az »M4« közeggel megegyező módon állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban megjelölt anyagok koncentrációja az »M7« közegben négyszer alacsonyabb, mint az »M4« közegben. A vizsgálati oldatot nem szabad ElenDt és Bias (1990) szerint előállítani, mivel a $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a NaNO_3 , KH_2PO_4 és a K_2HPO_4 törzsoldat készítéséhez megadott koncentrációi nem megfelelőek.

Az »M7« közeg elkészítése

13. A törzsoldatok (I) mindegyikét külön készítjük el, majd a törzsoldatokból (I) egy kombinált törzsoldatot (II) állítunk össze (lásd az 1. táblázatot). Az »M7« közeg előállításához a kombinált törzsoldat (II) 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ioncserélt vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamintörzsoldatot is készítünk, amelyhez három vitamint ioncserélt vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt a kombinált vitamintörzsoldatból 0,1 ml-t az »M7« közeghez adunk. A vitamintörzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tárolni. A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

1. táblázat

Nyomelem-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

Törzsoldatok (I)	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A kombinált törzsoldat (II) elkészítése: keverjük össze a törzsoldatok (I) alábbi mennyiségét (ml), és hígítsuk fel 1 literre ioncserélt vízzel		Végző koncentráció a vizsgálati oldatokban (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (l)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (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
$\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (l)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (l)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (l)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Törzsoldatok ⁽¹⁾	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A kombinált törzsoldat (II) elkészí- tése: keverjük össze a törzsoldatok (I) alábbi mennyiségét (ml), és hígítsuk fel 1 literre ioncserélt vízzel		Végző koncentráció a vizsgálati olda- tokban (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ × 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ × 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Ezeknek az anyagoknak az esetében az M4 és az M7 a fent jelzett módon eltér.

⁽²⁾ Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat:

Makrotápanyag-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

	Ioncserélt vízzel 1 literre hígí- tott mennyiség (mg)	Makrotápanyag-törzsoldatok M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végző koncentráció a vizsgá- lathoz használt M4 és M7 ol- datban (mg/l)
CaCl ₂ × 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ × 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ × 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

3. táblázat:

Vitamintörzsoldatok az M4 és M7 közeghez

A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamintörzsoldatot készítettünk.

	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamintörzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végző koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

HIVATKOZÁSOK

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streløkke and H. Köpp. Berlin.

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

Elenđt, 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. függelék

Formulázott üledék elkészítése

AZ ÜLEDÉK ÖSSZETÉTELE

A formulázott üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	Az üledék száraz tömegére vetített %-os arány
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növény-maradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4–5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 %-a az 50–200 μm -es tartományba esik	75–76
Kaolinit agyag	Kaolinittartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 ($\pm 0,5$)
Kalcium-karbonát	CaCO_3 , porított, vegytiszta	0,05–0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30–50

ELKÉSZÍTÉS

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. A szükséges mennyiségű tőzegporból ioncserélt vízzel nagy teljesítményű homogenizáló készülék segítségével szuszpenziót készítünk. A szuszpenzió pH-ját CaCO_3 hozzáadásával $5,5 \pm 0,5$ értékre állítjuk be. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása céljából a szuszpenziót 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk. Az ezt követően ismét megmért pH-nak $6,0 \pm 0,5$ értéket kell mutatnia. Ezek után a tőzegszuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint ioncserélt vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételt megmérjük, és szükség esetén CaCO_3 hozzáadásával $6,5$ – $7,5$ értékre állítjuk be. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szervesszéntartalmat. Ezt követően – az árvásúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználása előtt – ajánlott a mesterséges üledéket a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között hét napig kondicionálni.

TÁROLÁS

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. A formulázott üledéket az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

HIVATKOZÁSOK

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. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

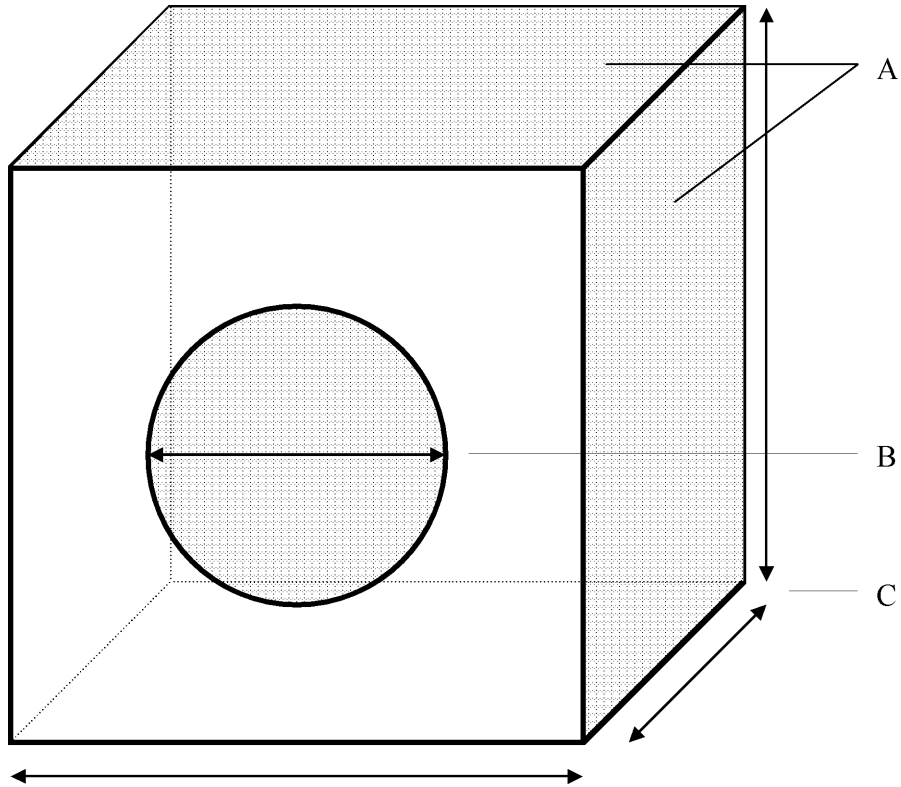
ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Keménység CaCO ₃ -ban	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 µg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

(*) Megjegyzendő, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált vegyi anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

5. függelék

Iránymutatás a vizsgálat elvégzésére vonatkozóan

Példa a tenyésztőketrecre:

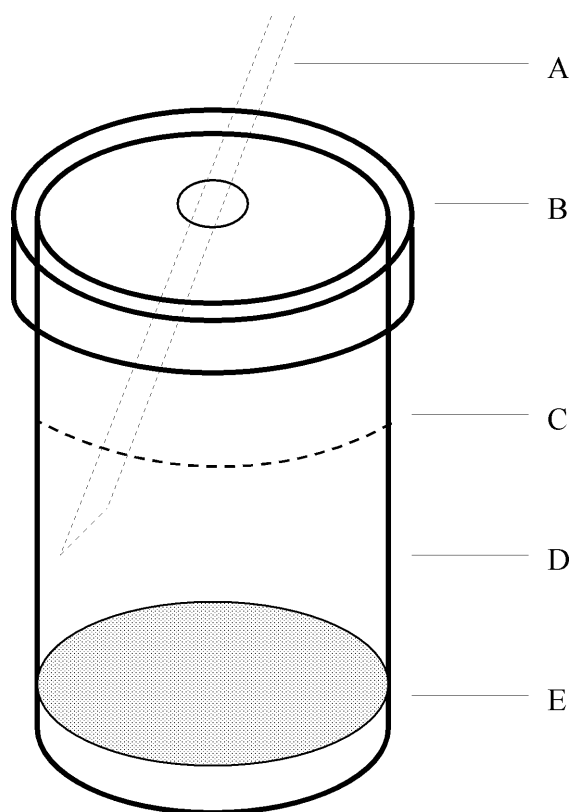


A: géz a ketrec tetején és legalább az egyik oldalán (lyukbőség kb. 1 mm)

B: nyílás a kifejlett felnőtt példányok tenyésztőketrecrebe helyezéséhez és a lerakott petecsomók kristályosító csészékből való eltávolításához (az ábrán nem látható)

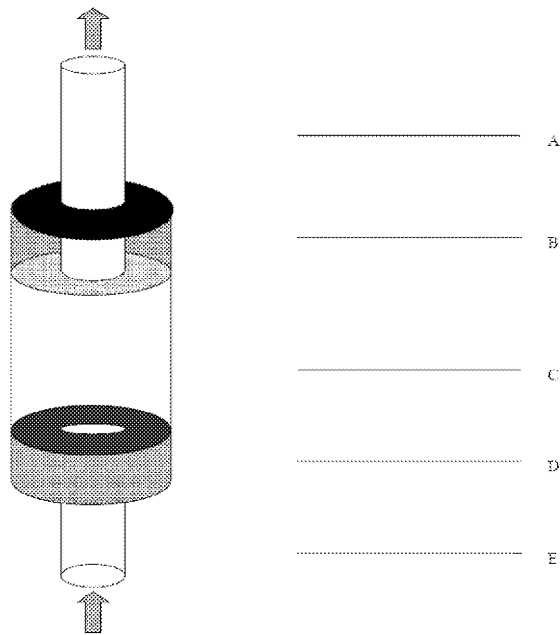
C: a tenyésztőketrec minimum 30 cm hosszúságú, 30 cm magasságú és 30 cm szélességű

Példa a vizsgálati edényre:



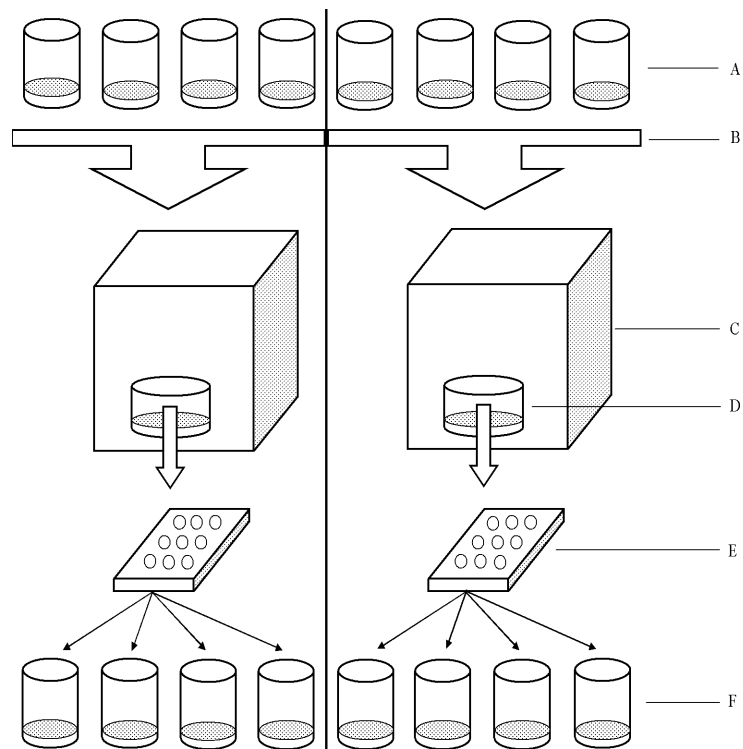
- A: Pasteur-pipetta a fedővíz levegőztetéséhez
- B: a kikelt szúnyogok szökését megakadályozó üvegfedél
- C: vízfelszín
- D: vizsgálati edény (minimum 600 ml-es üveg főzőpohár)
- E: üledékréteg

Példa a felnőtt szúnyogok befogására szolgáló szippantóra (a nyilak a levegő áramlási irányát jelzik):



- A: üvegcső (belső átmérője kb. 5 mm) egy önfelszívó szivattyúhoz csatlakoztatva
- B: vulkanizált gumidugó, üvegcsővel (A) perforálva. Az üvegcső (A) nyílását belül kevés vatta és géz fedi (lyukbőség kb. 1 mm), amely megakadályozza a szúnyogok károsodását, amikor beszívódnak a szippantóba.
- C: átlátszó tartály (műanyag vagy üveg, hossza kb. 15 cm) a befogott szúnyogok számára
- D: vulkanizált gumidugó, csővel (E) perforálva. A szúnyogok tenyészőketrebe engedéséhez a D dugót ki kell húzni a C tartályból.
- E: cső (műanyag vagy üveg, belső átmérője kb. 8 mm) a felnőtt szúnyogok edényből való begyűjtéséhez

Az életciklus-vizsgálat vázlatos bemutatása:



- A: 1. generáció – üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edények, nyolc ismétlés, 20 db első stádiumú lárva edényenként
- B: négy vizsgálati edény minden egyes tenyésztőketrechez (A és B)
- C: tenyésztőketrecek (A és B) a rajzáshoz, párzáshoz és peterakáshoz
- D: kristályosító csészék a petecsomók lerakásához
- E: mikrotiterlemezek, minden petecsomónak egy lyukkal
- F: 2. generáció – üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edények, nyolc ismétlés, 20 db első stádiumú lárva edényenként

C.41. HALAK IVARI FEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 234. vizsgálati iránymutatásában (2011) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer egy 1998-as döntésen alapul, amelynek értelmében új vizsgálati módszereket kell kifejleszteni a hormonháztartást vélhetően zavaró anyagok szűrésére és vizsgálatára, illetve aktualizálni kell a meglévő módszereket. A halak ivari fejlődésének vizsgálatát (Fish Sexual Development Test, FSDT) ígéretes vizsgálati módszerként azonosították, amely a halak egy olyan érzékeny életszakaszát fedi le, amikor fogékonyak mind az ösztrogén-, mind az androgénszerű vegyi anyagokra. A vizsgálati módszert 2006 és 2010 között laboratóriumok közötti validálási folyamatnak vették alá, amelynek során validálták a japán fogasponttyal (*Oryzias latipes*), a zebradánióval (*Danio rerio*) és a tuskés pikóval (*Gasterosteus aculeatus*) végzett vizsgálatot, illetve részben validálták az amerikai csellével (*Pimephales promelas*) végzett vizsgálatot (41) (42) (43). Ez a protokoll a vizsgálatához a japán fogasponttyot, a tuskés pikót és a zebradániót alkalmazza. A protokoll alapvetően az OECD »A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat« című 210. vizsgálati iránymutatásának (1) kibővítése, amelynek keretében az expozíció egészen a halak ivari differenciálódásáig folytatódik, azaz a japán fogaspontty, a tuskés pikó és zebradánió esetében a kikelés után mintegy 60 napig (days post-hatch, dph) (a jövőben validálásra kerülő egyéb fajok esetében az expozíciós idő rövidebb vagy hosszabb is lehet), illetve a vizsgálatot endokrinszenzitív végpontokkal is kiegészíti. Az FSDT a hormonháztartást vélhetően zavaró vegyi anyagok (pl. ösztrogének, androgének és szteroidogenezis-gátlók) ivari fejlődésre kifejtett hatásait és káros következményeit értékeli a korai életszakaszban. A két alapvető endokrin végpont – a vitellogenin (VTG) koncentrációja és a fenotípusos ivararány – kombinált megfigyelésével a vizsgálat képes kimutatni a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusát. A populáció szempontjából releváns fenotípusos ivararány-változás miatt az FSDT a veszélyek és kockázatok értékelésére használható. Ha azonban a vizsgálatot veszély- vagy kockázatertelés céljából végzik, a tuskés pikót nem szabad használni, mert az eddigi validációs adatok azt mutatják, hogy e faj esetében a fenotípusos ivararány vizsgált anyagok miatti megváltozása nem gyakori.
2. A protokoll szerint a halakat vízen keresztül tesszük ki a vegyi anyagnak abban az ivarilag labilis életszakaszban, amikor várhatóan a legérzékenyebbek a hormonháztartást és ezáltal az ivari fejlődést zavaró vegyi anyagok hatására. Az endokrin rendszerrel összefüggő fejlődési rendellenességek mutatójaként két alapvető végpontot mérünk: a VTG koncentrációját és az ivarmirigyek szövettani vizsgálata segítségével meghatározott ivararányt (az ivarak egymáshoz viszonyított arányát). Az ivarmirigyek kórszövettani vizsgálata (a petesejtek és a spermato-genetikus sejtek értékelése és osztályozása) nem kötelező. Ezenkívül lehetőség szerint a genetikai ivart is meghatározzuk (pl. a japán fogaspontty és a tuskés pikó esetében). A genetikai ivari marker jelenléte komoly előny, mivel növeli az ivararányra vonatkozó statisztikák erejét, és lehetővé teszi a fenotípusos ivar megfordulásának kimutatását az egyes egyedek esetében. Az egyéb mérendő apikális végpontok közé tartozik a kikelési és a túlélési arány, a testhossz, valamint a testtömeg. A vizsgálati módszert a fent megadottaktól eltérő fajokra is adaptálni lehet, feltéve, hogy az egyéb fajokat a japán fogaspontty, a tuskés pikó és a zebradánió esetében elvégzett validálással megegyező validálásnak vetjük alá, illetve a kontrollhalak a vizsgálat végén ivarilag differenciáltak, a VTG szintje kellően magas a vegyi anyaggal összefüggő jelentős változások kimutásához, és a vizsgálati rendszer érzékenységét az endokrin rendszerre ható referencia-vegyianyagok ((anti)-ösztrogének, (anti)-androgének, aromatáz inhibitorok stb.) használatával igazoljuk. Emellett az egyéb fajokat felhasználó FSDT-adatokról készült validálási jelentés(ek)e)t az OECD-nek felül kell vizsgálnia, és a validálás eredményének kielégítőnek kell lennie.

Kiindulási megfontolások és korlátok

3. A VTG általában a nőstény ikrarakó gerincesek májában termelődik a keringő endogén ösztrogénekre adott válaszként (2). A VTG az ikra sárgájában található fehérjék prekursora, és a májban történő megtermelődése után a vérárammal jut el a petefészkekbe, ahol a fejlődő ikrák felveszik és módosítják. A VTG-szintézis nagyon korlátozott mértékű – de kimutatható – a fiatal halakban és a kifejlett hím halakban, mivel a szervezetükben nincs elegendő keringő ösztrogén. Ugyanakkor a máj az exogén ösztrogénstimulációra adott válaszul is képes VTG szintetizálására és kiválasztására (3) (4) (5).
4. A VTG mérésével kimutathatók az ösztrogén, antiösztrogén és androgén hatásmechanizmusú vegyi anyagok, valamint a szteroidogenezist zavaró vegyi anyagok, mint például az aromatáz inhibitorok. Az ösztrogenikus vegyi anyagok kimutathatók a hím halakban végbemenő VTG-indukció mérésével, amely módszerre számos hivatkozást találunk a lektorált tudományos szakirodalomban. A VTG-indukcióját aromatizálható androgénnel szembeni expozíció után is kimutatták (6) (7). A keringő ösztrogén szintjének csökkenése a nőstényeknél – például az endogén androgént természetes ösztrogén 17 β -ösztradiollá konvertáló aromatáz gátlása miatt – a VTG-koncentráció csökkenését okozza, amelyet az aromatázgátló tulajdonságokkal rendelkező – vagy tágabban a szteroidogenezist gátló – vegyi anyagok kimutatására használnak (33). Az ösztrogén-/aromatázgátlást követő

VTG-válasz biológiai jelentőségét megállapították és széles körben dokumentálták (8) (9). Lehetséges azonban, hogy a VTG-termelést a nőstényeknél az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok is befolyásolják.

5. Több rutin mérési módszert is sikeresen kifejlesztettek és szabványosították a VTG mennyiségének az egyes halak véréből, májából, egész testéből vagy fej/farok homogenizátumából gyűjtött mintákban történő meghatározására. Ez a helyzet a zebradánió, a tuskés pikó és a japán fogasponty, valamint a – részlegesen validált – amerikai csele esetében; e fajok tekintetében fajspecifikus enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálatok (ELISA) állnak rendelkezésre, amelyek immunkémiai módszereket használnak a VTG mennyiségi meghatározására (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). A japán fogasponty és a zebradánió esetében jó korreláció áll fenn a vérplazmából, májból és homogenizátumból vett mintákban mért VTG-értékek között, bár a homogenizátumokban általában a plazmánál valamivel alacsonyabb értékek mérhetők (17) (18) (19). A VTG-analízis céljából történő ajánlott mintavételi eljárásokat az 5. függelék tartalmazza.
6. A fenotípusos ivararány (az ivarok egymáshoz viszonyított aránya) változása egy olyan végpont, amely az ivar megfordulására utal. Az ösztrogének, antiösztrogének, androgének, antiandrogének és a szteroidogenezist gátló vegyi anyagok elvileg befolyásolhatják a fejlődő halak ivararányát (20). Kimutatták, hogy az ivar megfordulása a zebradánióban részben visszafordítható (21), ha azt ösztrogénszerű vegyi anyagoknak való expozíció váltja ki, míg az androgénszerű vegyi anyagoknak történő expozíció esetében az ivar megfordulása állandó (30). Nem szerint nőstény, hím, interszexuális (petesejtek és spermatozoidok egyazon ivarmirigyben) vagy differenciálatlan egyedeket különböztetünk meg, amelyet az egyes halak ivarmirigyének szövettani vizsgálatával határozunk meg. Ezzel kapcsolatban iránymutatás a 7. függelékben és »Az endokrin rendszerrel összefüggő körszövettani elváltozások diagnózisa halak ivarmirigyében« című OECD-iránymutatásban található (22).
7. A genetikai ivart genetikai markerek segítségével vizsgáljuk, ha vannak ilyenek az adott halfajban. A japán fogaspontyban a nőstény XX vagy a hím XY géneket polimeráz láncreakcióval (PCR) lehet kimutatni, vagy az Y-kapcsolt DM doméngént (DMY) lehet elemezni (DMY negatív vagy pozitív) a (23) és (24) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint. A tuskés pikó esetében a genetikai ivar meghatározására létezik egy egyenértékű PCR-módszer, amely a 10. függelékben kerül ismertetésre. Amennyiben a genetikai ivart az egyedek szintjén össze lehet kapcsolni a fenotípusos ivarral, a vizsgálat megbízhatósága javul, ezért a genetikai ivart a dokumentált genetikai ivari markerekkel rendelkező fajok esetében meg kell határozni.
8. A két alapvető endokrin végpont – a VTG és az ivararány – együttesen képes bizonyítani a vegyi anyag endokrin rendszerre kifejtett hatásmechanizmusát (mode of action, MOA) (1. táblázat). Az ivararány populációszinten releváns biomarker (25) (26), és az FSDT eredményeit bizonyos jól meghatározott hatásmechanizmusok esetében a veszélyek és kockázatok elemzésére lehet használni, ha a szabályozó hatóság arra megfelelőnek ítéli. Ezek közé a hatásmechanizmusok közé jelenleg az ösztrogének, az androgének és a szteroidogenezis-gátlók kifejtette hatások tartoznak.

1. táblázat

Az endokrin végpontok reakciói a vegyi anyagok különböző hatásmechanizmusaira:

↑ = nő, ↓ = csökken, — = nem vizsgálták

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Ivararány	Hivatkozások
Gyenge ösztrogénagonista	↑	↑	♀↑ vagy differenciálatlan↑	(27) (40)
Erős ösztrogénagonista	↑	↑	♀↑ vagy differenciálatlan↑, ♂ nincs	(28) (40)
Ösztrogénantagonista	—	—	♀↓, differenciálatlan↓	(29)
Androgénagonista	↓ vagy —	↓ vagy —	♂↑, ♀ nincs	(28) (30)
Androgénantagonista	—	—	♀↑ interszexuális↑	(31)
Aromatázinhibitor	↓	↓	♀↓	(33)

9. Az FSDT nem terjed ki a halak reprodukzív életszakaszára, ezért az olyan vegyi anyagokat, amelyek esetében fennáll a gyanú, hogy befolyásolják a szaporodást, de alacsonyabb koncentrációban, mint az ivari fejlődést, a szaporodást is magában foglaló vizsgálatban kell megvizsgálni.
10. Az e vizsgálati módszerhez tartozó fogalom meghatározások az 1. függelékben találhatók.
11. Az *in vivo* FSDT célja, hogy kimutassa az androgén és ösztrogén tulajdonságokkal, valamint az antiandrogén, az antiösztrogén és a szteroidogenezis-gátló tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagokat. Az FSDT (1. és 2.) validálási szakaszai kiterjedtek az ösztrogén, az androgén és a szteroidogenezis-gátló vegyi anyagokra. Az ösztrogén- és androgénantagonisták FSDT keretében bemutatott hatásai az 1. táblázatban láthatók, de ezek a hatásmechanizmusok jelenleg még kevésbé dokumentáltak.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A vizsgálatban halakat teszünk ki – az újonnan megtermékenyített petesejtől az ivari differenciálódás befejeződéséig – a vízben oldott vizsgált vegyi anyag legalább három koncentrációjának. Átfolyásos vizsgálati körülményeket kell alkalmazni, kivéve ha ez a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége vagy jellege (pl. oldhatóság) miatt nem lehetséges. A vizsgálat az újonnan megtermékenyített (a csírákorong osztódása előtti állapotban lévő) ikrák vizsgálati kamrákba helyezésével kezdődik. A kamrák betelepítésének folyamatát a 27. pont ismerteti fajonként. A validált halfajok, azaz a japán fogasponty, a tüskés pikó és a zebraadánió esetében a vizsgálat a kikelés utáni 60. napon ér véget. A vizsgálat befejezésekor a halakat humánusan túl kell altatni. Minden halból biológiai mintát (vérplazma, máj vagy fej/farok homogenizátum) veszünk VTG-elemzés céljára, a többi részt pedig az ivarmirigyek szövettani értékelése céljából fixáljuk, hogy meghatározhassuk a fenotípusos ivart; opcionálisan kórszövettani vizsgálatokat (pl. az ivarmirigyek stádium szerinti osztályozása, az interszexualitás súlyossága) is lehet végezni. A megfelelő markerekkel rendelkező fajok esetében biológiai mintát (farok- vagy hátúszó) veszünk a genetikai ivar meghatározására (9. és 10. függelék).
13. A validált fajokra, azaz a japán fogaspontyra, a tüskés pikóra és a zebraadánióra vonatkozó vizsgálati feltételekről a 2. függelék nyújt áttekintést.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

14. Rendelkezésre kell állnia a lehetőleg az ehhez a vizsgálatához kiválasztott fajjal elvégzett akut toxicitási vizsgálatok vagy más rövid távú toxikológiai vizsgálatok [pl. C.14. vizsgálati módszer (34) és az OECD 210. vizsgálati iránymutatása (1)] eredményeinek. Ez egyben azt is jelenti, hogy ismert a vizsgált vegyi anyag vízoldhatósága és gőznyomása, és a vizsgálati kamrákban lévő vizsgált vegyi anyag mennyiségének meghatározásához olyan megbízható analitikai módszer áll rendelkezésre, amelynek ismert a pontossága és a kimutatási határa.
15. A hasznos információk közé tartozik továbbá a szerkezeti képlet, a vegyi anyag tisztasága, vízben való stabilitása vagy fénystabilitása, a pK_a , a P_{ow} , valamint a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálatok eredményei (C.4. módszer) (35).

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

16. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat elfogadható legyen:
 - A kísérlet során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig legalább a levegőteltettségi érték (ASV) 60 %-ának kell lennie;
 - Az expozíciós időszak alatt a víz hőmérsékletében soha nem lehet $\pm 1,5$ °C-nál nagyobb eltérés a kísérleti tartályok között, és a hőmérsékletet a vizsgált faj tekintetében meghatározott hőmérsékleti tartományban kell tartani (2. függelék);
 - Rendelkezésre kell állnia egy validált módszernek az expozíciós vegyi anyag analízisére, amelynek kimutatási határa jóval a legalacsonyabb nominális koncentráció alatt van, és bizonyítékokat kell gyűjteni annak igazolására, hogy a vizsgált anyag oldatban lévő koncentrációit kielégítő mértékben sikerült az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül tartani;

- A kontrollcsoportokban és – adott esetben – az oldószeres kontrollokban a megtermékenyített peték összesített túlélési arányszáma nagyobb a 2. függelékben meghatározott határértékeknél vagy egyenlő azokkal;
- A növekedéssel és a vizsgálat befejezésekor mért ivararányokkal kapcsolatos elfogadhatósági kritériumok a kontrollcsoportok adatain alapulnak (összevont oldószeres és vizes kontroll, kivéve, ha azok jelentősen eltérnek egymástól; ez utóbbi esetben csak az oldószeres kontroll):

		Japán fogasponty	Zebradánió	Tüskés pikó
Növekedés	Hal nedves súlya, szárazra itatva	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Hosszúság (standard hossz)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Ivararány (% hím vagy nőstény)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

- Ha oldószert használunk, annak nem lehet statisztikailag szignifikáns hatása a túlélési arányra, és nem idézhet elő semmilyen hormonháztartást zavaró hatást vagy egyéb káros hatást a korai életszakaszban, amelyet az oldószeres kontroll kimutat.

Az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérés esetén a vizsgálati adatok megbízhatóságára gyakorolt következményeket mérlegelni kell, és bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati kamrák

17. Bármely üvegből, rozsdamentes acélból vagy más, kémiaiag inert anyagból készült kamra használható. A kamráknak elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy érvényesülhessenek a betelepítési arányra vonatkozóan lentebb megadott kritériumok. Javasolt a vizsgálati kamrák véletlenszerű elhelyezése a vizsgálatra kijelölt területen. Az olyan blokkos véletlenszerű elrendezés, amelyben minden blokkban jelen van az összes koncentráció, előnyösebb a teljesen véletlenszerű elrendezésnél. A vizsgálati kamrákat védeni kell a nem kívánt zavaró hatásoktól.

A faj kiválasztása

18. Az ajánlott halfajok a 2. függelékben találhatók. Az új fajok bevonására vonatkozó eljárásokat a 2. pont ismerteti.

Az ikrás halak tartása

19. Az ikrás halak kielégítő körülmények közötti tartására vonatkozó részletek az OECD 210. vizsgálati iránymutatásában találhatók (1). Az ikrás halakat naponta egyszer vagy kétszer kell megfelelő táplálékkal megetetni.

Az embriók és a lárvák kezelése

20. Az embriók és a lárvák expozíciója kezdhető a fő kamrán belül elhelyezett kisebb, két oldalán vagy a végein hálós kialakítású, így a vizsgált vegyi anyag átáramlását lehetővé tevő üveg vagy rozsdamentes acél kamrákban. E kisebb kamrákban az örvénymentes áramlást úgy lehet elérni, hogy a kamrákat egy fel-le mozgatható karra függesztjük fel, ügyelve arra, hogy az organizmusok mindig a vizsgálati oldatban legyenek.
21. Amennyiben az ikrák tartására kis tartályokat, rácsokat vagy hálókat használunk a fő vizsgálati kamrán belül, akkor a lárvák kikelése után ezeket az akadályozó eszközöket el kell távolítani, kivéve a hálókat, amelyeket a halak szökésének megakadályozása érdekében bent kell tartani. Ha a lárvák áthelyezésére van szükség, nem szabad hagyni, hogy a levegővel érintkezzenek és nem használható háló a halak ikratartályokból való eltávolítására. Az áthelyezés időzítése az egyes fajoktól függően változik, és nincs is mindig szükség rá.

Víz

22. Bármely víz alkalmas vizsgálati víznek, amelyben a vizsgált faj kontrollcsoportja legalább olyan jó túlélést mutat, mint a 3. függelékben leírt vízben. A vízminőséget a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálati eredményekre (pl. mert reakcióba lép a vizsgált vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatást az ivadékállomány teljesítményére, a vízből időnként mintákat kell venni elemzésre. Ha a hígítóvízről ismert, hogy viszonylag állandó minőségű, az összes szerves széntartalmát, a vezetőképességét, a pH-ját és a szuszpendált szilárd anyagok mennyiségét kell mérni, például háromhavonta. Ha a víz minősége megkérdőjelezhető, a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), valamint a növényvédő szerek koncentrációját is mérni kell. A kémiai elemzés és a vízgyűjtés részletei a 34. pontban találhatóak.

Vizsgálati oldatok

23. Ha a gyakorlatban kivitelezhető, átfolyós rendszert kell használni. Az átfolyós vizsgálatok esetében a koncentrációsorozatnak a vizsgálati kamrákba történő bejuttatása céljából olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgált vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőszer). A vizsgálat során időnként ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A 24 óránként legalább öt vizsgálati kamrányi térfogatnak megfelelő áramlási sebességet találtak megfelelőnek (1). Ügyelni kell arra, hogy ne használjunk műanyag csövet vagy egyéb olyan anyagokat, amelyek biológiailag aktív vegyi anyagokat tartalmazhatnak vagy adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot.
24. A törzsoldatot lehetőleg oldószer használata nélkül, a vizsgált vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Ha a vizsgált anyag nehezen oldódik vízben, »A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata« című OECD-iránymutatásban leírtakat kell követni (36). Bár az oldószer használatát kerülni kell, a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához egyes esetekben mégis oldószer használatára lehet szükség. Alkalmas oldószerekre a (36) szakirodalmi hivatkozásban található példák.
25. A félstatikus vizsgálati körülményeket kerülni kell, kivéve ha alkalmazásukat a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos kényszerítő okok indokolják (pl. stabilitás, korlátozott elérhetőség, magas költségek vagy veszélyek). A félstatikus vizsgálatok során a vízcserét két különböző módja közül lehet választani: vagy új vizsgálati oldatokat készítenek tiszta kamrákban, és a túlélő ikrákat és lárvákat óvatosan áthelyezik ezekbe az új kamrákba, vagy pedig a vizsgálati kamrákban hagyják a vizsgált organizmusokat, és a vizsgálati víz egy részét (legalább kétharmadát) naponta cserélik.

ELJÁRÁS**Expozíciós körülmények***Ikragyűjtés és időtartam*

26. Hogy az eredmények genetikai tekintetben torzítatlanok legyenek, legalább három tenyészpártól vagy csoporttól gyűjtünk ikrákat, amelyeket összekeverünk, és véletlenszerűen választunk közülük a vizsgálat megkezdéséhez. A tuskés pikó esetében a mesterséges megtermékenyítés leírását lásd a 11. függelékben. A vizsgálatot az ikrák megtermékenyítése után a lehető leghamarabb el kell kezdeni, és az embriókat lehetőleg a csírákorong osztódásának megkezdődése előtt a vizsgálati oldatokba kell tenni, vagy e stádiumot követően a lehető leghamarabb, de legkésőbb 12 órával a megtermékenyítés után. A vizsgálatot addig kell folytatni, amíg be nem fejeződik az ivari differenciálódás a kontrollcsoportban (60 nappal a kikelés után a japán fogasponty, a tuskés pikó és a zebadánió esetében).

Betelepítés

27. A megtermékenyített ikrák száma a vizsgálat elején koncentrációként legalább 120 legyen, amelyet minimum 4 ismétlés között kell elosztani (az ikrák kontrollcsoporthoz rendeléséhez elfogadott módszer a négyzetgyök alapú elosztás). Az ikrákat véletlenszerűen kell elosztani a kezeléseik között (a randomizáláshoz statisztikai táblázatokat használva). A betelepítési aránynak (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) elég kicsinek kell lennie ahhoz, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját a kamrák közvetlen levegőztetése nélkül az ASV legalább 60 %-án lehessen tartani. Az átfolyós vizsgálatok esetében javasolt, hogy a betelepítési arány soha ne haladja meg a 0,5 g/liter/24 óra arányt, illetve az 5 g/liter oldat arányt (2). A halakat legkésőbb 28 nappal a megtermékenyítés után újra szét kell osztani az ismétlések között úgy, hogy minden ismétlés lehetőség szerint ugyanannyi halat tartalmazzon. Ha az expozícióval összefüggésben mortalitás lép fel, az ismétlések számát arányosan csökkenteni kell annak érdekében, hogy a halak sűrűségét kezelésről kezelésre lehetőleg azonos szinten lehessen tartani.

Fény és hőmérséklet

28. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (az FSĐT kísérleti feltételeit lásd a 2. függelékben).

Táplálás

29. A táplálék, valamint a táplálás rendje kritikus jelentőségű, és fontos, hogy minden egyes életszakaszban a megfelelő táplálékot biztosítsuk, megfelelő időközönként és a normális növekedés támogatásához megfelelő mennyiségben. Az etetésnek *ad libitum* kell történnie, ugyanakkor minimálisra csökkentve a felesleget. A megfelelő növekedési ütem eléréséhez a halakat legalább naponta kétszer kell etetni (hétvégén elfogadható a naponta egyszeri etetés is), az egyes etetések között legalább három órát hagyva. A táplálékfelesleget és az ürülékelt szükség szerint el kell távolítani a hulladék felhalmozódásának elkerülése érdekében. A túlélési arány javítása és a növekedés optimalizálása érdekében a táplálékot és az etetési rendet a tapasztalatok alapján folyamatosan finomítani kell. Törekedni kell ezért arra, hogy a javasolt etetési rendet elismert szakemberek is megerősítsék. A táplálást 24 órával a vizsgálat befejezése előtt fel kell függeszteni. A megfelelő táplálékra példák a 2. függelékben találhatóak (lásd még az OECD halvizsgálati keretrendszerét is (39)).

Vizsgálati koncentrációk

30. A vizsgált vegyi anyagok osztásközeinek a 4. függelékben leírtakkal kell megegyeznie. Legalább három vizsgálati koncentrációt kell használni legalább négy ismétlésben. A kísérleti koncentrációk tartományának kiválasztásakor célszerű figyelembe venni a rendelkezésre álló akut vizsgálatokban az LC₅₀-et az expozíciós időszakhoz viszonyító görbét. Öt vizsgálati koncentráció javasolt abban az esetben, ha az adatokat kockázatértékeléshez tervezzük használni.
31. Nem szükséges vizsgálni a vizsgált vegyi anyagnak az akut felnőtt LC₅₀ 10 %-ánál vagy a 10 mg/l értéknél magasabb koncentrációit (amelyik az alacsonyabb). A legnagyobb vizsgált koncentráció a lárvafiatalsági LC₅₀ értékének 10 %-a legyen.

Kontrollok

32. A vizsgálati koncentrációk mellett hígítóvizet kontrollt (≥ 4 ismétlés) és ha szükséges, oldószeres kontrollt (≥ 4 ismétlés) is kell futtatni. A vizsgálatához csak olyan oldószereket szabad használni, amelyekről vizsgálatokkal kimutatták, hogy nincs statisztikailag jelentős hatásuk a vizsgálati végpontokra.
33. Ha oldószert használunk, az oldószer végső koncentrációja nem lehet nagyobb, mint 0,1 ml/l (36), és a koncentrációnak meg kell egyeznie minden vizsgálati kamrában, kivéve a hígítóvizet kontrollt. Törekedni kell azonban az oldószerek használatának kerülésére, vagy a koncentrációjukat minimális szinten kell tartani.

Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

34. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának kémiai analízisét a vizsgálat megkezdése előtt kell elvégezni az elfogadhatósági kritériumoknak való megfelelés ellenőrzése céljából. A vizsgálat elején és befejezésekor minden ismétlést egyedileg kell analizálni. A vizsgálat során legalább hetente egyszer analizálni kell vizsgálati koncentrációnként egy ismétlést, szisztematikusan változtatva az ismétléseket (1,2,3,4,1,2 ...). Ha a mintákat egy későbbi időpontban történő elemzés céljából eltároljuk, a minták tárolási módját előzőleg validálni kell. A mintákat szűrni (pl. 0,45 µm pórusméretet használva) vagy centrifugálni kell, hogy a valódi oldatban lévő vegyi anyag koncentrációjának meghatározására kerüljön sor.
35. A vizsgálat során az összes vizsgálati kamrában meg kell mérni a vízben oldott oxigént, a pH-t, a keménységet, a vezetőképességet, a sótartalmat (adott esetben) és a hőmérsékletet. Minimális követelményként az oldott oxigént, a sótartalmat (adott esetben) és a hőmérsékletet hetente kell mérni, míg a pH-t, a vezetőképességet és a keménységet a vizsgálat elején és végén kell mérni. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati kamrában folyamatosan figyelemmel kell kísérni.
36. Az eredményeknek a mért koncentrációkon kell alapulniuk. Ha azonban az oldatban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

Megfigyelések és mérések

Embriionális fejlődési fázis

37. Az expozíciót a megtermékenyítés után és a csírákorong osztódásának megkezdődése előtt a lehető leghamarabb meg kell kezdeni, de legkésőbb 12 órával a megtermékenyítés után, hogy biztosítsuk az expozíciót a korai embriionális fejlődés során.

Az ikrák kikelése és túlélési aránya

38. A kikelés és túlélés folyamatait naponta egyszer meg kell figyelni és a tapasztalt számadatokat fel kell jegyezni. Az elpusztult embriókat, lárvákat és fiatal halakat az észlelésüket követő lehető legrövidebb időn belül el kell távolítani, mivel gyorsan bomlásnak indulhatnak, vagy daraibjaikra eshetnek a többi hal mozgása következtében. Az elhullott egyedek kiemelésekor különös gondot kell fordítani arra, hogy ne üssük meg vagy okozzunk más módon sérülést a szomszédos ikrákban/lárvákban, mivel ezek az organizmusok igen sérülékenyek és érzékenyek. Az elhullás megállapításának kritériumai az adott életszakasztól függően változnak:
- ikrák: különösen a korai szakaszokban az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, fehér, opálos színt eredményezve,
 - lárvák és fiatal halak: mozdulatlanság és/vagy a légzőmozgások és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy a központi idegrendszer opálos elszíneződése és/vagy a mechanikai ingerekre adott válasz elmaradása.

Rendellenes megjelenés

39. A rendellenes testformát mutató lárvák, illetve halak számát fel kell jegyezni, és a rendellenesség megjelenését és természetét le kell írni. Megjegyzendő, hogy rendellenesen fejlődő embriók és lárvák természetes körülmények között is előfordulnak, és egyes fajok esetében a kontrollcsoportban mennyiségük akár néhány százalékot is elérhet. A rendellenesen fejlődő állatokat csak elpusztulásuk után kell a vizsgálati kamrákból eltávolítani. Összhangban azonban a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel, ha a rendellenességek fájdalmat, szenvedést és félelmet vagy maradandó egészségkárosodást okoznak, és az elhullást is megbízhatóan előre lehet jelezni, az állatokat a 44. pontban foglaltak szerint érzésteleníteni kell és el kell altatni, illetve az adatelemzés során ezeket az eseteket mortalitásként kell kezelni.

Rendellenes viselkedés

40. A rendellenességeket, így például a hiperventilációt, a koordinálatlan úszást, az atipikus nyugalmat és az atipikus táplálkozási magatartást megjelenésükkor fel kell jegyezni.

Tömeg

41. A vizsgálat végén az összes életben maradt halat el kell altatni (érezésteleníteni, ha vérmintát kell venni), és meg kell mérni az egyéni nedves tömegüket (szárazra itatva).

Testhossz

42. A vizsgálat végén meg kell mérni az egyéni testhosszt (standard hossz).
43. E megfigyelések alapján a jegyzőkönyvbe feljegyezhetőek az alábbi adatok vagy azok egy része:
- kumulált mortalitás;
 - az egészséges halak száma a vizsgálat végén;
 - a kikelés kezdő és befejező időpontja;
 - a túlélő állatok hossza és tömege;
 - a deformálódott lárvák száma;
 - a rendellenes viselkedést mutató halak száma.

Mintavétel a halakból

44. A halakból történő mintavételre a vizsgálat végén kerül sor. A mintavétel során kiválasztott halakat el kell altatni pl. MS-222 (100–500 mg/l, 200 mg NaHCO₃/l oldattal puffertolva) vagy FA-100 (4-allil-2-metoxi-fenol: eugenol) készítménnyel, és külön-külön le kell mérni a testhosszukat, illetve a nedves tömegüket (szárazra itatva), vagy ha vérmintát kell venni (lásd a 49. pontot), a halakat érzésteleníteni kell.

Mintavétel a VTG-elemzéshez és az ivar szövettani elemzéssel történő meghatározásához

45. Az ivar és a VTG elemzése céljából minden halból mintát kell venni. Minden halon szövettani vizsgálatot kell végezni az ivar meghatározása céljából. A VTG méréséhez az ismétlésenként legalább 16 halból vett rész minta elfogadott. Ha a rész minta eredményei nem bizonyulnak egyértelműnek, további halakban is elemezni kell a VTG-t.
46. A VTG és az ivar meghatározásához végzendő mintavétel a VTG-elemzés módszerétől függ:

VTG-elemzés fej/farok homogenizátumból

47. A halakat elaltatjuk. A halak fejét és farkát a közvetlenül a mellúszók, illetve a hátúszó mögött szikével végzett vágások segítségével elválasztjuk a testtől (lásd az 1. ábrát). A VTG-elemzéshez a halak fej- és farokrészeit összevonjuk, lemérjük, egyedileg megszámozzuk, folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, és – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A halak testét a szövettani elemzés céljából megszámozzuk, és megfelelő fixálóban rögzítjük (22). E módszer alkalmazásával a VTG- és a kórszövettani vizsgálatot minden egyes hal esetében elvégezzük, így a VTG szintjének esetleges változásait össze lehet kapcsolni a hal fenotípusos ivarával vagy a hal genetikai ivarával (a japán fogasponty és a tüskés pikó esetében). További információért lásd a homogenizációra vonatkozó iránymutatást (5. függelék) és a VTG mennyiségi meghatározására vonatkozó iránymutatást (6. függelék).

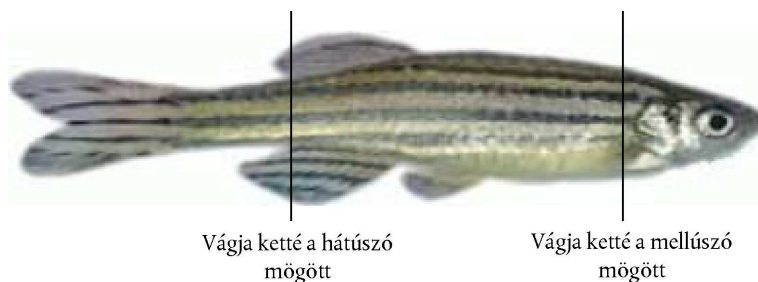
VTG-elemzés májhomogenizátumból

48. A halakat elaltatjuk. A májat kivágjuk és – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A máj kimetszésére és előkezelésére javasolt eljárások az OECD 229. vizsgálati iránymutatásában (37) vagy e melléklet C.37. fejezetében található (38). A májakat ezután az OECD 229. vizsgálati iránymutatásában vagy az e melléklet C.37. fejezetében leírtak szerint egyenként homogenizáljuk. Az összegyűjtött felülúszót a VTG homolog ELISA eljárással történő mérésére használjuk (a zebra-dánió esetében végzett mennyiségi meghatározás példáját lásd a 6. függelékben, a japán fogasponty esetében pedig lásd az OECD 229. vizsgálati iránymutatását (37)). E megközelítéssel az egyes halak vonatkozásában VTG-adatokat és ivarmirigy-szövettani adatokat is lehet gyűjteni.

VTG-elemzés vérplazmából

49. Az érzéstelenített halakból szívpunkcióval, illetve a farokvénából vagy a farok elvágása útján vért veszünk, majd a vért vérplazma gyűjtéséhez 4 °C-on lecentrifugáljuk. A plazmát felhasználásig – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A halat elaltatjuk és szövettani vizsgálat céljából a teljes testet fixáljuk. A plazma-mintákat és a halakat is egyénileg megszámozzuk, hogy a VTG-szinteket össze lehessen kapcsolni a halak ivarával.

1. ábra

A halak feldarabolása a VTG fej/farok homogenizátumból történő mérése és a köztes rész szövettani elemzése céljából

Genetikai ivarmeghatározás

50. A megfelelő markerekkel rendelkező fajok esetében a genetikai ivar meghatározása céljából biológiai mintát veszünk az egyes halpéldányokból. A japán fogasponty esetében a farokúszót vagy a hátúszót gyűjtjük be. Részletes leírás a 9. függelékben található, beleértve a szöveti mintavételt és a PCR-módszerrel történő ivarmeghatározást. A szöveti mintavétel és az ivar PCR-módszerrel történő meghatározásának leírását a tüskés pikó esetében a 10. függelék tartalmazza.

A VTG mérése

51. A VTG mérésének analitikusan validált kvantitatív módszeren kell alapulnia. Rendelkezésre kell állnia az adott laboratóriumban alkalmazott módszer vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variabilitására vonatkozó információknak. A vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variabilitás (valószínűleg) a halpopuláció különböző fejlődési stádiumaira vezethető vissza. Figyelembe véve a VTG-mérés variabilitását, az egyedül e végpont alapján meghatározott NOEC-értékeket körültekintően kell kezelni. Az e vizsgálati eljárásban alkalmazott halfajok tekintetében különböző módszerek állnak rendelkezésre a halak szervezetében termelődő VTG mérésére. A fehérjekoncentrációk enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálattal (ELISA) történő meghatározása egyszerre specifikus és viszonylag érzékeny mérési technika. Homológ antitesteket (amelyeket ugyanazon faj termel a VTG ellen) és a legfontosabb homológ standardokat kell használni.

Az ivar meghatározása

52. A VTG-mérés céljából alkalmazott mintavételi eljárástól függően az egyes halak egész teste vagy a test fennmaradó középső szakasza előre felcímkeztet feldolgozókazettába kerül, majd a szövettani ivarmeghatározáshoz (és adott esetben az ivarmirigyek stádium szerinti osztályozásához) megfelelő fixálószerben rögzítjük. A fixálásra és beágyazásra vonatkozó iránymutatás a 7. függelékben, valamint »Az endokrin rendszerrel összefüggő kórszöveti elváltozások diagnózisa halak ivarmirigyében« című OECD-iránymutatásban található (22). Feldolgozás után a halakat parafintömbökbe ágyazzuk be. Az egyes példányokat hosszirányban kell elhelyezni a parafintömbben. Minden egyes halból legalább hat hosszirányú metszetet (3–5 µm vastagságú) készítünk a frontális síkban, amelyek ivari szövetet is tartalmaznak mindkét ivarmirigyből. A metszetek közötti távolság kb. 50 µm legyen hímeknél és 250 µm nőstényeknél. Mivel azonban az egyes tömbök gyakran hímeket és nőstényeket is tartalmaznak (ha több, mint egy példányt ágyazunk be az egyes tömbökbe), e tömbök esetében kb. 50 µm távolságot hagyva készítünk metszeteket, amíg nem kapunk legalább hat metszetet az egyes hímek ivarmirigyeiből. Ezt követően a metszetek közötti távolságot körülbelül 250 µm-re lehet növelni a nőstények esetében. A metszeteket haematoxylinnal és eozinnal megfestjük, majd elsősorban az ivarra (hím, nőstény, interszexuális vagy differenciálatlan) figyelve fénymikroszkóp alatt megvizsgáljuk. Interszexuális nemről akkor lehet beszélni, ha több, mint egy petesejt van jelen a here hat elemzett metszetében, vagy spermatogén sejtek (igen/nem) vannak jelen a petefészkekben. A kórszöveti vizsgálat, illetve a petefészkek és a here stádium szerinti osztályozása nem kötelező, de ha elvégezzük, az eredményeket statisztikailag elemezni és jegyzőkönyvezni kell. Megjegyzendő, hogy bizonyos halfajokból természetes módon hiányzik a teljesen fejlett egy pár ivarmirigy, és előfordul, hogy csak egy ivarmirigy van jelen (pl. japán fogasponty és esetenként a zebra-dánió). Minden ilyen megfigyelést fel kell jegyezni.
53. A japán fogasponty esetében a genetikai ivar meghatározása a fogasponty hímvart meghatározó – az Y-kromoszómában található – génjének (DMY) jelenlétén vagy hiányán alapul. A fogasponty genotípusos ivarát a DMY gén DNS-ből történő szekvenálásával lehet meghatározni, amelyet például a farokúszó vagy a hátúszó egy darabjából vonunk ki. A DMY jelenléte a fenotípustól függetlenül XY (hím) egyedeket jelez, míg a DMY hiánya a fenotípustól függetlenül XX (nőstény) egyedeket jelez (23). A szövetek előkészítésére és a PCR-módszerrel történő meghatározásán a 9. függelékben található iránymutatás. A genetikai ivar tüskés pikó egyedekben történő meghatározását is PCR-módszerrel végezzük, amelyet a 10. függelék ismertet.
54. Az interszexualitás (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) előfordulását jegyzőkönyvezni kell.

Másodlagos ivari jelek

55. A másodlagos ivari jelek kialakulását az endokrin rendszer szabályozza olyan fajokban, mint például a japán fogasponty, ezért a halak fizikai megjelenésének megfigyelését lehetőség szerint az expozíció végén kell elvégezni. A japán fogasponty nőstényeinél a hátúszó hátsó részén történő papillaképződés androgénérzékeny. E melléklet C.37. fejezetében (38) a hím másodlagos ivari jelekről és androgenizált nőstényekről készült vonatkozó fényképek találhatók.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

56. Fontos, hogy a legnagyobb statisztikai erővel rendelkező érvényes próba határozza meg a végpontot. A kísérleti egység az ismétlés, de az ismétlésen belüli variabilitást is vizsgálni kell a statisztikai tesztelés során. A 8. függelékben található egy döntési folyamatábra, amely a vizsgálat eredményeként kapott adatok jellegzetességei alapján segít kiválasztani a leginkább megfelelő statisztikai próbát. A statisztikai szignifikanciaszint minden végpont esetében 0,05.

Az ivar és a genetikai ivar aránya

57. Az expozíció ivararányokra gyakorolt szignifikáns hatását (NOEC/LOEC megközelítés) monoton dóziszválasz esetén a Jonckheere–Terpstra-próbával (trendpróba) kell elemezni. Ha a válasz nem monoton, akkor páronkénti próbát kell alkalmazni a következők szerint: Ha normalitás és homogén variancia érhető el, használjuk a Dunnett-féle próbát. Heterogén variancia esetén a Tamhane–Dunnett-féle próbát használjuk. Ellenkező esetben használjuk az egzakt Mann–Whitney-féle próbát Bonferroni–Holm-féle korrekcióval. Az ivararányok statisztikáit leíró folyamatábra a 8. függelékben található. Az ivararányokat táblázatokban kell bemutatni a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan példányok koncentráció szerinti arányai \pm szórás formában. A statisztikailag szignifikáns értékeket ki kell emelni. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében található (42). A genetikai ivart a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan példányok fenotípusos ivara megfordulásának százalékában kell jegyzőkönyvezni.

VTG-koncentrációk

58. A VTG-koncentrációkat az expozíció szignifikáns hatásának (NOEC/LOEC megközelítés) kimutatása céljából kell elemezni. A Dunnett-féle próbát előnyben kell részesíteni a (Bonferroni-korrekcióval végzett) t-próbával szemben. Amennyiben Bonferroni-korrekciót alkalmazunk, a Bonferroni–Holm-féle korrekciót kell előnyben részesíteni. Lehetőség a VTG log-transzformációja a normalitás és a szóráshomogenitás elérése céljából. Ha ezt követően a koncentrációválasz monotonitással jellemezhető, a Jonckheere–Terpstra-féle próba előnyösebb, mint a fenti próbák bármelyike. Ha valamilyen t-próbát vagy Dunnett-féle próbát használunk, a továbblépéshez nem kell az ANOVA szignifikanciájának vizsgálatára F-próbát végeznünk. A részleteket lásd a 8. függelékben található folyamatábrán. Az eredményeket táblázatos formában, átlagos koncentráció \pm szórás értékben kifejezve kell bemutatni a jegyzőkönyvben, külön-külön a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan egyedek esetében. A fenotípusos nőstények és fenotípusos hímek tekintetében kapott statisztikailag szignifikáns értékeket ki kell emelni. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében található (42).

A vizsgált vegyi anyag tényleges koncentrációi

59. A vizsgált vegyi anyag tényleges kamrabeli koncentrációit a 34. pontban leírt gyakorisággal kell elemezni. Az eredményeket táblázatos formában, ismétléseenkénti, valamint koncentrációnkénti átlagos koncentráció \pm szórás értékben kifejezve kell bemutatni a jegyzőkönyvben, megjelölve a minták számát, illetve kiemelve a kezelés átlagos koncentrációja \pm 20 % tartományból kiugró értékeket. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében található (42).

Az eredmények értelmezése

60. A vizsgálati eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, ha a vizsgált vegyi anyag vizsgálati oldatokban mért koncentrációi az analitikai módszer kimutatási határértékéhez közeli értékek.

Vizsgálati jegyzőkönyv

61. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

- Lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok; a vizsgált vegyi anyag kémiai azonosító adatai, beleértve a tisztaságot és a mennyiségi meghatározására szolgáló analitikai módszert is.

Vizsgálati körülmények

- Alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. átfolyásos, félstatikus/megújítós); vizsgálati terv, beleértve a vizsgálati koncentrációkat, a törzsoldatok elkészítésének módját (mellékletben), a megújítás gyakoriságát (az oldódást segítő szert és koncentrációját is meg kell adni, ha használunk ilyet);
- Névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati kamrákban mért értékek átlagai és szórásai, valamint a módszer, amellyel ezeket az adatokat nyertük (az alkalmazott analitikai módszert mellékletben kell bemutatni); bizonyíték arra, hogy a mérések a vizsgált vegyi anyag valódi oldatban lévő koncentrációira vonatkoznak;
- Vízhinőség a vizsgálati kamrákban: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldott oxigén koncentrációja;
- A táplálásra vonatkozó részletes információk (pl. a táplálék(ok) típusa, forrása, az adagolt mennyiség) és a szennyező anyagok vizsgálatának gyakorisága (pl. PCB-k, PAH-ok és szerves klórt tartalmazó növényvédőszer), ha lényegesek.

Eredmények

- Bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az érvényességi kritériumokat: a kikelési arányra vonatkozó adatokat táblázatos formában kell bemutatni ismétlésekénti és koncentrációkénti százalékban. Az elfogadhatósági kritériumoktól kiugróan eltérő értékeket (a kontrollokban) ki kell emelni. A túlélési arányt ismétlésekénti és koncentrációkénti százalékos formában kell bemutatni. Az érvényességi kritériumoktól kiugróan eltérő értékeket (a kontrollokban) ki kell emelni.
 - A különböző megfigyelt végpontokkal kapcsolatban kapott eredmények egyértelmű megadása: az embriók túlélési aránya és a kikelés eredményessége; külső rendellenességek; testhossz és tömeg; VTG-mérések (ng/g homogenizátum, ng/ml plazma vagy ng/mg máj); ivarmirigy-szövetten, ivararány, a genetikai ivarra vonatkozó adatok; a halak szokatlan reakcióinak előfordulási gyakorisága és a vizsgált vegyi anyag által kiváltott minden látható hatás.
62. Az eredményeket átlag \pm szórás vagy standard hiba formában kell bemutatni. A minimálisan jegyzőkönyvezendő statisztikák a NOEC és a LOEC, illetve a konfidenciaintervallumok. A statisztikai folyamatábra (8. függelék) szerint kell eljárni.

SZAKIRODALOM

- (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 disruptors: 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 disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)«, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 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) E melléklet C.14. fejezete: Halivadékok növekedési vizsgálata.
- (35) E melléklet C.4. fejezete: Gyors biológiai lebonthatóság.
- (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) E melléklet C.37. fejezete: 21 napos halvizsgálat. Az ösztrogén- és androgénhatás, valamint az aromatázgátlás rövid távú szűrővizsgálata.
- (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) Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve (2010. szeptember 22.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. HL L 276., 2010.10.20., 33. o.
-

1. függelék

Rövidítések és fogalommeghatározások

Apikális végpontok: populációs szinten okoznak hatást

ASV: levegőteltettség értéke

Biomarker: az egyedek szintjén okoz hatást

Vegyianyag: anyag vagy keverék.

Dph: a kikelés utáni napok száma

DMY: a fogaspony hímek fejlődéséhez szükséges Y-specifikus DM doméngén

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)

Hal tömege: a hal nedves tömege (szárazra itatva)

FSDT: halak ivari fejlődésének vizsgálata

HPG-tengely: hypothalamus-hipofízis-gonád tengely

Interszexuális hal: olyan hal, amelyben a here hat elemzett metszetében több mint egy petesejt van jelen, vagy spermatozoon sejtek vannak jelen a petefészekben (igen/nem)

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben

MOA: hatásmechanizmus

RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció

Vizsgált vegyianyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Differenciálatlan hal: olyan hal, amelynek ivarmirigyében nincsenek észlelhető csírasejtek.

VTG: vitellogenin

2. függelék

Az FSDT kísérleti körülményei (édesvízi fajok)

1. Ajánlott fajok	Japán fogasponty (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebraadánió (<i>Danio rerio</i>)	Tüskés pikó (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. A vizsgálat típusa	Átfolyásos vagy félstatikus	Átfolyásos vagy félstatikus	Átfolyásos vagy félstatikus
3. Vízhőmérséklet	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)
5. Fényerő	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)	10–20 µE/m ² /s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)
6. Megvilágítási időszak	12–16 óra világos, 8–12 óra sötét	12–16 óra világos, 8–12 óra sötét	16 óra világos, 8 óra sötét
7. Kamra minimális mérete	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia
8. Vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x
9. Vizsgálati organizmusok életkora az expozíció elején	Újonnan megtermékenyített ikrák (korai hólyagsíra stádium)	Újonnan megtermékenyített ikrák (korai hólyagsíra stádium)	Újonnan megtermékenyített ikrák
10. Ikrák száma kezelésenként	Legalább 120	Legalább 120	Legalább 120
11. Kezelések száma	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)
12. Ismétlések száma kezelésenként	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)
13. Etetési rend	Élő <i>Artemia</i> , fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.	Különleges sült táplálék, élő <i>Artemia</i> , fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.	Élő <i>Artemia</i> , fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.

14. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 60 %-os telítettség alá esik	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 60 %-os telítettség alá esik	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 70 %-os telítettség alá esik
15. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz
16. Vizsgált vegyi anyaggal történő expozíció időtartama	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biológiai végpontok	kikelés eredményessége, túlélési arány, általános morfológia, VTG ivarmirigy-szövet-tan, genetikai ivar ivararány	kikelés eredményessége, túlélési arány általános morfológia, VTG ivarmirigy-szövet-tan, ivararány	kikelés eredményessége, túlélési arány általános morfológia, VTG ivarmirigy-szövet-tan, ivararány
18. A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai a kontrollok összevont ismétlései esetében	Kikelés eredményessége > 80 %	Kikelés eredményessége > 80 %	Kikelés eredményessége > 80 %
	Kikelés utáni túlélési arány \geq 70 %	Kikelés utáni túlélési arány \geq 70 %	Kikelés utáni túlélési arány \geq 70 %
	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 150 mg	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 75 mg	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 120 mg
	Hossz (standard hossz) > 20 mm	Testhossz (standard hossz) > 14 mm	Testhossz (standard hossz) > 20 mm
	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %

3. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

4. függelék

A C.14. Vizsgálati módszerből / Iránymutatás a vizsgálati koncentrációkhoz

Oszlop (koncentrációértékek száma 100 és 10 vagy 10 és 1 között) (*)						
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

(*) Három (vagy több) egymást követő koncentrációértéket lehet egy oszlopból kiválasztani. Az (x) oszlopban szereplő koncentrációértékek közötti középértékek a $(2x + 1)$ oszlopban találhatóak. A felsorolt értékek térfogat- vagy tömegszázalék (mg/liter vagy µg/liter) formájában kifejezett koncentrációértékeket jelenthetnek. Az értékeket adott esetben 10 bármely hatványával meg lehet szorozni vagy el lehet osztani. Az 1. oszlop adatai akkor használhatók, ha jelentős a bizonytalanság a toxicitás szintjét illetően.

5. függelék

Útmutató a fiatal a zebraadánióból, az amerikai cselléből, a tuskés pikóból és a japán fogaspontyból vett fej/farok minta homogenizációjához

E szakasz célja, hogy bemutassa a VTG-koncentráció mennyiségi meghatározását megelőző eljárásokat. A VTG összehasonlítható mennyiségi meghatározását eredményező egyéb eljárások is alkalmazhatók. A fej/farok homogenizátum helyett lehetőség van a VTG koncentrációjának vérplazmában vagy májban történő meghatározására is.

Eljárás

1. A halakat a vizsgálati leírásnak megfelelően érzéstelenítjük és elaltatjuk.
2. A halak fejét és farkát a vizsgálati leírásnak megfelelően levágjuk. **Fontos:** A boncolóeszközöket, valamint a vágódeszkát az egyes halak kezelése között le kell öblíteni és alaposan meg kell tisztítani (pl. 96 %-os etanollal), hogy megakadályozható legyen a nem indukált hímek nőtényektől vagy indukált hímektől eredő »VTG-szennyezése«.
3. Az egyes halak fejét és farkát együtt a legközelebbi mg-ra megmérjük.
4. A mérés után a testrészek megfelelő (pl. 1,5 ml-es Eppendorf) csövekbe kerülnek és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on homogenizálódásig fagyaszttjuk, vagy jégen két műanyag bibével közvetlenül homogenizáljuk azokat. (Más módszerek is használhatók, ha azokat jégen végzik, és homogén tömeget eredményeznek). **Fontos:** A csöveket megfelelően meg kell számozni, hogy a halból származó fejet és farkat össze lehessen kapcsolni az ivarmirigy-szövettanhoz használt megfelelő törzsdarabbal.
5. Amikor már elértük a homogén masszát, a szövet tömegének 4–10-szeresét kitevő mennyiségű jéghideg **homogenizáló puffert** (*) adunk hozzá (a hígítást figyelembe kell venni). Dolgozzunk tovább a bibékkel, amíg a keverék homogén nem lesz. **Fontos megjegyzés:** Minden halhoz új bibét kell használni.
6. A mintákat a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 50 000 g-vel 30 percig zajló centrifugálásig jégre tesszük:
7. A felülúszóból pipettával 20–50 μl (jegyezzük fel a mennyiséget) térfogatú adagokat vigyünk át **legalább két** csőbe úgy, hogy a pipetta csúcsát merítsük a felületen lévő zsírréteg alá és óvatosan szívjuk fel a zsír- vagy pelletfrakció nélküli felülúszót.
8. A csöveket felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk.

(*) Homogenizáló puffer:

50 mmol trisz-HCl, pH 7,4; 1 % proteázgátló koktél (Sigma): 12 ml trisz-HCl pH = 7,4 + 120 μl proteázgátló koktél (vagy azzal egyenértékű proteázgátló koktélok).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteázgátló koktél: Sigma (emlőszövetekhez) Termékszám P 8340.

Megjegyzés: A homogenizáló pufferoldatot a készítés napján fel kell használni. Használat közben helyezzük jégre

6. függelék

Útmutató a fej/farok homogenizátum vitellogenin-tartalmának mennyiségi meghatározásához zebraadánióban (*Danio rerio*) (Holbech és mtsai által módosítva, 2001.). Homológ antitesteket és standardokat használó egyéb eljárások is alkalmazhatók

1. 5 µg/ml anti zebraadánió lipovitellin-IgG-vel előzetesen bevont mikrotiterlemezeket (Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dánia) felolvasztunk és mosópufferrel (*) 3-szor megmosunk.
2. Tisztított zebraadánió vitellogenin standardot ⁽¹⁾ sorozatban 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 és 20 ng/ml-re hígítunk hígító-pufferben (**), és a mintákat hígító-pufferben legalább 200-szor hígítjuk (a mátrixhatás megakadályozása céljából), majd felvisszük a lemezekre. Egy vizsgálati kontrollt alkalmazunk két ismétlésben. 150 µl-t viszünk be minden lyukba. A standardokat két példányban, a mintákat három példányban alkalmazzuk. Inkubáljuk egy éjszakán át 4 °C-on rázógépen.
3. A lemezeket mosópufferrel (*) 5-ször lemossuk.
4. Dextránlánchoz kapcsolt HRP-t (pl. AMDEX A/S, Dánia), illetve konjugált antitesteket hígítunk fel mosópufferben; a tényleges hígítás tételenként és életkoronként különbözik. 150 µl-t viszünk be az egyes lyukakba, majd a lemezeket 1 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten, rázógépen.
5. A lemezeket mosópufferrel (*) 5-ször lemossuk, és a lemezek alját gondosan megtisztítjuk etanollal.
6. 150 µl TMB plus (***) készítményt viszünk be az egyes lyukakba. A lemezt alufóliával védjük a fénytől, és kövessük figyelemmel a szín fejlődését a rázógépen.
7. Amikor a standard görbe teljesen kialakult, az enzimaktivitást lyukanként 150 µl 0,2 M H₂SO₄ hozzáadásával leállítjuk.
8. Az abszorbanciát 450 nm-en mérjük (pl. Molecular Devices Thermomax lemezeolvasóval). Az adatok elemzése a hozzá tartozó szoftverrel történik (pl. Softmax).

(*) Mosópuffer:

PBS-törzs (****)	500,0 ml
BSA	5,0 g
Tween 20	5,0 ml

Állítsuk be a pH-t 7,3-ra és töltsük fel 5 l-re Millipore H₂O-val. 4 °C-on tároljuk.

(**) Hígító-puffer:

PBS-törzs (****)	100,0 ml
BSA	3,0 g
Tween 20	1,0 ml

Állítsuk be a pH-t 7,3-ra és töltsük fel 1 l-re Millipore H₂O-val. 4 °C-on tároljuk.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), az alábbiak szerint tisztított: 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.

(***) A TMB plus egy »használatra kész« szubsztrátum, amelyet a KemEnTec (Dánia) készít. Fényre érzékeny. 4 °C-on tároljuk.

(****) PBS törzs

NaCl 160,0 g

KH₂PO₄ 4,0 g

Na₂HPO₄ · 2H₂O 26,6 g

KCl 4,0 g

Állítsuk be a pH-t 6,8-ra és töltsük fél 2 l-re Millipore H₂O-val. Szobahőmérsékleten tárolandó.

7. függelék

Útmutató szövetszövetek ivarmeghatározás és az ivarmirigyek stádiumbeosztása céljából történő készítéséhez

E szakasz célja, hogy leírja azokat az eljárásokat, amelyek a szövettani metszetek értékelése előtt zajlanak. Hasonló ivarmeghatározást és ivarmirigy-stádiumbeosztást eredményező egyéb eljárások is alkalmazhatók.

Néhány kivételtől eltekintve az eljárások hasonlóak a japán fogaspony (JMD) és zebraadánió (ZF) esetében.

Elalattás, boncolás és szövetrogztítés

Célkitűzések:

1. A halak humánus leölése.
2. A testtömegek és mérési adatok megszerzése.
3. A másodlagos ivari jelleg értékelése.
4. Szövetek boncolása a VTG elemzése céljából.
5. Az ivarmirigyek rogztítése.

Eljárások:

1. A halakat közvetlenül a boncolást megelőzően kell elpusztítani. Ezért – kivéve, ha több boncoló áll rendelkezésre – nem szabad több halat elpusztítani egyszerre.
2. A vizsgálati kamrából kis merítőhálójával eltávolítunk egy halat, és a szállítótartályban átvisszük a boncolási területre.
3. A halat az alattóoldatba helyezzük. A halat akkor távolítjuk el az oldatból, ha a légzés megszűnt, és a hal nem reagál a külső ingerekre.
4. Megmérjük a hal nedves tömegét.
5. A szövetek VTG-elemzés céljából történő előkészítéséhez a halat egy parafalapra lehet helyezni a preparálómikroszkóp látóterében.
 - a. A zebraadánió fejét közvetlenül a mellúszó mögött vágjuk le, a farkát pedig közvetlenül a hátúszó mögött.
 - b. A japán fogaspony hasát egy gondosan elkészített, a vállövától a ventrális középvonal mentén a végbélnyílástól craniálisan elhelyezkedő pontig terjedő metszéssel felnyitjuk. A májat egy kis csipesz és egy kis olló segítségével óvatosan eltávolítjuk.
6. A VTG-análízishez vett mintákat Eppendorf-csövekbe helyezzük, és folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztjuk.
7. Az ivarmirigyeket tartalmazó test előre felcímkézett műanyag szövetskazettába kerül, amelyet Davidson- vagy Bouin-féle fixálóba helyezünk. A fixáló mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. A fixáló tartályt öt másodpercig óvatosan keverjük, hogy kimozdítsuk a légbuborékokat a kazettából.
 - a. A szövetek egy éjszakán át a Davidson-féle fixálószerben maradnak, majd a következő napon 10 % semleges pufferelt formalint tartalmazó egyedi tartályokba helyezzzük őket át. A kazettákat tartalmazó tartályokat 5 másodpercig óvatosan keverjük, hogy a formalin megfelelően átjárja a kazettákat.
 - b. A szövetek a Bouins-féle fixálóban maradnak 24 órán át, majd 70 %-os etanolba helyezzük át azokat.

A szövetek feldolgozása

Célkitűzések:

1. A szövetek kiszárítása a paraffin megfelelő behatolásának biztosításához.
2. A szövet paraffinos impregnálása a szövetek integritásának fenntartása és a metszetkészítéshez szükséges szilárd felület létrehozása céljából.

Eljárások:

3. A címkével ellátott szövetkazettákat eltávolítjuk a formalin/etanol tárolóból, és a feldolgozó kosárba (kosarakba) helyezük. A feldolgozó kosarat betöltjük a szövetprocesszorba.
4. Kiválasztjuk a feldolgozási programot.
5. Miután a szövetprocesszor befejezte a feldolgozási ciklust, a kosarat (kosarakat) át lehet vinni a beágyazó állomásra.

Beágyazás

Célkitűzés:

A példányok metszetkészítéshez megfelelő orientálása a megszilárdult paraffinban.

Eljárások:

1. A kazettákat tartalmazó kosarat (kosarakat) eltávolítjuk a processzorból, és elmerítjük a beágyazó állomás termikus konzoljának paraffinnal töltött elülső kamrájában vagy a kazettákat egy külön paraffinmelegítőbe visszük át.
2. Eltávolítjuk a beágyazandó első kazettát a termikus konzol elülső kamrájából vagy a paraffinmelegítőből. Levesszük és kidobjuk a kazetta fedelét, majd a kazetta címkéjét összevetjük az állatokra vonatkozó feljegyzésekkel, hogy az esetleges eltéréseket a beágyazás előtt rendezhessük.
3. Kiválasztunk egy megfelelő méretű beágyazó öntőformát.
4. Az öntőformát a kijuttató konzol nyílása alá tartjuk, és feltöltjük megolvadt paraffinnal.
5. A példányt eltávolítjuk a kazettából, és behelyezzük az öntőformában található olvadt paraffinba. Ezt minden paraffin öntőforma esetében 4–8 példánnyal megismételjük. Az egyes halak helyzetét azzal jelezzük, hogy az első halat a 2–4/8 halhoz képest 180 fokkal elfordítva helyezzük be.
6. További paraffint adunk hozzá, hogy befedje a példányokat.
7. Az öntőformát a kazetta aljával együtt a kriokonzol hűtőlemezére helyezzük.
8. Miután a paraffin megszilárdult, a blokkot (azaz a szöveteket tartalmazó megkeményedett paraffint és kazetta alját) eltávolítjuk a formából.

Metszetkészítés

Célkitűzés:

Szövetteni metszetek vágása és tárgylemezre ragasztása a festéshez.

Eljárások:

1. A metszetkészítés kezdeti szakaszát, az úgynevezett »facing«-et a következőképpen hajtjuk végre:
 - a. A paraffinblokkot behelyezzük a mikrotóm befogójába.
 - b. A befogót a mikrotóm kerekének forgatásával előre mozgatjuk, és vastag szeleteket vágunk le a paraffinblokk felszínéből, amíg a vágókés el nem éri a beágyazott szöveteket.

- c. A metszetvastagságot 3–5 mikron közé állítjuk be a mikrotómon. A befogót előretoljuk, és több metszetet vágunk le a blokkból, hogy eltávolítsuk a műtermékeket, amelyek a durva vágás során jöttek létre a vágási felületen.
 - d. A blokkot el lehet távolítani a befogóból, és vágófelülettel lefelé jégre lehet helyezni a szövet beáztatása céljából.
2. A metszetkészítés következő fázisa a végleges metszetek készítése és tárgylemezre rögzítése. Ezeket az eljárásokat a következő módon végezzük:
- a. Ha a blokkot jégre helyeztük, akkor eltávolítjuk a jégről, és visszahelyezzük a mikrotóm befogójába.
 - b. A mikrotóm szeletvastagságát 3–5 mikronra állítva a befogót a mikrotóm kerekének forgatásával előre mozgatjuk. Metszeteket vágunk le a blokkból mindaddig, amíg egy olyan »szalagot« nem állítunk elő, amely legalább egy elfogadható, az ivarmirigyeket is magában foglaló metszetet tartalmaz. (Szükség esetén a szeletelés során a blokkot el lehet távolítani a befogóból, és jégre tenni a szövet beáztatása céljából, majd visszatenni a befogóba.)
 - c. A metszeteket a vízfürdőben lévő víz felszínén lebegtetjük. Megkísérlünk legalább egy olyan metszetet készíteni, amely nem tartalmaz gyűrődéseket és nincs alatta levegőbuborék.
 - d. A mikroszkóplemezt a legjobb metszet alá merítjük, és a tárgylemezzel kiemeljük a vízből. Ezt a folyamatot nevezik a metszet tárgylemezre való »ragasztásának«.
 - e. Egy haltételből három metszetet készítünk. A második és harmadik metszetet az első metszetet követő 50 mikronos intervallumonként készítjük. Ha a halak nem úgy lettek beágyazva, hogy az ivarmirigyek ugyanazon a metszészinten legyenek, több metszetet kell készíteni annak érdekében, hogy legalább hat olyan metszetet nyerjünk minden egyes halból, amelyek tartalmazzák az ivarmirigyeket.
 - f. A tárgylemezre megfelelő filctollal ráírjuk annak a blokknak a számát, amelyből a tárgylemez készült.
 - g. A tárgylemezt egy festőállványba helyezzük.
 - h. A blokkot eltávolítjuk a befogóból és vágófelülettel lefelé helyezzük tárolás céljából.

Festés, fedőlemez ráhelyezése és a tárgylemez felcímkézése

Célkitűzések:

- A metszetek kórszövettani vizsgálathoz történő megfestése.
- A felragasztott és festett szövetek tartós lezárása.
- A megfestett metszetek tartós azonosítása olyan módon, amely lehetővé teszi a teljes nyomonkövethetőséget.

Eljárások:

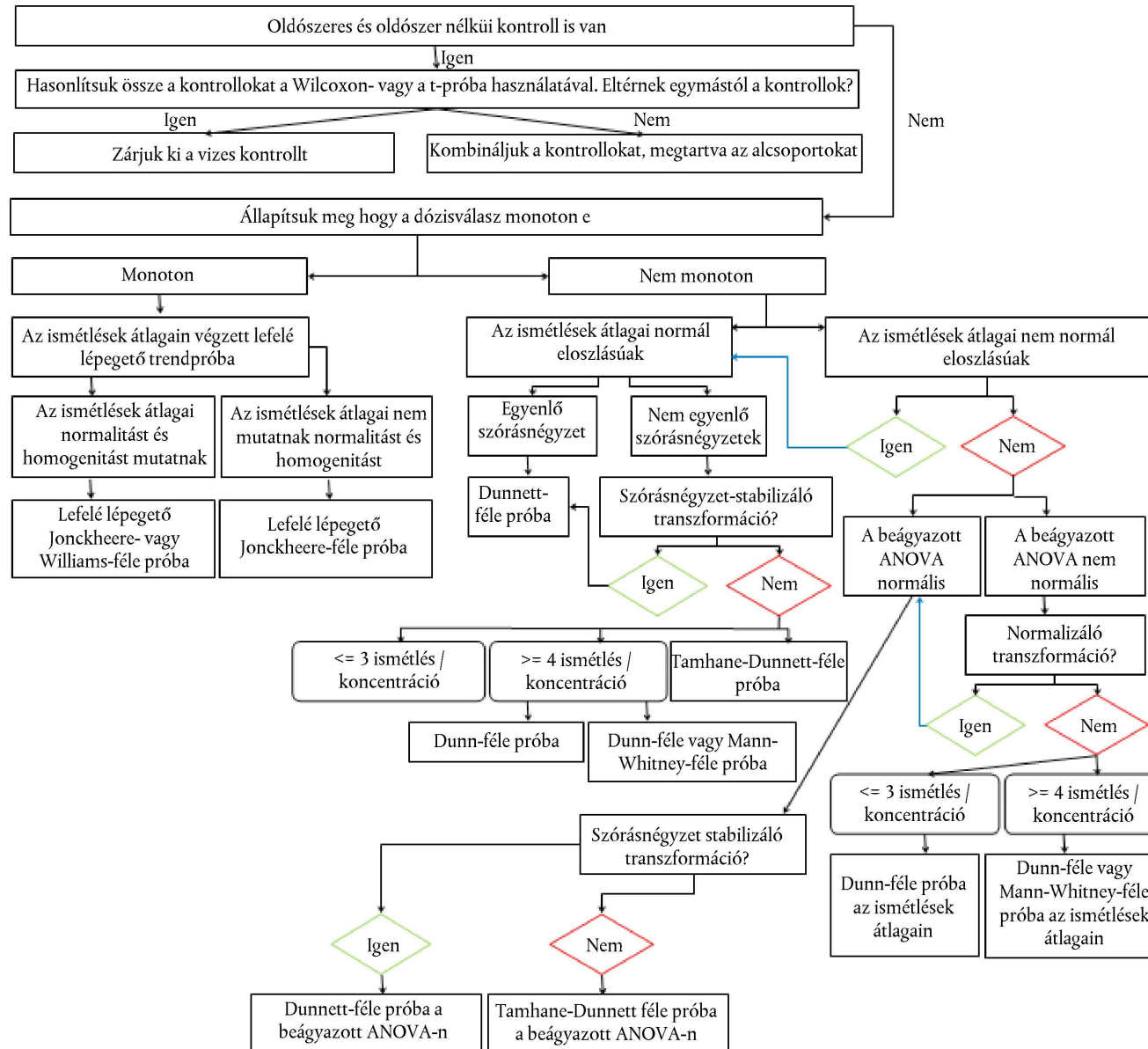
1. Festés
 - a. A metszeteket festés előtt egy éjszakán át levegőn szárítjuk.
 - b. A metszeteket hematoxilin-eozinnal megfestjük.
2. A fedőlemez ráhelyezése
 - a. A fedőlemezeket manuálisan vagy automatikusan lehet ráhelyezni.
 - b. A tárgylemezt xilolba vagy TissueClear készítménybe mártjuk, és a felesleges xilolt/TissueClear készítményt finoman leütögetjük a tárgylemezről.
 - c. Körülbelül 0,1 ml ragasztóközeget viszünk fel a tárgylemez matt végével ellentétes vége közelében, vagy a fedőlemezre.
 - d. A fedőlemezt lapos szögben megdöntjük, és ráhelyezzük a tárgylemezre.

3. Címkézés

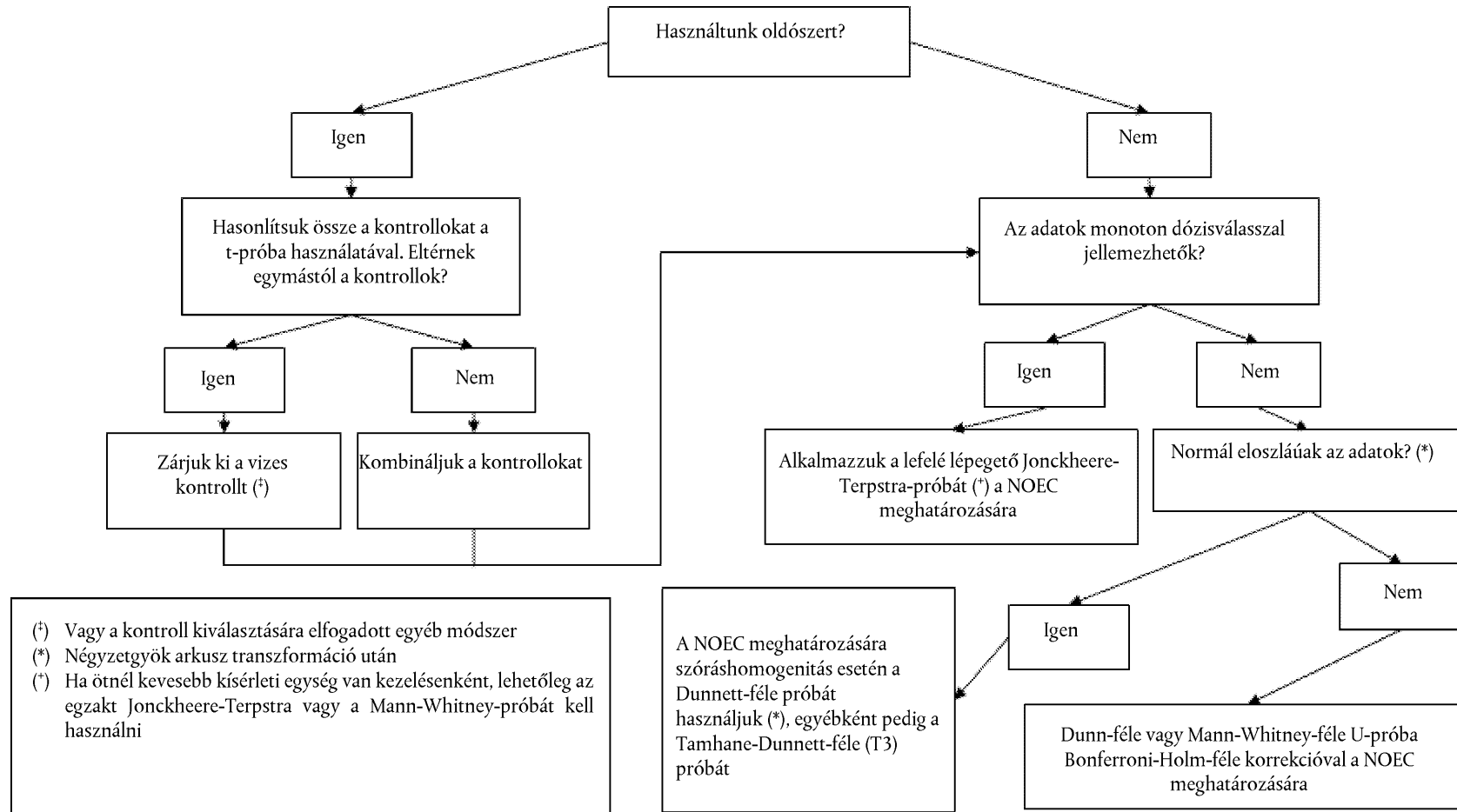
a. A tárgylemez címkéjének a következő információkat kell tartalmaznia.

- i. Laboratórium neve
 - ii. Faj
 - iii. Példány száma / Tárgylemez száma
 - iv. Vegyi anyag / Kezelési csoport
 - v. Dátum
-

Statistikai folyamatábra a vitellogenin elemzéséhez



Statistikai folyamatábra az ivararány elemzéséhez



(†) Vagy a kontroll kiválasztására elfogadott egyéb módszer
 (*) Négyzetgyök arkusz transzformáció után
 (†) Ha ötnél kevesebb kísérleti egység van kezelésenként, lehetőleg az egzakt Jonckheere-Terpstra vagy a Mann-Whitney-próbát kell használni

A NOEC meghatározására szóráshomogenitás esetén a Dunn-féle próbát használjuk (*), egyébként pedig a Tamhane-Dunn-féle (T3) próbát

Dunn-féle vagy Mann-Whitney-féle U-próba Bonferroni-Holm-féle korrekcióval a NOEC meghatározására

9. függelék

Útmutató a genetikai ivar meghatározásához és a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározását célzó szöveti mintavételhez**Szöveti mintavétel, előkészítés és tárolás a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározásához fogaspontyban (Készítette: a Bayer CropScience AG vízi élőlények laboratóriuma)**

1. Finom ollóval levágjuk a halak farokuszóját vagy hátuszóját és egy 100 µl extrakciós puffer 1-gyel (a puffer előállításának részleteit lásd alább) megtöltött csőbe helyezük. Az ollót minden hal után megtisztítjuk desztillált H₂O-val megtöltött pohárban, és papírkendővel szárazra töröljük.
2. Az úszók szöveteit a sejtek lízise céljából microcsöves teflon bibével homogenizáljuk. Minden csőhöz új bibét használunk a szennyeződés elkerülése érdekében. A bibét éjszakára 0,5 mólos NaOH-oldatba helyezük, majd 5 percig öblítjük desztillált H₂O-val, és felhasználásig etanolban vagy autoklávozás után sterilen tároljuk.
3. Az úszók szöveteit extrakciós puffer 1. nélkül is tárolni lehet szárazjégen, majd – 80 °C-on fagyasztoóban a DNS degenerációjának megelőzése érdekében. De az extrakció eredményesebb, ha a DNS-t ugyanakkor vonjuk ki (a kezelést lásd fent; a mintákat a – 80 °C-on történő tárolás után a puffercsövekbe való betöltés előtt jégen fel kell olvasztani).
4. Homogenizálás után a csövek vízfürdőbe kerülnek és 100 °C-on 15 percig forraljuk azokat.
5. Ezután minden csőbe 100 µl extrakciós puffer 2-t (a puffer előállításának részleteit lásd alább) pipettázunk. A mintákat 15 percig szobahőmérsékleten tároljuk és időnként kézzel óvatosan összerázzuk.
6. Ezt követően a csöveket újra vízfürdőbe helyezük, és 100 °C-on további 15 percen át forraljuk.
7. További elemzésig a csöveket – 20 °C-on lefagyasztojuk.

A puffer készítése

PCR-puffer 1.:

500 mg N-lauroil-szarkozin (pl. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5 mólos NaCl

deszt. H₂O ad 100 ml

→ autoklávozás

PCR-puffer 2.:

20 g Chelex (pl. Biorad, München, Németország)

Megduzzasztás 100 ml deszt. H₂O-ban

→ autoklávozás

A genetikai ivar meghatározása (PCR-módszer) fogaspontyban (készítette: a Bayer CropScience AG vízi élőlények laboratóriuma és az Universität Würzburg Biozentrum)

Az elkészített és lefagyasztozott csöveket (a fenti szakaszban leírtak szerint) jégen felolvasztjuk. Ezt követően Eppendorf-centrifugában lecentrifugáljuk őket (30 mp max. sebességen, szobahőmérsékleten). A PCR-hez a csapadéktól elválasztott tiszta felüliszó kerül felhasználásra. Feltétlenül el kell kerülni azt, hogy a Chelex nyomait (a csapadékban található) átvigyük a PCR-reakcióba, mert az zavarja a »Taq«-polimeráz aktivitását. A felüliszót közvetlenül felhasználjuk vagy fagyasztova tárolható (– 20 °C-on) és több ciklusban újra felolvasztható anélkül, hogy az a későbbi elemzések során negatív hatással lenne a DNS-re.

1. A »reakciókeverék« elkészítése (25 µl mintánként):

	Térfogat	Végző koncentráció
DNS-templát	0,5–2 µl	
10xPCR-puffer MgCl ₂ -dal	2,5 µl	1x
Nukleotidok (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mmol)	200 µmol
Forward primer (10 µmol) (lásd alább 3-5)	0,5 µl	200 nmol
Reverz primer (10 µmol) (lásd alább 3-5)	0,5 µl	200 nmol
DMSO	1,25 µl	5 %
Víz (PCR tisztaságú)	25 µl-re	
Taq E-polimeráz	0,3 µl	1,5 U

10xPCR-puffer MgCl₂-dal: 670 mmol trisz/HCl (pH 8,8 25 °C-on), 160 mmol (NH₄)₂SO₄, 25 mmol MgCl₂, 0,1 % Tween 20

Minden PCR-hez (lásd alább 3-5) a »reakciókeverék« új kombinációjaként a speciális primerre, valamint az egyes mintákhoz szükséges DNS-templát megfelelő mennyiségére (lásd fent) van szükség. Az egyes térfogatokat pipettával vesszük át az új csövekbe. Ezután a csöveket lezárjuk, összekeverjük (körülbelül 10 másodpercig) és centrifugáljuk (10 mp, szobahőmérsékleten). Ekkor elindíthatók a megfelelő PCR-programok. Ezen kívül az egyes PCR-programokban egy pozitív kontrollt (ismert aktivitású és egyértelmű eredményeket adó DNS-minta) és egy negatív kontrollt (1 µl deszt. H₂O) is használunk.

2. Az agaróz gél (1 %) elkészítése – A futó PCR-programok alatt:

- Oldjunk fel 3 g agarózt 300 ml 1 × TAE-pufferben (1 %-os agaróz gél)
- Ezt az oldatot mikrohullámmal fel kell forralni (kb. 2-3 perc)
- Töltsük át a forró oldatot egy jégre fektetett speciális öntődobozba
- Kb. 20 perc múlva az agaróz gél használatra kész
- Az agaróz gélt 1 × TAE-pufferben tároljuk a PCR-programok végéig

3. Aktin PCR-program:

Ennek a PCR-reakciónak a célja annak bizonyítása, hogy a mintában lévő DNS nem sérült.

— Speciális primer:

»Mact1(felső/forward)« → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

»Mact2(alsó/reverz)« → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (35-ször):

Denaturáció → 45 mp 95 °C-on

Kapcsolódás → 45 mp 56 °C-on

Lánchosszabbítás → 1 perc 68 °C-on

15 perc 68 °C

4. X- és Y-gén PCR-program:

Ebben a PCR-programban a sértetlen DNS-t tartalmazó mintákat használjuk az X- és Y-gének kimutatására. A hím DNS-nek dupla sávot kell mutatnia, a nőstény DNS-nek pedig egyetlen sávot (festés és gélelektroforézis után). Ebbe a programba egy pozitív kontrollt kell bevonnunk a hímek (XY-minta) és egy pozitív kontrollt a nőstények (XX-minta) részére.

— Speciális primer:

»PG 17.5« (felső/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

»PG 17.6« (alsó/reverz) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (40-ször):

Denaturáció → 45 mp 95 °C-on

Kapcsolódás → 45 mp 55 °C-on

Lánchosszabbítás → 1 perc 30 mp 68 °C-on

15 perc 68 °C

5. Y-gén PCR-program az X- és Y-gén PCR-program »kontrolljaként«:

Ez a PCR-program az »X- és Y-gén PCR-program« eredményeit ellenőrzi. A »hím mintáknak« egy sávot kell mutatniuk, a »nőstény minták« pedig nem mutathatnak semmilyen sávot (festés és gélelektroforézis után).

— Speciális primer:

»DMTYa (felső/forward)« → GGC CGG GTC CCC GGG TG

»DMTYd (alsó/reverz)« → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (40-szer):

Denaturáció → 45 mp 95 °C-on

Kapcsolódás → 45 mp 56 °C-on

Lánchosszabbítás → 1 perc 68 °C-on

15 perc 68 °C

6. A PCR-minták festése:

Festékkoldat:

50 % glicerin

100 mmol EDTA

1 % SDS

0,25 % bromofenolkék

0,25 % xilén-cianol

Minden csőbe pipetázzunk 1 µl festékkoldatot

7. Kezdjük meg a gélelektroforézist:

— Az elkészített 1 %-os agaróz gélt áttöltjük egy 1 × TAE-pufferrel töltött gélelektroforézis-kádba

— Minden festett PCR-mintából 10–15 µl mennyiséget pipetázzunk egy agarózgél-zsebbe

- Az 1kb-»létrából« (Invitrogen) is 5–15 µl-t pipettázunk egy külön zsebbe
 - Indítsuk el az elektroforézist 200 V-tal
 - 30–45 perc múlva állítsuk le
8. *A sávok meghatározása:*
- Tisztítsuk le az agaróz gélt desztillált H₂O-ban
 - Most 15–30 percre tegyük át az agaróz gélt etídium-bromidba
 - Ezután az agaróz gélt egy UV-fénydobozban le kell fényképezni
 - Végül a mintákat a pozitív kontroll sávval (vagy sávokkal) és a létrával összehasonlítva elemezzük
-

10. függelék

Útmutató a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározását célzó szöveti mintavételhez tüskés pikóban**Szöveti mintavétel és DNS-kivonás**

A DNS-t különböző kereskedelmi forgalomban kapható reagensek, valamint kézi és automatikus extrakciós berendezések segítségével lehet kivonni. Az alábbiakban a Cefas Weymouth laboratórium által alkalmazott protokoll kerül bemutatásra, adott esetben az alternatív megközelítések hozzáadásával.

1. Finom ollóval kis darab szövetet (10–20 mg) metszünk ki a halak testének dorsolaterális részéből (a fej és a farok VTG-elemzés céljából történt eltávolítása után). A szövetet egy csőbe tesszük, és közvetlenül folyékony nitrogénbe helyezzük (– 80 °C-on történő tárolás céljából), vagy feltöltjük 70 %-os etanollal (szállítás és azt követő 4 °C-on történő tárolás céljából). Az ollót minden egyes hal után 70 %-os etanolban, majd desztillált vízben megtisztítjuk és törőpapírral megszáritjuk.
2. Az etanolt (ha jelen van) kiszívjuk, és a szövetet egy éjszakán át 400 µl ATL-pufferben (Qiagen) proteináz K-val emésztjük. Az emésztmény egy alikvotját (200 µl) átviszük egy 96 lyukú S-blokkba (Qiagen), és a DNS-t 96 lyukas formátumban kivonjuk a Qiagen Universal BioRobot és a QIamp Investigator BioRobot készlet használatával. A DNS-t 50 µl DNáz- és RNáz-mentes vízben eluáljuk. Ha kemény szövetet használunk a DNS kivonására (például gerincet vagy mellúszót), szükség lehet a minta lízis pufferben való homogenizálására, amely célra a FastPrep® szövetoldót vagy azzal egyenértékű szövetbontó rendszert lehet használni.

Alternatív megoldásként

- a) a szövetet egy éjszakán át proteináz K-val emésztjük 400 µl G2 lízis pufferben (Qiagen), és a DNS-t az emésztmény 200 µl mennyiségéből vonjuk ki vagy az EZ-1 DNA easy tissue kit és az EZ-1 biorobot, vagy a DNA easy tissue mini kit segítségével. A DNS-t 50 µl térfogatban eluáljuk.
 - b) A szöveteket DNAzol reagens alkalmazásával dolgozzuk fel. Röviden, a szövetmintákat 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe töltött 1 ml DNAzol-ban 10 percig lizáljuk, majd a szemcsés anyag eltávolítása céljából 13 000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk. A lizált mintát ezután áttöltjük egy új 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe, amely 500 µl 100 %-os molekuláris tisztaságú etanol tartalmaz, majd a DNS kicsapatása céljából 13 000 rpm-en 10 percig centrifugáljuk. Az etanolt eltávolítjuk és a helyébe 400 µl 70 %-os molekuláris tisztaságú etanolt töltünk, 13 000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk, és a DNS-üledéket feloldjuk 50 µl molekuláris DNáz- és RNáz-mentes vízben. Ismételtén, ha kemény szövetet használunk (mellúszó), szükség lehet a minta lízis pufferben való homogenizálására, amely célra a DNS kivonása előtt FastPrep® szövetoldót vagy azzal egyenértékű szövetbontó rendszert lehet használni.
3. A DNS-t felhasználásig – 20 °C-on tároljuk.

Fontos megjegyzés: az eljárások során kesztyű viselése kötelező.

Polimeráz lánreakció (PCR) analízis

Az amplifikálást 2,5 µl DNS-kivonattal 50 µl reakcióterefogatban végezzük Idh lokusz primerek használatával (a Peichel és mstai által leírtak szerint, 2004. Current Biology 1: 1416-1424):

Forward primer 5 'GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Reverz primer 5 'TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

A megfelelő PCR-reagenseknek számos szállítója van. Az alábbiakban bemutatott módszer a Cefas Weymouth laboratóriumban jelenleg használt módszer.

1. A »reakciókeverék« elkészítése (50 µl mintánként):

Egy mesterkeveréket állítunk elő a következőképpen. Ezt előre is el lehet készíteni és a felhasználásig – 20 °C-on fagyaszta tárolni. Elegendő mesterkeveréket készítünk egy negatív kontrollhoz (csak molekuláris biológiai tisztaságú víz).

	Térfogat (törzs konc.) / minta	Végső koncentráció
5xGoTaq® reakciópuffer	10 µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mmol)	2,5 mmol
Nukleotidok (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (mindegyik 25 mmol)	mindegyik 250 µmol
Forward primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Reverz primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Molekuláris biológiai tisztaságú víz	30,75 µl	
GoTaq polimeráz	0,25 µl	1,25 U

- Töltsünk 47,5 µl mesterkeveréket egy felcímkézett 0,5 ml-es vékonyfalú PCR-csőbe.
- Adjunk hozzá 2,5 µl tisztított DNS-t a megfelelően felcímkézett csőhöz. Ismételjük meg ugyanezt a folyamatot az összes mintánál és a negatív kontrollnál is.
- Töltsünk a tetejére 2 csepp ásványi olajat. Alternatívaként fűtött fedelű hőciklizálót is használhatunk.
- Zárjuk le a fedeleket.
- A mintákat Peltier PTC-225 hőciklizálóban 94 ± 2 °C-on 5 percig denaturáljuk, majd 39 ciklus következik 94 ± 2 °C-on 1 percig, 55 ± 2 °C-on 1 percig, 72 ± 2 °C-on 1 percig, és egy végső lánchosszabbítás 72 ± 2 °C-on 10 percig.

2. Az agaróz gél (2 %) elkészítése:

A PCR-termékeket hagyományosan etídium-bromidot tartalmazó 20 %-os agaróz gélen futtatjuk meg.

Kapilláris alapú elektroforézis rendszerek is használhatók.

- Mérjünk 2 g agarózt 100 ml 1 × TAE-pufferbe.
- Melegítsük mikrohullámban (kb. 2-3 percig) az agaróz feloldása érdekében.
- Adjunk hozzá 2 csepp etídium-bromidot; végső koncentráció 0,5 µg/ml.
- Töltsük a forró oldatot a gélöntő berendezésbe.
- Hagyjuk a gél megkeményedni.

3. Gélelektroforézis:

- Vigyük át az agaróz gél az elektroforézis berendezésbe és merítsük 1 × TAE-pufferbe.
- Töltsünk minden mintából 20 µl-t külön zsebbe, egy tartalék zsebbe molekulatömeg markert (100bp DNS létra, Promega) adva.
- Az elektroforézist 120 V-on 30–45 percig végezzük.

4. Az amplifikációs termékek láthatóvá tétele

Ha az ethidium-bromidot a fent leírt módon belefoglaltuk az agaróz gélbe, a DNS-termékeket UV-fényforrás alatt lehet láthatóvá tenni. Alternatív megoldásként az agaróz gélt úgy is meg lehet festeni, hogy a gélt 30 perccel a megjelenítés előtt etidium-bromid híg oldatával (0,5 µg/ml, vízben) lefedjük.

11. függelék

Útmutató a tüskés pikó mesterséges megtermékenyítési eljárásához

E szakasz célja, hogy leírja azokat a eljárásokat, amelyek segítségével megtermékenyített ikrák nyerhetők tüskés pikóból az FSDT-ben történő felhasználás céljára.

Eljárások

A hímek spermájának kinyerése

1. Egy, a kívánt populációból származó jól színezett hímét túlaltatunk.
2. A heréket a hal mindkét oldaláról kimetszük. *A herék általában erősen pigmentált, pálcika alakú struktúrák, amelyek kitűnnek a test oldalsó középvonalában.* Az alábbi módszerek egyikét használjuk:
3. Finom ollóval készítsünk egy 1–1,5 cm hosszú bemetszést a kloákától kezdődően egyetlen, körülbelül 45 fokos szögben döntött vágással.
4. Szikével készítsünk egy kis bemetszést a hal oldalában a medencétől kissé posterior irányban és a laterális lemezeketől kissé ventrálisan.
5. A heréket finom csipesszel távolítjuk el és Petri-csészébe helyezzük.
6. Minden herét 100 µl frissen készült **Hank-féle végső oldattal** (*) kell befedni.
7. A heréket borotvapengével vagy szikével apró kockákra vágjuk. Ez felszabadítja a spermát, és tejszerű megjelenést kölcsönöz a Hank-féle oldatnak.
8. A spermát tartalmazó folyadékot egy csőbe töltjük, miközben el kell kerülni, hogy a hereszövet darabjai bekerüljenek a pipettába.
9. 800 µl Hank-féle végső oldatot töltünk a csőbe, és jól összekeverjük.
10. Szükség esetén a hím állatot 100 %-os etanollal vagy más fixálóval lehet konzerválni. Ez különösen fontos akkor, ha a vizsgálat az utódokhoz hozzárendeli a szülői eredetet.

(*) Hank-féle pufferolt sóoldat (HBSS):

A HBSS-re a spermának a megtermékenyítésre való felkészülés alatti megőrzéséhez van szükség.

Fontos megjegyzés: Bár a legtöbb előírt törzsoldatot előre is el lehet készíteni, az **5. törzsoldatot** és ezt követően a **végső oldatot** frissen, a felhasználás napján kell készíteni.

1. törzsoldat

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Desztillált víz (DW):	100 ml

2. törzsoldat

Na ₂ HPO ₄ (vízmentes)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DW	100 ml

3. törzsoldat

CaCl ₂	0,72 g
DW	50 ml

4. törzsoldat

MgSO₄·7H₂O 1,23 g

DW 50 ml

5. törzsoldat (frissen készített)

NaHCO₃ 0,35 g

DW 10 ml

Megjegyzések: Ha a fenti sókból néhány már rendelkezésre áll, de eltérő víztartalommal (pl. 2H₂O vízmentes helyett), akkor azt használni lehet, de a tömeget a molekulásúly alapján előbb korrigálni kell.

A Hank-féle végső oldathoz a törzsoldatokat a következő sorrendben kell egyesíteni:

1. törzsoldat 1,0 ml

2. törzsoldat 0,1 ml

3. törzsoldat 0,1 ml

DW 8,6 ml

4. törzsoldat 0,1 ml

5. törzsoldat 0,1 ml

Használat előtt alaposan keverjük össze.

Megtermékenyítés

1. Nagy, gravid nőstényeket azonosítunk be a kívánt populációban; a nőstények csak akkor állnak készen a kiprészelésre, ha kitüremkedő peték láthatók a kloákában. A készen álló nőstények jellegzetes »fejjel felfelé« testtartást mutatnak.
2. Óvatosan futtassuk végig egy ujjunkat vagy a hüvelykujjunkat a hal oldalán a farok irányába, hogy elősegítsük egy ikraszák kilökődését a friss Petri-csészébe. Ismételjük meg a másik oldalon, és tegyük vissza a halat a tartályba.
3. Az ikrákat egy finom ecsettel szét lehet teríteni (hogy egy réteget képezzenek). Fontos, hogy a lehető legtöbb ikrát tegyük ki a spermának, ezért hasznos az ikrafelület maximumra növelése. Fontos megjegyzés: Helyezzünk nedves textilt az ikrák köré, hogy nedvesen tartsa azokat (fontos, hogy az ikrák ne érintkezzenek közvetlenül a vízzel, mert az idő előtt megkeményíti a choriont, ami megakadályozza a megtermékenyítést). Nagy a változékonyság azon a téren, hogy egy nőstény mennyi ikrát képes termelni, de átlagosan mintegy 150 ikrát kell nyerni egy gravid nősténytől.
4. A Hank-féle keverékben elkevert 25 µl spermiumot ecset segítségével egyenletesen szétoszlatjuk az ikrák egész felületén. Ha megkezdődött a megtermékenyítés, a peték gyorsan megkeményednek és megváltozik a színük (egy percen belül). Ha a peték becsült száma meghaladja a 150-et, ismételjük meg az eljárást. Ha a peték nem keményednek meg egy percen belül, adjunk hozzá egy kicsivel több spermát. Fontos megjegyzés: Több sperma hozzáadása nem feltétlenül javítja a megtermékenyítési arányt.
5. A petéket és a spermiumoldatot legalább 15 percig kell hagyni egymásra hatni, és a megtermékenyített petéket 1,5 órával a megtermékenyítés után az expozíciós akváriumokba kell helyezni.
6. Az eljárást megismételjük egy másik nősténnyel, amíg össze nem gyűjtjük a kívánt számú ikrát.
7. Az utolsó tételből tegyünk félre pár ikrát, és rögzítsük 10 %-os ecetsavban.

Az ikrák számolása és szétosztása a vizsgálati akváriumokba

1. Az ikrákat egyenletesen kell elosztani az egyes kezelési szintek között, hogy megelőzhető legyen a genetikai torzítás. A megtermékenyített ikrák tételeit egy tompa eszköz használatával (azaz széles szárú rovartani csipesszel vagy oltóhurokkal) azonos méretű csoportokra kell bontani (annyira, ahány kezelési szint van). Ha a kezelésenkénti 4 ismétlést célzozzuk meg ismétlésenként 20 ikrával, akkor expozíciós akváriumonként 80 ikrát kell szétosztani. Fontos megjegyzés: Célszerű további 20 % ikrát hozzáadni (azaz kezelési szintenként 96 ikra legyen), amíg nem vagyunk biztosak benne, hogy 100 %-os megtermékenyítési arányt fogunk elérni.
2. A tüskés pikó ikrái az apák által őrzött fészkeken kívül nagyon fogékonyak a gombás fertőzésekre. Emiatt rendkívül fontos az ikrák metilénkével való kezelése a vizsgálat első 5 napja alatt. 1 mg/ml koncentrációjú metilénkék törzsoldatot készítünk és hozzáadjuk az expozíciós akváriumokhoz, hogy 2,125 mg/l maximális végső koncentrációt kapjunk. Fontos megjegyzés: A tüskés pikót a kikelés után nem szabad metilénkének kitenni, a rendszernek a 6. naptól metilénkéktől mentesnek kell lennie.
3. Az ikrákat naponta megvizsgáljuk, és az elpusztult vagy meg nem termékenyült ikrákat feljegyezzük. Fontos megjegyzés: Az ikrák a kikelésig soha nem lehetnek vízen kívül, még nagyon rövid időre sem.

C.42. BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG TENGERVÍZBEN

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 306. vizsgálati iránymutatásában (1992) leírt módszerrel. Amikor az eredeti vizsgálati módszereket kidolgozták, nem volt ismert, hogy az édesvizet, illetve oltóanyagként kibocsátott szennyvizet vagy eleveniszapot használó gyors biológiai lebonthatósági szűrővizsgálat eredményei milyen mértékben alkalmazhatók a tengeri környezetre. Ebben a kérdésben eltérő eredményekről számoltak be (pl. (1)).
2. Számos – különféle vegyi anyagokat tartalmazó – ipari szennyvíz eléri a tengert, akár közvetlen kibocsátás, akár a folyótorkolatok és a folyók útján, amelyekben a tartózkodási idő rövid ahhoz viszonyítva, mint amennyi idő a jelen lévő számos vegyi anyag teljes biológiai lebomlásához szükséges. Az egyre növekvő felismerés alapján, hogy szükség van a tengeri környezet védelmére a fokozódó vegyianyag-terhelés ellen, illetve hogy szükség van a vegyi anyagok valószínűsíthető tengerbeli koncentrációinak becslésére, vizsgálati módszereket dolgoztak ki a tengervízben történő biológiai lebonthatóság vizsgálatára.
3. Az itt leírt módszerek természetes tengervízet használnak vizes fázisként és a mikroorganizmusok forrásaként egyaránt. Az édesvízi gyors biológiai lebonthatósági módszerekhez való igazodás érdekében megvizsgálták az ultrafiltrált és centrifugált tengervíz használatát, illetve a tengeri üledékek oltóanyagként való használatát is. Ezek a vizsgálatok nem vezettek eredményre. A vizsgálati közeg ezért természetes tengervíz, amelyet a durvaszemcsés részecskék eltávolítása érdekében előkezelünk.
4. A biológiai lebonthatóság lombikrázásos módszerrel történő értékelése érdekében a vizsgált anyag viszonylag magas koncentrációját kell használni az oldott szerves szén (DOC) analitikai módszerének gyenge érzékenysége miatt. Ez viszont szükségessé teszi, hogy a tengervízhez ásványi anyagokat (N és P) adjunk, amelyek alacsony koncentrációja egyébként korlátozná a DOC eltávolítását. A vizsgált anyag koncentrációja miatt a zárt palack módszer esetében is szükséges a tápanyagok hozzáadása.
5. Ezért ezek a módszerek nem a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálati, mivel a tengervízben már jelen lévő mikroorganizmusokon felül semmilyen inokulum hozzáadására nem kerül sor. A vizsgálatok a tengeri környezetet sem szimulálják, mivel tápanyagokat adunk hozzá, illetve a vizsgált anyag koncentrációja sokkal magasabb, mint amilyen a tengerben lenne. Ezen okok miatt a módszereket egy új alszakaszban – »Biológiai lebonthatóság tengervízben« – javasoljuk.

ALKALMAZÁS

6. A vizsgálatok – amelyeket azért végzünk, mert az érintett anyag felhasználási mintája és ártalmatlanítása a tengerbe vezető útvonalat jelzett – eredményei első közelítést nyújtanak a tengervízben történő biológiai lebonthatósággal kapcsolatban. Ha az eredmény pozitív (> 70 % DOC eltávolítása; > 60 % elméleti oxigénigény [EOI]), abból arra lehet következtetni, hogy fennáll a tengeri környezetben történő biológiai lebomlás lehetősége. Ugyanakkor a negatív eredmény nem zárja ki ezt a lehetőséget, de azt jelzi, hogy további vizsgálatok szükségesek, például a vizsgált anyag lehetséges legalacsonyabb koncentrációjának használatával.
7. Mindkét esetben, ha egy adott helyszínen határozottabb értékre van szükség a tengervízben történő biológiai lebomlás aránya és mértéke tekintetében, egyéb összetettebb és bonyolultabb – és így költségesebb – módszereket kell alkalmazni. Például szimulációs vizsgálatot lehet végezni a vizsgált anyag olyan koncentrációja alkalmazásával, amely lényegesen közelebb áll a várható környezeti koncentrációhoz. Az érdeklődésre számot tartó helyről vett, ásványi sók hozzáadása nélküli, nem előkezelt tengervíz is lehet használni, és az elsődleges biológiai lebomlást specifikus kémiai elemzés követheti. A biológiai lebonthatóság végső vizsgálatához ^{14}C -vel jelzett anyagokra lenne szükség, hogy az oldható szerves ^{14}C eltűnése és $^{14}\text{CO}_2$ termelése valóságos környezeti koncentrációkon legyen mérhető.

AZ ALKALMAZOTT MÓDSZER MEGVÁLASZTÁSA

8. Az alkalmazandó módszer kiválasztása számos tényezőtől függ; az alábbi táblázat célja, hogy segítsen a választásban. Míg a körülbelül 5 mg C/l alatti vízoldhatóságú anyagokat – legalábbis elvben – nem lehet a lombikrázásos módszerrel vizsgálni, a zárt palack módszerrel a rosszul oldódó anyagok is vizsgálhatók.

Táblázat

A lombikrázásos és a zárt palack módszer előnyei és hátrányai

MÓDSZER	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
LOMBIKRÁZÁS	<ul style="list-style-type: none"> — egyszerű készülékek, kivéve a C-analizátort — a 60 napos időtartam nem probléma — nem zavarja a nitrifikáció — adaptálni lehet az illékony anyagokhoz 	<ul style="list-style-type: none"> — C-analizátorra van szükség — 5–40 mg DOC/l-t használ fel, gátló hatású lehet — nehéz a DOC meghatározása alacsony koncentrációkon a tengervízben (klorid-hatás) — a DOC időnként magas a tengervízben
ZÁRT PALACK	<ul style="list-style-type: none"> — egyszerű készülékek — egyszerű végű meghatározás — a vizsgált anyag alacsony koncentrációját használja (2 mg/l), így kisebb a gátlás esélye — könnyen adaptálható illékony anyagokhoz 	<ul style="list-style-type: none"> — esetenként nehéz fenntartani a palackok légmentes zárását — a baktériumok falon való növekedése hamis értékekhez vezethet — a vak O₂-felvételi értékek magasak lehetnek, különösen 28 nap elteltével; a tengervíz érlelésével megoldható — lehetséges zavaró hatás a nitrifikáció O₂-felvétele miatt

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a módszer az e melléklet C.4B. fejezetében leírt módosított OECD-szűrővizsgálat tengervízre adaptált változata (2). A módszert a Danish Water Quality Institute által az Európai Bizottság (EB) részére szervezett körvizsgálat eredményeként véglegesítették (3).
2. A kapcsolódó tengervízes zárt palack módszerrel megegyezően e vizsgálat eredményeit sem szabad a gyors biológiai lebonthatóság mutatóiként kezelni, hanem kifejezetten az anyagok tengeri környezetben való biológiai lebonthatóságára vonatkozó információk megszerzésére kell használni.

A MÓDSZER ELVE

3. A vizsgált anyag előre meghatározott mennyiségét feloldjuk a vizsgálati közegben, hogy 540 mg/l oldott szerves szén (DOC) koncentrációt kapjunk. Ha a szerves szén elemzések érzékenységi határa javul, előnyös lehet a vizsgált anyagok alacsonyabb koncentrációinak használata, különösen a gátló hatású anyagok esetében. A vizsgált anyag vizsgálati közegben készített oldatát rázás közben, sötétben vagy szórt fényben, aerob körülmények mellett, állandó (± 2 °C sávban szabályozott), általában a 15–20 °C tartományon belüli hőmérsékleten inkubáljuk. Olyan esetekben, amikor a vizsgálat célja a környezeti feltételek szimulálása, a vizsgálatok ezen a normál hőmérsékleti tartományon kívül is végezhetők. A vizsgálat ajánlott leghosszabb időtartama mintegy 60 nap. A lebomlást a DOC mérése (végső lebomlás), illetve bizonyos esetekben specifikus elemzés (elsődleges lebomlás) követi.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. Annak kiderítéséhez, hogy a vizsgálat alkalmazható-e egy adott anyagra, ismerni kell az anyag egyes tulajdonságait. Meg kell állapítani az anyag szerves széntartalmát, az anyag illékonyosságának olyan mértékűnek kell lennie, hogy a vizsgálat során ne következzen be jelentős veszteség, valamint a vízőldékonyosságának nagyobbak kell lennie 25–40 mg C/l egyenértékénél. Továbbá a vizsgált anyag nem adszorbeálódhat jelentős mértékben üvegfelületeken. Az elért eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára, illetve a főbb összetevők egymáshoz viszonyított arányára vonatkozó információkra, különösen, ha az eredmény közel van az »elégéses« szinthez.

5. A vizsgált anyag baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk – például a rövid távú légzési sebesség vizsgálatban mért eredmények (4) – hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásakor, és nélkülözhetetlenek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez. Ez az információ azonban nem mindig elegendő a biológiai lebomthatósági vizsgálatban kapott eredmények értelmezéséhez, és ilyenkor a 18. pontban leírt eljárás a megfelelőbb.

REFERENCIAANYAGOK

6. A tengervíz minta mikrobiális aktivitásának ellenőrzésére megfelelő referenciaanyagokat kell használni. A nátrium-benzoát, a nátrium-acetát és az anilin például felhasználható erre a célra. A referenciaanyagoknak ésszerűen rövid időn belül le kell bomlaniuk, különben ajánlott a vizsgálatot másik tengervízmintával megismételni.
7. Az EK körvizsgálatban, amelyben tengervíz mintákat vettek különböző helyeken és különböző évszakokban (3), a lappangási fázis (t_L) és az 50 százalékos lebomlás eléréséhez szükséges idő (t_{50}) – a lappangási fázist nem számítva – 1–4 nap, illetve 1–7 nap volt nátrium-benzoát esetében. Az anilin esetében a t_L 0–10 nap között, míg a t_{50} 1–10 nap között volt.

A MÓDSZER ISMÉTELHETŐSÉGE ÉS ÉRZÉKENYSÉGE

8. A körvizsgálatban megállapították a módszer ismételhetségét (3). A vizsgált anyagnak azt a legalacsonyabb koncentrációját, amelyre ez a módszer DOC-elemzéssel használható, javarészt a szerves szén kimutatási határa (jelenleg kb. 0,5 mg C/l), illetve a használt tengervízben oldott szerves szén koncentrációja (általában nagyságrendileg 3–5 mg/l nyílttengeri víz esetében) határozza meg. A DOC háttérkoncentrációja a vizsgált anyag hozzáadása után nem haladhatja meg az összes DOC-koncentráció körülbelül 20 %-át. Ha ez nem megoldható, a DOC háttérkoncentrációját esetenként a tengervíz vizsgálat előtti érlelésével lehet csökkenteni. Ha ezt a módszert csak specifikus kémiai elemzéssel használják (amellyel elsődlegesen lebomlást mérnek), a vizsgálónak kiegészítő információkkal dokumentálnia kell, hogy végső lebomthatóságra lehet számítani. Ezek a kiegészítő információk más gyors vagy inherens biológiai lebomthatósági vizsgálatok eredményei is lehetnek.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

9. A szokásos laboratóriumi készülékek és:
- Rázógép 0,5–2 literes Erlenmeyer-lombikok részére, automatikus hőmérséklet szabályozással vagy állandó, 15–20 °C hőmérsékletű (± 2 °C tartományon belül szabályozott) helyiségben használva;
 - Szűknyakú, 0,5–2 literes Erlenmeyer-lombikok;
 - Membránszűrő készülék vagy centrifuga;
 - Membránszűrők, 0,2–0,45 μm ;
 - Szénanalizátor;
 - Berendezés specifikus elemzésekhez (választható).

Tengervíz

10. Gyűjtsünk tengervízmintát egy alaposan megtisztított tartályba és lehetőleg a gyűjtéstől számított egy-két napon belül szállítsuk el a laboratóriumba. Szállítás közben ne engedjük, hogy a minta hőmérséklete jelentősen meghaladja a vizsgálatához használt hőmérsékletet. Pontosabban azonosítsuk be a mintavételi helyet és írjuk le a szennyezettségi és tápanyagállapotát. Különösen a part menti vizek esetében, a jellemzés tartalmazza a heterotróf mikrobiális telepek számát és az oldott nitrát, ammónium és foszfát koncentrációjának meghatározását.

11. Adjuk meg a következő információkat a tengervízmintára vonatkozóan:
- a gyűjtés dátuma;
 - mintavételi mélység;
 - a minta megjelenése: zavaros, stb.;
 - hőmérséklet a gyűjtés időpontjában;
 - sótartalom;
 - DOC;
 - a gyűjtés és a vizsgálatban történő felhasználás közötti időtartam;
12. Ha a tengervíz minta DOC-tartalma magasnak bizonyul (8. pont), használat előtt ajánlott a tengervíz körülbelül egy hétig érlelni. A mintát aerob körülmények között, vizsgálati hőmérsékleten és sötétben vagy szórt fényben történő tárolással lehet érlelni. Szükség esetén enyhe levegőztetéssel tartsuk fenn az aerob feltételeket. Az érlelés alatt a könnyen lebomló szerves anyagok mennyisége csökken. A körvizsgálatban (3) nem találtak kimutatható különbséget az érlelt és a frissen gyűjtött tengervízminták lebontási potenciálja között. Használat előtt a tengervíz a durva részecskék eltávolítása céljából előkezelni kell, pl. nejlon szűrőn vagy durva papírszűrőn keresztüli szűréssel (ne használjunk membrán- vagy GFC-szűrőt), illetve ülepitéssel és dekantálással. Az eljárást jegyzőkönyvezni kell. Az előkezelést az esetleges érlelés után végezzük.

Az ásványi tápanyagok törzsadatai

13. A következő törzsoldatokat kell készíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével:

- | | | |
|----|--|---------|
| a) | Kálium-dihidrogén-ortofoszfát, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Dikálium-hidrogén-ortofoszfát, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Dinátrium-hidrogén-ortofoszfát-dihidrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| | Ammónium-klorid, NH_4Cl | 0,50 g |
| | Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre. | |
| b) | Kalcium-klorid, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre. | |
| c) | Magnézium-szulfát-heptahidrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre. | |
| d) | Vas(III)klorid-hexahidrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre. | |

A d) oldatban való csapadékképződést úgy lehet megakadályozni, hogy literenként egy csepp tömény HCl-t vagy 0,4 g etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, dinátrium-só) adunk hozzá. Ha egy törzsoldatban csapadék képződik, helyettesítsük frissen készített oldattal.

A vizsgálati közeg elkészítése

14. Adjunk a fenti törzsoldatok mindegyikéből 1 ml-t egy liter előkezelt tengervízhez.

Oltóanyag

15. Ne adjunk hozzá semmilyen konkrét oltóanyagot a tengervízben már eleve jelen lévő mikroorganizmusokhoz. Határozzuk meg (választható) a telepkepző heterotrófok számát a tengervíz vizsgálati közegben (és lehetőleg az eredeti tengervízmintákban is), pl. a csíraszám segítségével, tengeri agar használatával. Ez különösen kívánatos a parti vagy szennyezett területekről származó minták esetében. A tengervíz heterotróf mikrobiális aktivitását egy referenciaanyaggal végzett vizsgálattal ellenőrizzük.

A lombikok előkészítése

16. Győződjünk meg arról, hogy használat előtt minden üvegeszközt lelkiismeretesen megtisztítottunk (pl. alkoholos sósavval), de nem kell feltétlenül sterilizálni, illetve az üvegeszközöket leöblítettük és megszártítottuk annak érdekében, hogy ne következzen be a korábbi vizsgálatokból származó maradványok okozta szennyeződés. A lombikokat az első használat előtt is meg kell tisztítani.
17. A vizsgált anyagokat két lombikban értékeljük egyidejűleg, együtt a referenciaanyagot tartalmazó egyetlen lombikkal. Végezzünk el egy vakpróbát is két példányban – amely sem a vizsgált anyagot, sem a referenciaanyagot nem tartalmazza – az analitikai vak meghatározására. Oldjuk fel a vizsgált anyagokat a vizsgálati közegben – a vizsgált anyagokat kényelmesen hozzáadhatjuk egy tömény törzsoldat segítségével, hogy a kívánt kiindulási koncentrációja kapjuk, amely általában 5–40 mg DOC/l. A referenciaanyagot a szokásos módon vizsgáljuk 20 mg DOC/l-nek megfelelő kiindulási koncentráción. Ha a vizsgált és/vagy referenciaanyagok törzsoldatait használjuk, gondoskodni kell arról, hogy a tengervíz közeg sótartalma nem változott meg nagymértékben.
18. Ha toxikus hatások várhatók vagy azok nem zárhatók ki, tanácsos lehet egy gátlási vizsgálatot is végezni, két példányban, a vizsgálati tervnek megfelelően. Adjuk hozzá a vizsgált és a referenciaanyagot ugyanahhoz az edényhez, és az összehasonlíthatóság érdekében a referenciaanyag koncentrációja általában ugyanaz legyen, mint a kontroll vizsgálatban (azaz 20 mg DOC/l).
19. Adagoljunk megfelelő mennyiségű vizsgálati oldatot Erlenmeyer-lombikokba (a lombik térfogatának legfeljebb körülbelül fele a kényelmes mennyiség), és ezt követően minden lombikot fedjünk le egy laza fedéllel (pl. alumíniumfóliával), amely lehetővé teszi a gázcserét a lombik és a környező levegő között. (A vattadugók nem alkalmasak, ha DOC-elemzést végzünk). Helyezzük az edényeket a rázógépre, és a vizsgálat során óvatos sebességgel (pl. 100 rpm) folyamatosan rázzassuk. Szabályozzuk a hőmérsékletet (15–20 °C és legfeljebb ± 2 °C), és az edényeket az algák növekedésének elkerülése érdekében óvjuk a fénytől. Gondoskodjunk róla, hogy a levegő toxikus anyagoktól mentes legyen.

Fizikai-kémiai kontroll vizsgálat (választható)

20. Ha abiotikus lebomlási vagy veszteségmechanizmusok – mint például hidrolízis (csak a specifikus elemzésnél jelent problémát), párolgás vagy adszorpció – gyanúja merül fel, célszerű elvégezni egy fizikai-kémiai kontroll vizsgálatot. Ez úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal együtt higany(II)-kloridot (HgCl_2)⁽¹⁾ (50–100 mg/l) adunk hozzá az edényekhez, hogy leállítsuk a mikrobiális aktivitást. A DOC vagy a specifikus anyag koncentrációjának jelentős csökkenése a fizikai-kémiai kontroll vizsgálatban abiotikus eltávolítási mechanizmusokat jelez. (Ha higany-kloridot használunk, a DOC-elemzésben figyelembe kell venni az interferenciákat vagy a katalizátormérgezést is.)

A lombikok száma

21. Egy tipikus vizsgálat sorozatban a következő lombikokra van szükség:
 1. és 2. lombik a vizsgált anyagot (vizsgált szuszpenziót) tartalmazza;
 3. és 4. lombik csak tengervizet tartalmaz (vak);
 5. lombik a referenciaanyagot tartalmazza (eljárási kontroll);
 6. lombik a vizsgált és a referenciaanyagot tartalmazza (toxicitási kontroll) – választható;
 7. lombik a vizsgált anyagot és a sterilizálószeret tartalmazza (abiotikus steril kontroll) – választható.

DOC-elemzés

22. A vizsgálat során megfelelő időközönként mintákat kell venni a DOC-elemzéshez (1. függelék). A vizsgálat elején (0. nap) és a 60. napon mindig mintát kell venni. Összesen legalább öt mintára van szükség a lebomlás időbeli lefolyásának leírásához. Rögzített menetrend nem állítható fel a mintavételre, mivel a biológiai lebomlás sebessége eltérő lehet. A DOC-meghatározást minden mintán kétszer végezzük el.

⁽¹⁾ A higany(II)-klorid (HgCl_2) nagyon mérgező anyag, amelyet megfelelő óvintézkedések betartásával kell kezelni. Az e vegyi anyagot tartalmazó vizes hulladékokat nem szabad beengedni a szennyvízrendszerbe, hanem megfelelően ártalmatlanítani kell.

Mintavétel

23. A minták szükséges térfogata az analitikai módszertől (specifikus elemzés), a szén-dioxid-elemző készüléktől, és attól az eljárástól (membránszűrés vagy centrifugálás) függ, amelyet a minta szénmeghatározás előtti kezelésére választottunk (lásd a 25. és 26. pontot). A mintavétel előtt gondoskodjunk a vizsgálati közeg alapos összekeveréséről és a lombik falára tapadt bármely anyag leoldásáról vagy szuszpendálásáról.
24. A mintavétel után azonnal végezzünk membránszűrést vagy centrifugálást. Szükség esetén a szűrt vagy centrifugált mintákat 2–4 °C-on legfeljebb 48 órán át, vagy – 18 °C alatt hosszabb ideig tárolhatjuk (ha az anyagról ismert, hogy ettől nem módosul, a pH-t tárolás előtt savasítsuk 2-re).
25. A membránszűrők (0,2–0,45 µm) akkor megfelelőek, ha biztosan nem bocsátanak ki szenet és nem is adszorbeálják a szűrési lépés során, pl. polikarbonát membránszűrők. Egyes membránszűrőket a hidrofilizáció érdekében felületaktív anyagokkal impregnálnak, ezért jelentős mennyiségű oldott szenet bocsáthatnak ki. Az ilyen szűrőket ioncserélt vízben három egymást követő perióduson – periódusonként egy órán – át történő forralással kell előkészíteni. Forralás után a szűrőket ioncserélt vízben tároljuk. A szűrlet első 20 ml-ét el kell önteni.
26. A membránszűrés alternatívájaként a minták centrifugálása választható. A mintát 40 000 ms⁻²-en (~ 4 000 g) centrifugáljuk 15 percre, lehetőleg hűtött centrifugában.

Megjegyzések: Úgy tűnik, hogy az összes szerves szén (TOC) DOC feletti részének (TOC/DOC) centrifugálással történő elkülönítése nagyon kis koncentrációk esetén nem működik, mert a centrifugálás vagy nem távolít el minden baktériumot, vagy a bakteriális plazma részét képező szenet újra feloldja. Magasabb tesztkoncentrációk (> 10 mg C/l) esetén a centrifugálási hiba viszonylag kicsinek tűnik.

A mintavétel gyakorisága

27. Ha az elemzésekre a mintavétel után azonnal sor kerül, a következő mintavételi időpontot az analitikai meghatározás eredményének figyelembevételével becsüljük meg.
28. Ha a mintákat egy későbbi időpontban történő elemzés céljából megőrizzük (24. pont), az előírt minimum ötnél több mintát vegyünk. Először az utolsó mintákat elemezzük, és az elemzéshez a megfelelő mintáknak lépésenként »visszafelé« történő kiválasztásával viszonylag kisszámú analitikai meghatározással jó leírást kaphatunk a biológiai lebomlási görbéről. Ha a vizsgálat végéig nem történt lebomlás, további minták elemzésére nincs szükség, és ebben a helyzetben a »visszafelé« irányuló stratégiával jelentős elemzési költségeket lehet megtakarítani.
29. Ha a lebomlási görbén a 60. nap előtt plató figyelhető meg, fejezzük be a vizsgálatot. Amennyiben a lebomlás a 60. napig nyilvánvalóan megkezdődött, de még nem tetőzött, hosszabbítsuk meg a vizsgálatot egy újabb időszakra.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

30. Jegyezzük fel a vizsgálati eredményeket a mellékelt adatlapon (2. függelék), és számítsuk ki a vizsgált és a referenciaanyag biológiai lebomlásának értékét a következő egyenletből:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

ahol:

- D_t = lebomlás a DOC százalékában vagy a specifikus anyag eltávolítása a t időpontban,
- C_0 = a DOC vagy a specifikus anyag kiindulási koncentrációja a vizsgálati közegben,
- C_t = a DOC vagy a specifikus anyag koncentrációja a vizsgálati közegben a t időpontban,
- $C_{bl(0)}$ = a DOC vagy a specifikus anyag kiindulási koncentrációja a vakpróbában,
- $C_{bl(t)}$ = a DOC vagy a specifikus anyag koncentrációja a vakpróbában a t időpontban.

31. A lebomlást a DOC eltávolításának százalékában (végső lebomlás) vagy a specifikus anyag eltávolításának százalékában (elsődleges lebomlás) állapítsuk meg a t időpontban. Számítsuk ki a DOC-koncentrációt a legközelebbi 0,1 mg/l-re kerekítve, és a D_t értékek átlagát kerekítsük fel a legközelebbi egész százalékra.
32. Ábrázoljuk grafikusán a lebomlási görbét egy diagramban az »Érvényesség és az eredmények értelmezése« című részben található ábra szerint. Ha elegendő adat áll rendelkezésre, számítsuk ki a görbéből a lappangási fázist (t_1) és a lappangási fázis végétől az 50 százalékos eltávolítás eléréséig szükséges időt (t_{50}).

Vizsgálati jegyzőkönyv

33. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

- fizikai tulajdonság és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;
- azonosító adatok.

Vizsgálati feltételek:

- a mintavételi hely és leírása; szennyezettségi és tápanyagállapot (adott esetben csíraszám, nitrát, ammónium, foszfát);
- a minta jellemzői (a mintavétel időpontja, mélység, megjelenés, hőmérséklet, sótartalom, DOC (opcionális), a gyűjtés és a vizsgálati felhasználás közötti időtartam);
- a tengervíz érelésére alkalmazott módszer (ha van ilyen);
- a tengervíz előkezelésére használt módszer (szűrés/ülepítés);
- a DOC meghatározásához használt módszer;
- a specifikus elemzésre használt módszer (választható);
- a tengervízben lévő heterotrófok számának meghatározására használt módszer (csíraszám módszer vagy egyéb eljárás) (választható);
- a tengervíz jellemzésére használt egyéb módszerek (ATP mérés, stb.) (választható).

Eredmények:

- az adatlapon jegyzőkönyvezett analitikai adatok (2. függelék);
- a lebomlási vizsgálat menete egy diagramban grafikusán ábrázolva, amely bemutatja a lappangási fázist (t_1), az emelkedést, valamint az 50 százalékos eltávolításhoz (a lappangási fázis végétől kezdve) szükséges időt (t_{50}). A lappangási fázist grafikusán lehet megbecsülni, amint az az »Érvényesség és az eredmények értelmezése« című szakaszban található ábrán látható, vagy egyszerűen a 10 százalékos csökkenéshez szükséges időt lehet lappangási fázisnak tekinteni;
- a 60 nap után vagy a vizsgálat végén mért százalékos lebomlás.

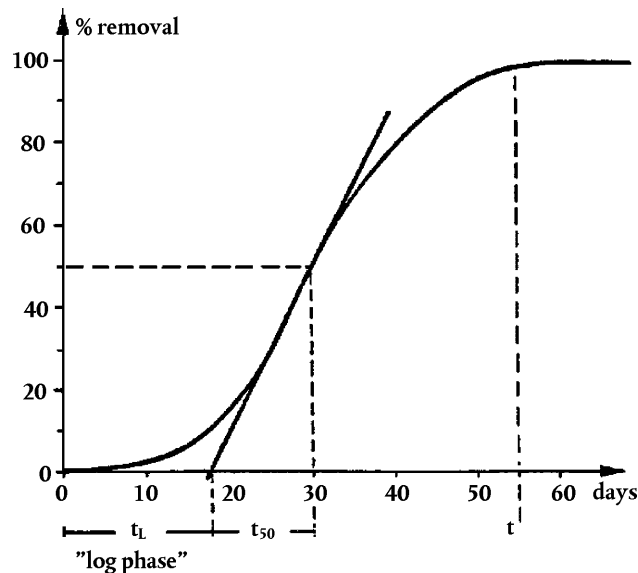
Az eredmények szöveges értékelése.

Érvényesség és az eredmények értelmezése

34. A referenciaanyaggal – pl. nátrium-benzoát, nátrium-acetát vagy anilin – kapott eredményeknek összehasonlíthatónak kell lenniük a körvizsgálatban (3) kapott eredményekkel (lásd: a »Referenciaanyagok« című szakaszt, 7. pont). Ha a referenciaanyaggal kapott eredmények atipikusak, a vizsgálatot másik tengervíz mintával meg kell ismételni. Bár a gátlási vizsgálatok eredményeit nem mindig egyszerű megítélni, mivel a vizsgált anyag is hozzájárul a DOC mennyiségéhez, a teljes DOC eltávolítási arány kontrollhoz viszonyított jelentős csökkenése toxikus hatásra utaló pozitív jel.

35. A legtöbb természetes rendszerhez képest viszonylag magas vizsgálati koncentrációk (és ennek következtében a vizsgált anyagok és az egyéb szénforrások koncentrációja közötti kedvezőtlen arány) miatt a módszert előzetes vizsgálatnak kell tekinteni, amely annak jelzésére használható, hogy az anyag könnyen lebontható vagy sem. Ennek megfelelően az alacsony eredmény nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vizsgált anyag nem bontható le a tengeri környezetben, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra van szükség ennek megállapításához.

Az alábbi ábra egy példát mutat be az elméleti lebomlási vizsgálatra, és illusztrálja a t_L -érték (a »lappangási fázis« hossza), illetve a t_{50} -érték (a t_L -lel kezdődő időintervallum), azaz az 50 százalékos eltávolítás eléréséhez szükséges időtartam becslésének egyik lehetséges módját.



ZÁRT PALACK MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a módszer a zárt palack vizsgálat (5) tengervízre adaptált változata, amelyet a dán Water Quality Institute által az Európai Bizottság (EB) részére szervezett körvizsgálat eredményeként véglegesítettek (3).
2. A kapcsolódó tengeri lombikrázásos módszerrel megegyezően e vizsgálat eredményeit sem lehet a gyors biológiai lebonthatóságra utaló jelzéseként értelmezni, hanem kifejezetten az anyagok tengeri környezetben való lebonthatóságára vonatkozó információk megszerzésére kell használni.

A MÓDSZER ELVE

3. A vizsgált anyag előre meghatározott mennyiségét feloldjuk a vizsgálati közegben, általában literenként 2–10 mg vizsgált anyag koncentrációban (egy vagy több koncentráció is használható). Az oldatot a megtöltött zárt üvegben, sötétben, állandó hőmérsékletű fürdőben vagy helyiségben, ± 1 °C-on belül szabályozott 15–20 °C közötti hőmérsékleten tartjuk. Azokban az esetekben, amikor a vizsgálat célja a környezeti feltételek szimulálása, a vizsgálatot ezen a normál hőmérsékleti tartományon kívül is lehet végezni, feltéve, hogy megtesszük a szükséges kiigazításokat a hőmérséklet szabályozása érdekében. A lebomlást az oxigén elemzése követi egy 28 napos időszakon keresztül.
4. A körvizsgálat megmutatta, hogy ha a vizsgálatot 28 napon túlra is kiterjesztjük, a legtöbb esetben nem lehet hasznos információkat gyűjteni a súlyos interferenciák miatt. A vak biológiai oxigénigény (BOI) értékei túlzottan magasak voltak, valószínűleg a mikroorganizmusoknak a palack falára – a keverés hiánya miatt – történő ránövekedése, illetve a nitrifikáció következtében. Ezért a javasolt időtartam 28 nap, de ha a vak BOI érték a 30 %-os határon belül marad (15. és 40. pont), a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. Annak kiderítéséhez, hogy a vizsgálat alkalmazható-e egy adott anyagra, ismerni kell az anyag egyes tulajdonságait. A tapasztalati képletre azért van szükség, hogy ki lehessen számítani az elméleti oxigénigényt (EOI) (lásd a 3. mellékletet); ellenkező esetben a kémiai oxigénigényt (KOI) kell meghatározni referenciaértékként. A KOI használata kevésbé kielégítő, mivel egyes anyagok nem oxidálódnak teljesen a KOI-vizsgálatban.
6. Az anyag oldhatósága legyen legalább 2 mg/l, bár elvben a kevésbé oldható anyagokat is lehet vizsgálni (pl. ultrahangos kezelés segítségével), illetve az illékony anyagokat is. Az elért eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára, illetve a főbb összetevők egymáshoz viszonyított arányára vonatkozó információkra, különösen, ha az eredmény közel van az »elégészes« szinthez.
7. Az anyag baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk – például a rövid távú légzési vizsgálatban mért eredmények (4) – nagyon hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásakor, és nélkülözhetetlenek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez. Ez az információ azonban nem mindig elegendő a biológiai lebomthatósági vizsgálatban kapott eredmények értelmezéséhez, és ilyenkor a 27. pontban leírt eljárás a megfelelőbb.

REFERENCIAANYAGOK

8. A tengervíz minta mikrobiális aktivitásának ellenőrzésére megfelelő referenciaanyagokat kell használni. Az anilint, a nátrium-acetátot vagy a nátrium-benzoátot (például) lehet használni erre a célra. Ezen anyagok legalább 60 százalékos lebomlásának (az EOI-hoz viszonyítva) kell bekövetkeznie ésszerűen rövid időn belül, különben ajánlott a vizsgálatot másik tengervíz mintán megismételni.
9. Az EK-körvizsgálatban, amelynek keretében tengervíz mintákat vettek különböző helyeken és különböző évszakokban, nátrium-benzoát esetében a lappangási fázis (t_L) 0–2 nap, az 50 százalékos lebomlás eléréséhez szükséges idő (t_{50}) a lappangási fázis nélkül pedig 1–4 nap volt. Az anilin esetében a t_L és a t_{50} érték 0–7, illetve 2–12 nap volt.

REPRODUKÁLHATÓSÁG

10. Az EK-körvizsgálatban megállapították a módszer reprodukálhatóságát (3).

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

11. Szokásos laboratóriumi berendezések, és:
 - a) 250–300 ml-es BOI-palackokat lehet használni üveg dugóval vagy szűknyakú 250 ml-es palackokat üveg dugóval;
 - b) Több 2, 3 és 4 literes palack liter beosztással a kísérlet előkészítéséhez és a BOI-palackok feltöltéséhez;
 - c) Vízfürdő vagy állandó hőmérsékletű helyiség a palackok állandó hőmérsékleten (± 1 °C) és fénytől védve történő tárolásához.
 - d) Berendezés az oldott oxigén elemzésére;
 - e) Membránszűrők, 0,2–0,45 μm (választható);
 - f) Berendezés specifikus elemzésekhez (választható).

Tengervíz

12. Gyűjtünk tengervízmintát egy alaposan megtisztított tartályba és lehetőleg a gyűjtéstől számított egy-két napon belül szállítsuk el a laboratóriumba. Szállítás közben ne engedjük, hogy a minta hőmérséklete jelentősen meghaladja a vizsgálathoz használt hőmérsékletet.
13. Pontosan azonosítsuk be a mintavételi helyet és írjuk le a szennyezettségi és tápanyagállapotát. Különösen a part menti vagy szennyezett vizek esetében, a jellemzés tartalmazza a heterotróf mikrobiális telepek számát és az oldott nitrát, ammónium és foszfát koncentrációjának meghatározását.
14. Adjuk meg a következő információkat a tengervíz mintára:
 - a gyűjtés dátuma;
 - mintavételi mélység;
 - a minta megjelenése: zavaros, stb.;
 - hőmérséklet a gyűjtés időpontjában;
 - sótartalom;
 - oldott szerves szén (DOC);
 - a gyűjtés és a vizsgálatban történő felhasználás közötti időtartam;
15. Ha a minta DOC-tartalmát magasnak találjuk, vagy ha úgy véljük, hogy a vak BOI 28 nap után meghaladná a referenciaanyag BOI értékének 30 százalékát, ajánlott a tengervizet felhasználás előtt körülbelül egy hétig érlelni.
16. A mintát aerob feltételek mellett, a vizsgálati hőmérsékleten és sötétben vagy szórt fényben történő tárolással lehet érlelni. Szükség esetén enyhe levegőztetéssel tartsuk fenn az aerob körülményeket. Az érlelés alatt a könnyen lebomló szerves anyagok mennyisége csökken. A körvizsgálatban (3) nem találtak kimutatható különbséget az érlelt és a frissen gyűjtött tengervíz minták lebontási potenciálja között.
17. Használat előtt a tengervizet a durva részecskék eltávolítása céljából előkezelni kell, pl. nejlon szűrőn vagy durva papírszűrőn keresztüli szűréssel (ne használjunk membrán- vagy GFC-szűrőt), illetve ülepítéssel és dekantálással. Az alkalmazott eljárást jegyzőkönyvezni kell. Az előkezelést az esetleges érlelés után végezzük.

Az ásványi tápanyagok törzsadatai

18. A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével.
 - a) Kálium-dihidrogén-ortofoszfát, KH_2PO_4 8,50 g
Dikálium-hidrogén-ortofoszfát, K_2HPO_4 21,75 g
Dinátrium-hidrogén-ortofoszfát-dihidrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,30 g
Ammónium-klorid, NH_4Cl 0,50 g
Oldjuk fel és töltjük fel desztillált vízzel 1 literre.
 - b) Kalcium-klorid, CaCl_2 27,50 g
Oldjuk fel és töltjük fel desztillált vízzel 1 literre.

- c) Magnézium-szulfát-heptahidrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Oldjuk fel és töltjük fel desztillált vízzel 1 literre.
- d) Vas(III)klorid-hexahidrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Oldjuk fel és töltjük fel desztillált vízzel 1 literre.

A d) oldatban való csapadékképződést úgy lehet megakadályozni, hogy literenként egy csepp tömény HCl-t vagy 0,4 g etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, dinátrium-só) adunk hozzá. Ha egy törzsoldatban csapadék képződik, helyettesítsük frissen készített oldattal.

A vizsgálati közeg elkészítése

19. Adjunk a fenti törzsoldatok mindegyikéből 1 ml-t egy liter előkezelt tengervízhez. A vizsgálati hőmérsékleten tiszta sűrített levegővel körülbelül 20 percig törtető levegőztetéssel telítsük a vizsgálati közeget levegővel. Határozzuk meg az oldott oxigén koncentrációját ellenőrzés céljából. Az oldott oxigén telített koncentrációját a sótartalom és a hőmérséklet függvényében az e vizsgálati módszerhez mellékelt nomogramról lehet olvasni (4. függelék).

Oltóanyag

20. Ne adjunk hozzá semmilyen konkrét oltóanyagot a tengervízben már jelen lévő mikroorganizmusokhoz. Határozzuk meg (választható) a telepkepző heterotrófok számát a tengervíz vizsgálati közegben (és lehetőleg az eredeti tengervízmintában is), pl. a csíraszám segítségével, tengeri agar használatával. Ez különösen kívánatos a parti vagy szennyezett területekről származó minták esetében. A tengervíz heterotróf mikrobiális aktivitását egy referenciaanyaggal végzett vizsgálattal ellenőrizzük.

A vizsgálati palackok előkészítése

21. Az összes szükséges beavatkozást, egyebek mellett a tengervíz érlelését és előkezelését a kiválasztott 15–20 °C vizsgálati hőmérsékleten kell végezni, biztosítva az üvegeszközök tisztaságát (de az üvegeszközöknek nem kell sterilnek lenniük).
22. A BOI-palackokból csoportokat kell készíteni a vizsgált és a referenciaanyagok BOI értékének meghatározására végzett egyidejű kísérletsorozatokhoz. Az elemzéseket a két ismétlésen kell elvégezni (vak, referencia- és vizsgált anyag), azaz minden meghatározáshoz két palackot kell előkészíteni. Elemzéseket legalább a 0., 5., 15. és 28. napon végzünk (négy meghatározás). Az oxigénelemzések esetében a négy meghatározáshoz összesen $3 \times 2 \times 4 = 24$ palackra (vak, referencia- és vizsgált anyag), és így körülbelül 8 liter vizsgálati közegre van szükség (a vizsgált anyag egy koncentrációjához).
23. A vizsgált és referenciaanyagból külön oldatokat készítünk megfelelő térfogatú nagy palackokban (11. pont), a vizsgált és a referenciaanyagot a részben megtöltött nagy palackokhoz hozzáadva, közvetlenül vagy koncentrált törzsoldat használatával. Ezután további vizsgálati közeget adunk hozzá a kívánt végső koncentráció eléréséhez. Ha a vizsgált és/vagy referenciaanyagok törzsoldatait használjuk, gondoskodni kell arról, hogy a tengervíz közeg sótartalma nem változott meg jelentős mértékben.
24. A vizsgált és a referenciaanyag koncentrációit a következők figyelembevételével kell kiválasztani:
- az oldott oxigén tengervízben való oldhatósága a mindenkori vizsgálati hőmérsékleten és sótartalom mellett (lásd a mellékelt nomogramot, 4. függelék);
 - a tengervíz vak BOI értéke; és
 - a vizsgált anyag várható biológiai lebomlása.
25. 15 °C és 20 °C hőmérsékleten, illetve 32 ezrelék sótartalom mellett (óceáni víz) az oldott oxigén oldhatósága körülbelül 8,1, illetve 7,4 mg/l. Ha a tengervizet nem érleltük, a tengervíz saját oxigénfogyasztása (vak légzés) 2 mg O_2 /l vagy annál több lehet. Ezért annak érdekében, hogy a vizsgált anyag oxidálását követően jelentős oxigénkoncentráció maradjon vissza, a vizsgált anyag kiindulási koncentrációja körülbelül 2–3 mg/l legyen (az EOI-tól függően) olyan anyagok esetében, amelyek a vizsgálati körülmények között várhatóan teljesen lebomlanak (mint például a referenciaanyagok). A kevésbé lebontható anyagokat magasabb, legfeljebb körülbelül 10 mg/l koncentrációban kell vizsgálni, feltéve, hogy toxikus hatás nem fordul elő. Előnyös lehet párhuzamos vizsgálatokat futtatni a vizsgált anyag alacsony (körülbelül 2 mg/l) és a magas (körülbelül 10 mg/l) koncentrációjával.

26. Az oxigén vakpróbát párhuzamosan kell vizsgálni olyan palackokban, amelyek sem vizsgált, sem referenciaanyagot nem tartalmaznak.
27. Ha gátló hatás nem állapítható meg, a következő oldatsorozatot kell készíteni külön nagy üvegekben (13):
- 2 mg/l egy könnyen lebomló anyagból, pl. bármelyik említett referenciaanyagból;
 - x mg/l a vizsgált anyagból (az x rendszerint 2);
 - 2 mg/l egy könnyen lebomló anyagból plusz x mg/l a vizsgált anyagból.

Fizikai-kémiai kontroll vizsgálat (választható)

28. Ha élünk a specifikus elemzések lehetőségével, fizikai-kémiai vizsgálatot lehet végezni annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált anyagot eltávolítják-e abiotikus mechanizmusok, például hidrolízis vagy adszorpció. A fizikai-kémiai vizsgálat úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal együtt higany(II)-kloridot (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50–100 mg/l) adunk hozzá dupla palackokhoz, hogy leállítsuk a mikrobiális aktivitást. A specifikus anyag koncentrációjának jelentős csökkenése a vizsgálat során abiotikus eltávolítási mechanizmusokat jelez.

A BOI-palackok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban

29. Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő palackokra van szükség:
- legalább 8 palack a vizsgált anyaggal;
 - legalább 8 palack csak tápanyagokkal dúsított tengervízzel;
 - legalább 8 palack referenciaanyaggal, és ha szükséges,
 - 6 palack a vizsgált és a referenciaanyaggal (toxicitási kontroll).

ELJÁRÁS

30. Elkészítés után minden oldatból azonnal ki kell szívni a BOI-palackok megfelelő csoportjának feltöltéséhez szükséges mennyiséget a megfelelő nagy üveg alsó negyedéből (nem alulról). A zéró kontrollokat azonnal elemezni kell oldott oxigénre (zéró időpont, 33. pont), vagy pedig MnCl_2 -vel (mangán(II)-klorid) és NaOH-val (nátrium-hidroxid) végzett kicsapatással tartósítani kell későbbi kémiai elemzés céljára.
31. A megmaradt párhuzamos BOI-palackokat vizsgálati hőmérsékleten (15–20 °C) inkubáljuk, sötét helyen tartjuk, megfelelő időközönként (például minimum az 5., a 15. és a 28. nap után) eltávolítjuk az inkubációs területről, és elemezzük az oldott oxigéntartalmukat (33. pont).
32. A specifikus elemzésekre (választható) szolgáló mintákat membránszűrjük (0,2–0,45 μm), vagy 15 percig centrifugáljuk. Ha a mintákat nem analizáljuk azonnal, 2–4 °C-on legfeljebb 48 órán át, vagy – 18 °C-on hosszabb ideig tárolhatjuk (ha ismeretes, hogy az anyag ettől nem módosul, a pH-t tárolás előtt savasítjuk 2-re).

Az oldott oxigén meghatározása

33. Az oldott oxigén koncentrációját nemzeti vagy nemzetközi szinten elismert kémiai vagy elektrokémiai módszerrel kell meghatározni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

34. Az analitikai eredményeket a mellékelt adatlapon kell feljegyezni (5. függelék).

⁽¹⁾ A higany(II)-klorid (HgCl_2) nagyon mérgező anyag, amelyet megfelelő óvintézkedések betartásával kell kezelni. Az e vegyi anyagot tartalmazó vizes hulladékokat nem szabad beengedni a szennyvízrendszerbe, hanem megfelelően ártalmatlanítani kell.

35. A BOI értéke az oxigénfogyásnak a vakpróba és a vizsgált anyag oldata közötti különbsége a vizsgálat körülményei között mérve. A nettó oxigénfogyást el kell osztani a vizsgált anyag koncentrációjával (tömeg/térfogat) annak érdekében, hogy a BOI-t mg BOI/mg vizsgált anyag formában lehessen kifejezni. A lebomlás a biokémiai oxigénigénynek lehetőleg az elméleti oxigénigényhez (EOI), vagy pedig a kémiai oxigénigényhez (KOI) viszonyított aránya, és százalékban kell kifejezni (lásd a 36. pontot).
36. A biológiai lebomlás értéke az egyes mintavételi időpontokban a vizsgált és a referenciaanyagra az alábbi egyenletek egyikével számolható ki:

$$\% \text{ biológiai lebomlás} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg vizsgált anyag}}{\text{mg EOI}/\text{mg vizsgált anyag}} \times 100$$

$$\% \text{ biológiai lebomlás} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg vizsgált anyag}}{\text{mg KOI}/\text{mg vizsgált anyag}} \times 100$$

ahol:

EOI = az elméleti oxigénigény (számítását lásd a 3. függelékben)

KOI = a kísérleti úton meghatározott kémiai oxigénigény.

Megjegyzés: Előfordul, hogy a két számítási módszer (az EOI százaléka vagy a KOI százaléka) nem ugyanazt az eredményt adja; célszerű az EOI-t használni, mert bizonyos anyagok nem teljesen oxidálódnak a KOI-vizsgálatban.

37. A lebomlás folyamatát grafikusan, diagram formájában kell ábrázolni (lásd az »Érvényesség és az eredmények értelmezése« című szakaszban található példát). Ha elegendő adat áll rendelkezésre, a biológiai lebomlási görbéből kiszámítjuk a lappangási fázis hosszát (t_l) és a lappangási fázis végétől az 50 százalékos eltávolítás eléréséig szükséges időt (t_{50}).
38. Ha specifikus elemzést végzünk (választható), az elsődleges lebomlás százalékos arányát a specifikus anyagnak a vizsgálati időszakban megfigyelt, az analitikai vakpróbákkal korrigált eltávolítása százalékos arányként kell kifejezni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

39. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

- fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;
- azonosító adatok.

Vizsgálati feltételek:

- a mintavételi hely és leírása: szennyezettségi és tápanyagállapot (adott esetben csíraszám, nitrát, ammónium, foszfát);
- a minta jellemzői (a mintavétel időpontja, mélység, megjelenés, hőmérséklet, sótartalom, DOC [választható], a gyűjtés és a vizsgálatban való felhasználás közötti időtartam);
- a tengervíz érlelésére alkalmazott módszer (ha van ilyen);
- a tengervíz előkezelésére használt módszer (szűrés/ülepítés);
- a KOI meghatározására használt módszer (ha elvégeztük);
- az oxigén mérésére használt módszer;
- a diszperziós eljárás olyan anyagok esetében, amelyek rosszul oldódnak a vizsgálati körülmények között;
- a tengervízben lévő heterotrófok számának meghatározására használt módszer (csíraszám módszer vagy egyéb eljárás);

- a DOC tengervízben történő meghatározására használt módszer (választható);
- a specifikus elemzésre használt módszer (választható);
- egyéb választható módszerek a tengervíz jellemzésére (ATP-mérés, stb.).

Eredmények:

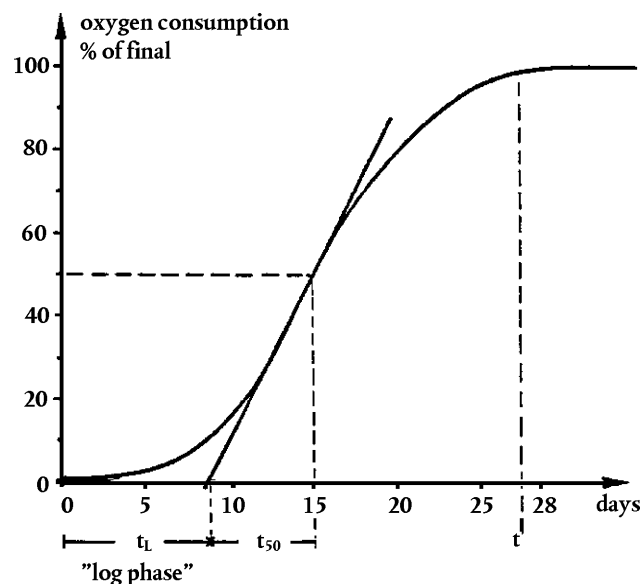
- az adatlapon jegyzőkönyvezett analitikai adatok (5. függelék);
- a lebomlási vizsgálat menete egy diagramban grafikusán ábrázolva, amely bemutatja a lappangási fázist (t_L), az emelkedést, valamint a vizsgált anyag oxidációja által okozott végső oxigénfelvétel 50 százalékának eléréséhez szükséges t_{50} időt (a lag fázis végétől számítva). A lappangási fázist grafikusán lehet megbecsülni, amint a mellékelt ábrán látható, vagy egyszerűen a 10 százalékos lebomláshoz szükséges időt lehet lappangási fázisnak tekinteni;
- százalékos lebomlás 28 nap után mérve.

Az eredmények szöveges értékelése.

Érvényesség és az eredmények értelmezése

40. A vak légzés nem haladhatja meg a vizsgálati palackban lévő oxigén 30 százalékát. Ha ezt a kritériumot frissen gyűjtött tengervíz használata esetén nem lehet teljesíteni, a tengervizet használat előtt érelni (stabilizálni) kell.
41. Figyelembe kell venni azt a lehetőséget, hogy a nitrogéntartalmú anyagok befolyásolhatják az eredményeket.
42. A nátrium-benzoát és az anilin referenciaanyaggal kapott eredményeknek összehasonlíthatónak kell lenniük a körvizsgálatban (3) kapott eredményekkel (9. pont). Ha a referenciaanyaggal kapott eredmények atipikusak, a vizsgálatot másik tengervízmintával meg kell ismételni.
43. A vizsgált anyagot gátló hatásúnak lehet tekinteni baktériumokra (a használt koncentrációban), ha a referencia- és a vizsgált anyag keverékének BOI-értéke kisebb, mint a két anyag különálló oldatai BOI-értékének összege.
44. A legtöbb természetes rendszerhez képest viszonylag magas vizsgálati koncentrációk – és ennek következtében a vizsgált anyag és az egyéb szénforrások koncentrációja közötti kedvezőtlen arány – miatt a módszert előzetes vizsgálatnak kell tekinteni, amely annak jelzésére használható, hogy az anyag könnyen lebontható-e vagy sem. Ennek megfelelően az alacsony eredmény nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vizsgált anyag nem bontható le a tengeri környezetben, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra van szükség ennek megállapításához.

Az alábbiakban egy példa látható az elméleti lebomlási vizsgálatra, amely illusztrálja a t_L értéket (a »lappangási fázis« hossza), illetve a t_{50} értéket (a t_L -vel kezdődő időintervallum), azaz a vizsgált anyag oxidációja által okozott végső oxigénfelvétel 50 %-ának eléréséhez szükséges időtartam becslésének egyik lehetséges módját.



SZAKIRODALOM

- (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) E melléklet C.4-B. fejezete: A »gyors« biológiai lebonthatóság meghatározása, III. rész: Módosított OECD szűrővizsgálat
 - (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) E melléklet C.11. fejezete: Biológiai lebomlás – Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata.
 - (5) E melléklet C.4-E. fejezete: A »gyors« biológiai lebonthatóság meghatározása, VI. rész: Zártpalack-módszer.
-

1. függelék

A szerves szén meghatározása tengervízben

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

A szerves szén vízmintában történő meghatározásához a minta szerves vegyületeit szén-dioxidá oxidáljuk általában az alábbi három technika valamelyikének használatával:

- nedves oxidáció perszulfáttal/UV-besugárással;
- nedves-oxidáció perszulfáttal/megemelt hőmérsékleten (116–130 °C);
- égetés.

A képződött CO₂ mennyiségét infravörös spektroszkópiával vagy titrimetriával határozzuk meg. Alternatív megoldásként a CO₂-ot metánná redukáljuk, amelynek mennyiségét lángionizációs detektoron (flame ionization detector, FID) határozzuk meg.

A perszulfát/UV-módszert gyakran használjuk az alacsony szemcsésanyag-tartalmú »tisztá« víz elemzéséhez. Az utóbbi két módszert a vízminták legtöbb típusánál alkalmazni lehet, a perszulfáttal/megemelt hőmérsékleten történő oxidáció az alacsony szintű minták esetén a leginkább alkalmas, míg az égetéses eljárás az 1 mg C/l értéket jóval meghaladó mennyiségű nem illékony szerves szén (non-volatile organic carbon, NVOC) tartalmazó minták vizsgálatára alkalmas.

Zavaró hatások

Mindhárom módszer eredményessége a mintában jelen lévő szerves szén (inorganic carbon, IC) eltávolításától vagy kompenzálásától függ. Az IC eltávolítására leggyakrabban használt módszer a CO₂ savanyított mintából való kitisztítása, bár ez az illékony szerves vegyületek elvesztését is eredményezi (1). Az IC teljes eltávolítását vagy kompenzálását minden mintamátrix esetében biztosítani kell, és a minta típusától függően az NVOC mellett az illékony szerves szén (volatile organic carbon, VOC) is meg kell határozni.

A perszulfát/UV-módszer használata esetén a magas kloridkoncentráció az oxidáció hatékonyságának csökkenését eredményezi (2). A higany(II)-nitrát hozzáadásával módosított oxidációs reagens alkalmazása azonban megszüntetheti ezt a zavaró hatást. Ajánlott a maximális tolerálható mintatérfogatot használni bármilyen típusú klorid-tartalmú minta értékeléséhez. Az égetéses módszerrel elemzett minta magas sókoncentrációja sóbevonat képződését idézheti elő a katalizátoron, illetve az égetőcső túlzott korrózióját okozhatja. Meg kell tenni a gyártó kézikönyve szerinti óvintézkedéseket.

A perszulfát/UV-módszer alkalmazása esetén erősen zavaros, illetve szemcsés anyagot tartalmazó minták esetében tökéletes oxidáció következhet be.

Példa a megfelelő módszerre

A nem illékony szerves szén a perszulfát/UV-besugárással végzett oxidációval határozzuk meg, a kialakult CO₂ ezt követő mennyiségi meghatározása pedig nem diszperzív infravörös spektrometria alkalmazásával történik.

Az oxidációs reagenst a (2) szakirodalmi hivatkozásban megadott javaslatoknak megfelelően módosítjuk, a gyártó kézikönyvében leírtak szerint:

- a) 8,2 g HgCl₂-t és 9,6 g Hg(NO₃)₂·H₂O-t feloldunk több száz milliliter alacsony szén-dioxid koncentrációjú reagensvízben.
- b) 20 g K₂S₂O₈-t feloldunk a higanyos sóoldatban.
- c) 5 ml HNO₃-t (konc.) adunk az elegyhez.
- d) a reagenst felhígítjuk 1 000 ml-re.

A klorid okozta zavaró hatást úgy szüntetjük meg, hogy 40 µl mintatérfogatot használunk 10 százalék klorid, illetve 200 µl mintatérfogatot 1,9 százalék klorid esetén. A magas kloridkoncentrációjú és/vagy nagyobb térfogatú minták e módszer szerint elemezhetők, feltéve, hogy megakadályozzuk a klorid felszaporodását az oxidációs edényben. Ezután lehet elvégezni a kérdéses minta illékony szerves széntartalmának meghatározását, ha szükséges.

SZAKIRODALOM

- (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.

Also of interest (gives a description of an autoanalysis system):

- (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. függelék

Biológiai lebomlás tengervízben

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

ADATLAP

1. **LABORATÓRIUM:**
2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA:**
3. **VIZSGÁLT ANYAG:**

Név:

Törzsoldat koncentrációja: mg/l az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a közegben, t_0 : mg/l az anyagra vonatkoztatva

: mg DOC/l

4. **TENGERVÍZ:**

Forrás:

Gyűjtés időpontja:

Mintavételi mélység:

Megjelenés a gyűjtés időpontjában (pl. zavaros, stb.):

Sótartalom a gyűjtéskor: ‰

Hőmérséklet a gyűjtéskor: °C

DOC »x« órával a gyűjtés után: mg/l

Előkezelés vizsgálat előtt (pl. szűrés, üleptetés, érlelés, stb.):

Mikrobiális telepek száma — eredeti minta: telep/ml

— a vizsgálat kezdetén telep/ml

Egyéb jellemzők:

5. SZÉNMEGHATÁROZÁS:

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Vizsgálat: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyaggal	1	a ₁					
		a ₂					
		átlag, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		átlag, C _{b(t)}					
Vak: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyag nélkül	1	c ₁					
		c ₂					
		átlag, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		átlag, C _{d(t)}					
	átlag, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. A NYERS ADATOK KIÉRTÉKELÉSE:

Lombik száma	Az eredmények kiszámítása	% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) A D₁ és D₂ jelentős különbség esetén nem átlagolható.

Megjegyzés: Hasonló formátumokat lehet használni, ha a lebomlást specifikus elemzéssel követjük, illetve a referenciaanyag és a toxicitási kontrollok esetében.

7. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS (választható)**

	Idő (napokban)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

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

3. függelék

Az elméleti biokémiai oxigénigény kiszámítása

ZÁRT PALACK MÓDSZER

Az MW molekulatömegű $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ anyag EOI értékét a következők szerint kell kiszámítani:

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

Ez a számítás azt jelenti, hogy a C CO_2 -vé, a H H_2O -vé, a P P_2O_5 -vé és a Na Na_2O -vá mineralizálódott. A halogén hidrogén-halogenidként, a nitrogén ammóniaként eliminálódik.

Példa:

Glükóz $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$EOI = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glükóz}$$

Az alkálifémektől eltérő sók molekulatömegének kiszámítása azon a feltételezésen alapul, hogy a sók hidrolizálódtak.

A kénről azt kell feltételezni, hogy +6 állapotba oxidálódik.

Példa:

Nátrium-N-dodecil-benzol-szulfonát $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$EOI = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg anyag}$$

A nitrogéntartalmú anyagok esetében a nitrogén a különböző elméleti biokémiai oxigénigényeknek megfelelően ammóniaként, nitritként, vagy nitrátként eliminálódhat.

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

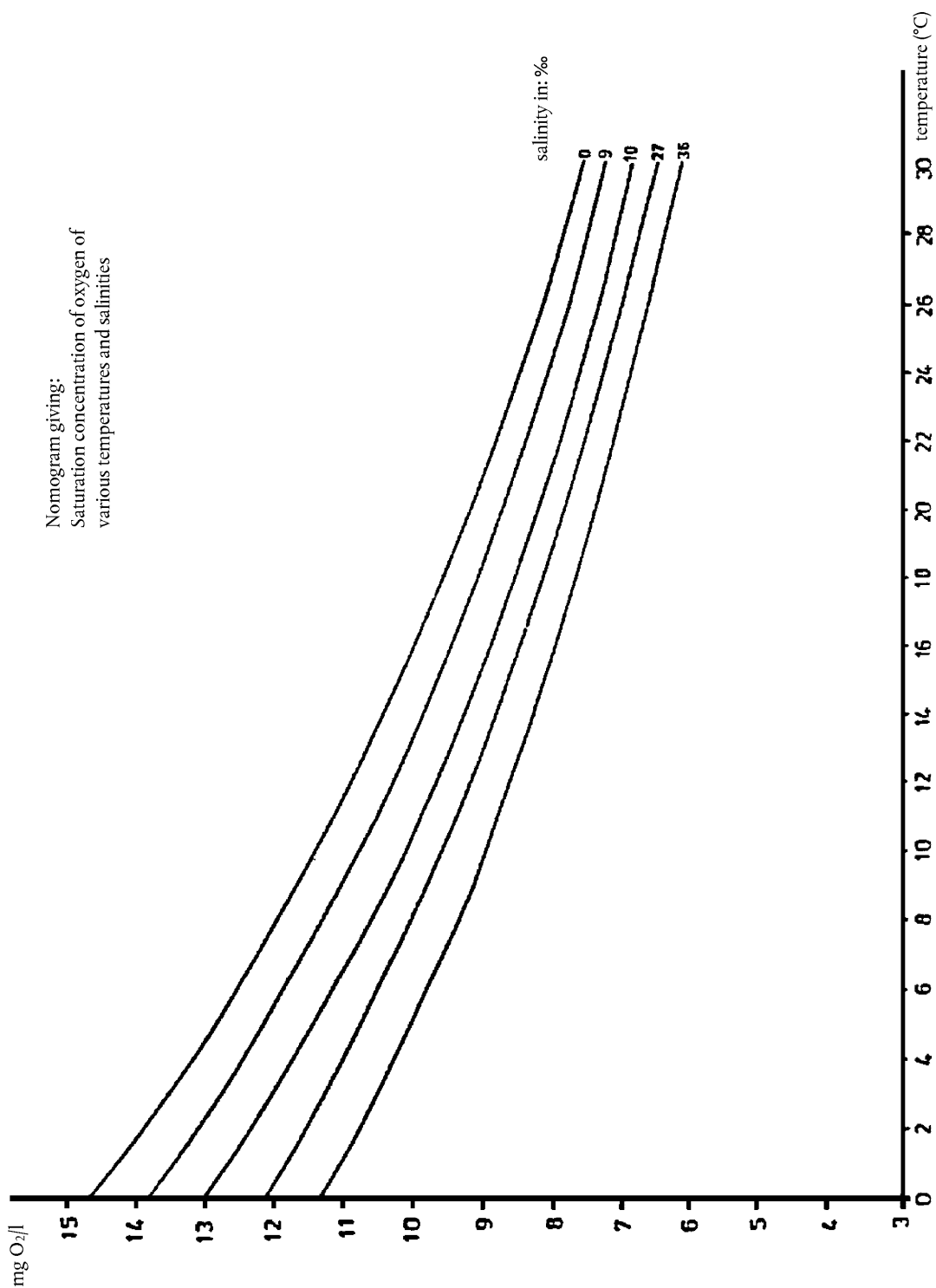
$$EOI_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

Tegyük fel, hogy teljes nitrátképződés volt megfigyelhető analízis útján egy szekunder amin esetében:

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

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

4. függelék



5. függelék

Biológiai lebomlás tengervízben

ZÁRT PALACK MÓDSZER

ADATLAP

1. **LABORATÓRIUM:**
2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA:**
3. **VIZSGÁLT ANYAG:**

Név:

Törzsoldat koncentrációja: mg/l
 Kezdeti konc. tengervíz közegben: mg/l
 EOI vagy KOI: mg O₂/mg vizsgált anyag

4. **TENGERVÍZ:**

Forrás:

Gyűjtés időpontja:

Mintavételi mélység:

Megjelenés a gyűjtés időpontjában (pl. zavaros, stb.):

Sótartalom a gyűjtéskor: ‰
 Hőmérséklet a gyűjtéskor: °C
 DOC »x« órával a gyűjtés után: mg/l

Előkezelés vizsgálat előtt (pl. szűrés, ülepités, érlelés, stb.):

Mikrobiális telepek száma — eredeti minta: telep/ml
 — a vizsgálat kezdetén: telep/ml

Egyéb jellemzők:

5. **VIZSGÁLATI KÖZEG:**

Hőmérséklet levegőztetés után: °C
 O₂ koncentráció levegőztetés után és állás a vizsgálat kezdete előtt: mg O₂/l

6. **OLDOTT OXIGÉN (DO) MEGHATÁROZÁSA:**

Módszer: Winkler/elektróda

	Lombik száma		mg O ₂ /l n nap után			
			0	5	15	28
Vizsgálat: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyaggal	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Vizsgálat átlaga	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Lombik száma		mg O ₂ /l n nap után			
			0	5	15	28
Vakpróba: tápanyag – dúsított tengervíz, de vizsgált anyagot nem tartalmaz	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Vakpróba átlaga	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Megjegyzés: Hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyaghoz és a toxicitási kontrollokhoz is.

7. **DO-FOGYÁS: % LEBOMLÁS (%D):**

	DO-fogyás n nap után		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ ⁽¹⁾			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) \text{ (}^1\text{)}}{\text{vizsgált anyag (mg /l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

⁽¹⁾ Ez azt feltételezi, hogy $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, ahol

$m_{b(0)}$ = vak érték a 0. napon,

$m_{t(0)}$ = vizsgált anyag értéke a 0. napon.

Ha $m_{b(0)}$ nem egyenlő $m_{t(0)}$ -val, használja az $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ képletet, ahol

$m_{b(x)}$ = vak érték az x-edik napon,

$m_{t(x)}$ = vizsgált anyag értéke az x-edik napon.

C.43. SZERVES ANYAGOK ANAEROB BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGA ROTHASZTOTT ISZAPBAN: A GÁZTERMELÉS MÉRÉSÉN ALAPULÓ MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 311. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. Számos szűrővizsgálat létezik a szerves anyagok aerob biológiai lebonthatóságának értékelésére (C.4., C.9., C.10., C.11. vizsgálati módszer (1) és OECD 302C. vizsgálati iránymutatás (2)), és az ezek alkalmazása révén kapott eredményeket sikeresen használják a különféle anyagok sorsának előrejelzésére aerob környezetben, különösen a szennyvízkezelés aerob szakaszában. A vízben oldhatatlan, valamint a szennyvíz szilárd összetevőikhez kötődő anyagok különböző arányban szintén aerob úton bomlanak le, mivel jelen vannak az üleptett szennyvízben. Ezen anyagok nagyobb frakciója azonban a primer üleptett iszaphoz kötődik, amelyet az üleptett – vagy felülúszó – szennyvíz aerob kezelése előtt az üleptető tartályokban elválasztanak a nyers szennyvíztől. Az iszapot – amely az oldható anyagok egy részét a szemcseközi folyadékban tartalmazza – ezután a fűtött rothasztóba juttatják anaerob kezelés céljából. Mivel ez a sorozat még nem tartalmaz vizsgálati módszert az anaerob lebonthatóság értékelésére az anaerob rothasztókban, és ennek a vizsgálatnak a célja pótolni ezt a hiányosságot, a módszer nem feltétlenül alkalmazható más oxigénhiányos környezeti elemekben.
2. A keletkező gáz, elsősorban a metán (CH_4) és a szén-dioxid (CO_2) mennyiségének anaerob körülmények közötti mérésére szolgáló respirometrikus technikákat már sikerrel alkalmazták az anaerob biológiai lebonthatóság értékelésére. Birch és munkatársai (3) felülvizsgálták ezeket az eljárásokat, és arra a következtetésre jutottak, hogy Shelton és Tiedje (4) korábbi vizsgálatokon alapuló (5) (6) (7) munkája volt a legátfogóbb. A módszer (4), amelyet mások továbbfejlesztettek (8) és amerikai szabvánnyá vált (9) (10), nem oldotta meg a CO_2 és CH_4 vizsgálati közegben való eltérő oldhatóságával és a vizsgált anyag elméleti gáztermelésének kiszámításával kapcsolatos problémákat. Az ECETOC-jelentés (3) a felülúszó folyadék oldott szervesen (disszolvált inorganic carbon, DIC) tartalmának kiegészítő mérését ajánlotta, amely lehetővé tette a technika szélesebb körben történő alkalmazását. Az ECETOC-módszert nemzetközi kalibrációs vizsgálatnak (vagy körvizsgálatnak) vetették alá, és ISO-szabvánnyá vált (ISO 11734) (11).
3. Ez az ISO 11734 szabványon alapuló (11) vizsgálati módszer egy olyan szűrési eljárást ismertet, amely szerves anyagok potenciális anaerob biológiai lebonthatóságának értékelésére szolgál adott feltételek mellett (azaz anaerob rothasztóban, adott időpontban és a mikroorganizmusok meghatározott koncentrációtartománya mellett). Mivel olyan hígított iszapot kell használni, amelyben viszonylag magas a vizsgált anyag koncentrációja, és a vizsgálat időtartama általában meghaladja a tartózkodási időt az anaerob rothasztóban, a vizsgálati körülmények nem feltétlenül felelnek meg az anaerob rothasztóban uralkodó feltételeknek, és a módszer a szerves anyagok eltérő környezeti viszonyok közötti anaerob lebonthatóságának értékelésére sem alkalmazható. Az iszap legfeljebb 60 napig van kitéve a vizsgált anyagnak, ami hosszabb, mint az iszap normál tartózkodási ideje (25–30 nap) az anaerob rothasztókban, bár az ipari létesítményekben a tartózkodási idők sokkal hosszabbak is lehetnek. A vizsgálat eredményei alapján nem lehet olyan meggyőző előrejelzéseket tenni, mint az aerob biológiai lebonthatóság esetében, mivel a vizsgált anyagok viselkedésével kapcsolatban a »gyors« aerob vizsgálatok és a szimulációs vizsgálatok keretében, valamint az aerob környezetről gyűjtött adatok elegendőek ahhoz, hogy nagy bizonyossággal meg lehessen állapítani az összefüggést; kevés hasonló adat létezik az anaerob körülmények tekintetében. Teljes anaerob biológiai lebomlást lehet feltételezni az elméleti gáztermelés 75–80 %-ának elérése esetén. Az anyag biomaszához viszonyított magas aránya, amelyet ezekben a vizsgálatokban alkalmaznak, azt jelenti, hogy azok az anyagok, amelyek megfelelőnek bizonyulnak a teszten, nagyobb valószínűséggel bomlanak le egy anaerob rothasztóban. Továbbá azok az anyagok, amelyek nem alakulnak át gázzá a vizsgálatban, nem feltétlenül maradnak meg a környezetileg valóságosabb anyag-biomassa arányok mellett. Ezenkívül egyéb anaerob reakciók is fellépnek, amelyek révén az anyagok legalább részlegesen lebomolhatnak (pl. klórmentesítés), de ez a vizsgálat nem mutatja ki az ilyen reakciókat. A vizsgált anyag meghatározására szolgáló specifikus analitikai módszerekkel azonban az anyag eltűnését ellenőrizni lehet (lásd a 6., 30., 44. és 53. pontot).

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Mosott rothasztott iszapot ⁽¹⁾, amely kis koncentrációban (<10 mg/l) tartalmaz szerves szén (IC), körülbelül tízszeresére hígítunk, hogy 1–3 g/l teljes szilárdanyag-koncentrációt kapjunk, és 35 ± 2 °C-on légmentesen zárt

⁽¹⁾ A rothasztott iszap a szennyvíz üleptett fázisaiból és eleveniszapból álló keverék, amelyeket egy anaerob rothasztóban inkubáltunk körülbelül 35 °C-on az élőanyag-tömeg és a szagproblémák csökkentése, illetve az iszap víztelenítő képességének javítása érdekében. Anaerob fermentáló és metanogén baktériumok társulása, amely szén-dioxidot és metánt termel (11).

edényekben a 20–100 mg C/l tartalmú vizsgált anyaggal együtt legfeljebb 60 napig inkubáljuk. Az iszap aktiválásának mérésére párhuzamosan futó vakpróbákat állítunk be, amelyek iszap oltóanyagot tartalmaznak a közegben, de vizsgált anyagot nem.

5. Az edények fejterében uralkodó nyomás szén-dioxid és metán termeléséből származó növekedését mérjük. Az előállított CO₂ nagy része feloldódik a folyékony fázisban, illetve a vizsgálati körülmények között karbonáttá vagy hidrogén-karbonáttá alakul át. Ezt a szervesetlen szenet mérjük a vizsgálat végén.
6. A vizsgált anyag biológiai lebomlásából származó szén mennyiségét (szervesetlen plusz metán) a vakpróbák értékeit meghaladó nettó gáztermelésből és a folyékony fázisban bekövetkező nettó IC képződésből számítjuk ki. A biológiai lebomlás mértékét a teljes IC és metán-C előállított mennyiségéből számítjuk ki a vizsgált anyagként hozzáadott szén mért vagy számított mennyiségének százalékaként. A biológiai lebomlás menetét csak a gáztermelés köztes mérésével lehet követni. Emellett az elsődleges biológiai lebontást a vizsgálat elején és végén végzett specifikus elemzéssel lehet meghatározni.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált anyag tisztasági, vízdékonysági, illékonyági és adszorpciósi jellemzőit. Ismerni kell a vizsgált anyag tömegszázalékban kifejezett szerves széntartalmát, akár saját kémiai szerkezetéből, akár mérés útján. Illékony vizsgálati anyagok esetében a mért vagy számított Henry-féle állandó segít annak eldöntésében, hogy a vizsgálat alkalmazható-e vagy sem. A vizsgált anyag anaerob baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk hasznos segítséget nyújtanak a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztásában, illetve az alacsony biológiai lebomlási értékek értelmezésében. Javasolt egy gátlási kontroll bevonása, kivéve, ha ismert, hogy a vizsgált anyag nem gátolja az anaerob mikrobiális aktivitást (lásd a 21. pontot és az ISO 13641-1 szabványt (12)).

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

8. A vizsgálati módszer vízben oldódó anyagokra alkalmazható; rosszul oldódó és oldhatatlan anyagokra is lehet alkalmazni, feltéve, hogy pontos adagolási módszert használunk, pl. lásd az ISO 10634 szabványt (13). Illékony anyagoknál általában eseti döntés szükséges. Előfordulhat, hogy speciális intézkedéseket kell tenni, például nem bocsátható ki gáz a vizsgálat alatt.

REFERENCIAANYAGOK

9. Az eljárás ellenőrzése céljából egy referenciaanyagot is vizsgálunk a normál vizsgálati futtatások részeként létrehozott megfelelő párhuzamos edényekben. A referenciaanyagok példái a fenol, a nátrium-benzoát és a polietilén-glikol 400, amelyek várhatóan 60 napon belül az elméleti gáztermelés (azaz a metán és a szervesetlen szén) több mint 60 %-ában lebomlanak (3) (14).

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK REPRODUKÁLHATÓSÁGA

10. A nemzetközi körvizsgálatban (14) a gáznyomás mért eredményei jól reprodukálhatóak voltak a három ismétlésben beállított edények között. A relatív szórás (coefficient of variation, COV) többnyire 20 % alatt volt, bár ez az érték mérgező anyagok jelenlétében, illetve a 60 napos inkubációs időszak vége felé gyakran 20 % fölé emelkedett. Nagyobb eltéréseket is találtak a < 150 ml térfogatú edények esetében. A vizsgálati közeg végső pH-értéke a 6,5–7,0 közötti tartományban volt.

11. A körvizsgálatban a következő eredményeket kapták.

Vizsgált anyag	Összes adat n_1	Átlagos lebomlás (összes adat) (%)	Relatív szórás (összes adat) (%)	Érvényes adatok n_2	Átlagos lebomlás (érvényes adatok) (%)	Relatív szórás (érvényes adatok) (%)	> 60 % lebomlásadatok az érvényes vizsgálatokban n_3
Palmitinsav	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilén Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Az n_2 hányada

12. A palmitinsavval és polietilén-glikol 400-zal kapott összes érték átlagának relatív szórása 45 % ($n = 36$), illetve 35 % ($n = 38$) volt. Ha a < 40 % és > 100 % értékeket kihagyták (az előbbiről feltételezve, hogy a szuboptimális körülmények okozták, az utóbbiról pedig hogy ismeretlen okok), a relatív szórások 26 %-ra és 23 %-ra csökkentek. A legalább 60 %-os lebomlást elérő »érvényes« értékek aránya 70 % volt a palmitinsav és 83 % a polietilén-glikol 400 esetében. A DIC-mérésekből származó százalékos biológiai lebomlási arányok viszonylag alacsonyak, de változók voltak. A palmitinsav esetében a tartomány 0–35 %, az átlag 12 %, a COV 92 %, a polietilén-glikol 400 esetében a tartomány 0–40 %, az átlag 24 %, a COV pedig 54 % volt.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

13. A szokásos laboratóriumi berendezésekre, illetve a következő eszközökre van szükség:

- Inkubátor – szikramentes és 35 ± 2 °C-on ellenőrzött;
- Nyomásálló üvegből készült, megfelelő névleges méretű ⁽¹⁾ vizsgálati edények, amelyek mindegyike olyan légmentesen záró szeptummal van felszerelve, amely képes mintegy 2 bar nyomást megtartani. A fejtér térfogata a teljes térfogat körülbelül 10–30 %-a legyen. Ha a biogázt rendszeresen kiengedjük, körülbelül 10 %-os fejtéri térfogat a megfelelő, de ha a gázt csak a vizsgálat végén bocsátjuk ki, akkor 30 % a megfelelő. Ha a nyomást minden mintavételi időpontban kiengedjük, 125 ml névleges térfogatú és körülbelül 160 ml tényleges térfogatú, sérumszeptumokkal ⁽²⁾ és peremezett alumíniumgyűrűkkel lezárt üveg sérumpalackok ajánlottak;
- Adaptált nyomásmérő eszköz ⁽³⁾, amely lehetővé teszi a termelt gáz mérését és kiengedését, például egy fecskendőtűhöz csatlakoztatott kézi precíziós nyomásmérő; háromutas légmentesen záró szelep teszi lehetővé a túlnyomás kiengedését (1. függelék). A nyomásérzékelő cső és szelep belső térfogatát a lehető legalacsonyabban kell tartani, hogy a készülék térfogatának figyelmen kívül hagyása által okozott hibák elhanyagolhatóak legyenek;

⁽¹⁾ Az ajánlott méret 0,1–1 liter.

⁽²⁾ Légmentesen záró szilikonszeptumok használata ajánlott. Ajánlott továbbá megvizsgálni a kupakok, különösen a butilkaucsukból készült szeptumok gázbiztonságát, mert a kereskedelmi forgalomban kapható számos szeptum nem eléggé légmentes a metánnal szemben, és egyes szeptumok nem maradnak stabilan rögzülve, ha a vizsgálat körülményei között túlvel átszűrjük.

⁽³⁾ A mérőt a gyártó utasításai szerint rendszeres időközönként használni és kalibrálni kell. Ha az előírt minőségű nyomásmérőt használjuk (pl. acél membrán tokkal), akkor nincs szükség kalibrálásra a laboratóriumban. A kalibrálás pontosságát a laboratóriumban 1×10^5 Pa nyomáson mechanikus kijelzővel ellátott nyomásmérő ellenében végzett egypontos méréssel lehet ellenőrizni. Ha ezt a pontot a készülék pontosan méri, a linearitás is változatlan lesz. Ha egyéb mérési eszközöket használunk (a gyártó által hitelesített kalibráció nélkül), a teljes tartományban rendszeres időközönként kalibrációt ajánlott végezni.

Megjegyzés — A leolvasott nyomásértékeket közvetlenül használjuk a fejtérben termelt szén mennyiségének kiszámítására (42–44. pont). Alternatív megoldásként a leolvasott nyomásértékeket egy konverziós grafikon alkalmazásával lehet átszámítani (35 °C-on, légköri nyomáson) az előállított gáz térfogatára. Ezt a grafikont olyan adatokból állítjuk össze, amelyeket ismert mennyiségű nitrogéngáz vizsgálati edények (pl. szérumpalackok) sorozatába 35 ± 2 °C-on történő befecskendezésével és a kapott stabilizált nyomásértékek rögzítésével nyerünk (lásd a 2. függelékét). A számítást a 44. pont megjegyzése mutatja be.

Figyelem — Vigyázzunk, hogy elkerüljük a tűszúrást a mikrofecskendők használata során.

- d) Szénanalizátor, szerveszén 1–200 mg/l tartományban történő közvetlen meghatározására alkalmas;
- e) Nagy pontosságú fecskendők a gáz- és folyadékminták vételéhez;
- f) Mágneses keverők és keverőmagok (választható);
- g) Kesztyűs manipulátor (ajánlott).

Reagensek

14. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket kell használni.

Víz

15. Desztillált vagy ioncserélt víz (kevesebb mint 5 µl/l oxigént tartalmazó nitrogéngáz bevezetése útján oxigénmentesített), amely legfeljebb 2 mg/l oldott szerves szenet (DOC) tartalmaz.

Vizsgálati közeg

16. A oldóközeget úgy készítjük, hogy az alábbi összetevőket tartalmazza a megadott mennyiségben;

Vízmentes kálium-dihidrogén-foszfát (KH ₂ PO ₄)	0,27 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát (Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O)	1,12 g
Ammónium-klorid (NH ₄ Cl)	0,53 g
Kalcium-klorid-dihidrát (CaCl ₂ × 2H ₂ O)	0,075 g
Magnézium-klorid-hexahidrát (MgCl ₂ × 6H ₂ O)	0,10 g
Vas(II)-klorid-tetrahydrát (FeCl ₂ × 4H ₂ O)	0,02 g
Resazurin (oxigénindikátor)	0,001 g
Nátrium-szulfid-nonahidrát (Na ₂ S × 9H ₂ O)	0,10 g
Nyomelem-törzsoldat (választható, 18. pont)	10 ml
Adjon hozzá oxigénmentesített vizet (15)	1 literre

Megjegyzés: Frissen szállított nátrium-szulfidot kell használni, vagy az anyagot felhasználás előtt át kell mosni és meg kell szárítani, hogy biztosított legyen a megfelelő redukív kapacitás. A vizsgálat kesztyűs manipulátor használata nélkül is elvégezhető (lásd a 26. pontot). Ebben az esetben a nátrium-szulfid végső koncentrációját a közegben 0,20 g/l Na₂S · 9H₂O értékre kell növelni. A nátrium-szulfidot megfelelő anaerob törzsoldatból a zárt vizsgálati edények szeptumán keresztül is hozzá lehet adni, mivel ez az eljárás csökkenti az oxidáció kockázatát. A nátrium-szulfidot titán(III)-citráttal lehet helyettesíteni, amelyet a zárt vizsgálati edények szeptumán keresztül lehet hozzáadni 0,8–1,0 mmol/l végső koncentrációban. A titán(III)-citrát egy rendkívül hatékony és alacsony

toxicitású redukálószer, amelyet a következőképpen lehet előállítani: 2,94 g trinátrium-citrát-dihidrátot feloldunk 50 ml oxigénmentesített vízben (hogy 200 mmol/l-os oldatot eredményezzen), és hozzáadunk 5 ml 15 %-os (tömeg/térfogat) titán(III)-klorid oldatot. Nátrium-karbonáttal pH $7 \pm 0,2$ értékre semlegesítjük, és áramló nitrogéngáz alatt megfelelő edénybe adagoljuk. A titán(III)-citrát koncentrációja ebben törzsoldatban 164 mmol/l.

17. A komponenseket a redukálószer (nátrium-szulfid, titán-citrát) kivételével összekeverjük a vizsgálati közeggel, és az oldatot az oxigén eltávolítása érdekében közvetlenül a felhasználás előtt körülbelül 20 percre elárasztjuk nitrogéngázzal. Ezután – közvetlenül a közeg felhasználása előtt – hozzáadjuk a redukálószer megfelelő mennyiségű frissen (oxigénmentesített vízben) készített oldatát. Szükség esetén a közeg pH-ját híg ásványi savval vagy lúggal $7 \pm 0,2$ értékre állítjuk be.

Nyomelem-törzsoldat (választható)

18. Ajánlott, hogy a vizsgálati közeg az anaerob lebomlási folyamatok javítása céljából a következő nyomelemeket tartalmazza, különösen, ha alacsony koncentrációjú (pl. 1 g/l) oltóanyagot használnak (11).

Mangán-klorid-tetrahidrát ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Bórsav (H_3BO_3)	5 mg
Cink-klorid (ZnCl_2)	5 mg
Réz(II)-klorid (CuCl_2)	3 mg
Dinátrium-molibdát-dihidrát ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Kobalt-klorid-hexahidrát ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Nikkel-klorid-hexahidrát ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Dinátrium-szelenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Adjon hozzá oxigénmentesített vizet (15)	1 literre

Vizsgált anyag

19. A vizsgált anyagot törzsoldatként, szuszpenzió vagy emulzió formájában, vagy közvetlenül szilárd vagy folyékony állapotban, vagy üvegszálás szűrőre abszorbeálva adjuk hozzá úgy, hogy a szerves szén koncentrációja legfeljebb 100 mg/l legyen. Ha törzsoldatokat használunk, olyan oldatot készítsünk (nitrogéngáz bevezetésével korábban oxigénmentesített) vízzel (15. pont), amely annyira koncentrált, hogy a hozzáadott térfogat a reakcióelegy teljes térfogatának kevesebb mint 5 %-át tegye ki. Szükség esetén a törzsoldat pH-ját $7 \pm 0,2$ értékre állítjuk be. Vízben rosszul oldódó vizsgált anyagok esetében az ISO 10 634 szabványhoz (13) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványhoz kell fordulni. Amennyiben oldószert alkalmazunk, készítsünk egy további kontrollt is úgy, hogy csak az oldószert adjuk hozzá a beoltott közeghez. Kerülni kell az olyan szerves oldószereket – például a kloroformot és a szén-tetrakloridot –, amelyekről ismert, hogy gátolják a metántermelést.

Figyelmeztetés — Óvatosan bánjon a toxikus vizsgált anyagokkal, illetve azokkal, amelyek tulajdonságai nem ismertek.

Referenciaanyagok

20. A referenciaanyagokat, például a fenolt, a nátrium-benzoátot és a polietilén-glikol 400-at sikeresen alkalmazták az eljárás ellenőrzésére, mivel 60 napon belül 60 %-ot meghaladó mértékben lebomlanak. A kiválasztott referenciaanyagból ugyanúgy készítsünk törzsoldatot (oxigénmentesített vízben), mint a vizsgált anyag esetében, és a pH-t szükség esetén $7 \pm 0,2$ értékre állítjuk be.

Gátlási kontroll (feltételes)

21. Annak érdekében, hogy információkat szerezzünk a vizsgált anyag anaerob mikroorganizmusokra kifejtett toxicitásáról és beazonosítsuk a legmegfelelőbb vizsgálati koncentrációt, adjuk hozzá a vizsgált anyagot és a referenciaanyagot a vizsgálatban használttal megegyező koncentrációban (lásd a 19. és 20. pontot és lásd még az ISO 13641-1 szabványt (12)) egy vizsgálati közeget (lásd 16. pont) tartalmazó edényhez.

Rothasztott iszap

22. A rothasztott iszapot egy olyan szennyvíztisztító telep rothasztójából kell gyűjteni, amely túlnyomórészt háztartási szennyvizet kezel. Az iszapot teljes körben jellemezni, a háttérinformációkat pedig jegyzőkönyvezni kell (lásd 54. pont). Ha adaptált oltóanyagot szándékozunk használni, meg lehet fontolni az ipari szennyvíztisztító üzemből származó rothasztott iszapot is. A rothasztott iszap gyűjtéséhez nagy sűrűségű polietilénből vagy hasonló anyagból készített, tágulásra képes, széles nyakú palackokat használjunk. A palackokat a tetejüktől körülbelül 1 cm-ig töltsük meg iszappal, majd légmentesen – lehetőleg biztonsági szeleppel – zárjuk le. A laboratóriumba való szállítás után a gyűjtött iszap közvetlenül felhasználható, vagy egy laboratóriumi méretű rothasztóban lehet elhelyezni. A felesleges biogázt az iszapos palack óvatos megnyitásával ki kell engedni. Alternatív megoldásként az oltóanyag forrásaként laboratóriumban termesztett anaerob iszapot is lehet használni, de annak aktivitási spektruma korlátozott lehet.

Figyelem – A rothasztott iszap gyúlékony gázokat termel, amelyek tűz- és robbanás veszélyt okoznak; potenciálisan kórokozó mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért az iszap kezeléséhez megfelelő óvintézkedéseket kell tenni. Biztonsági okokból az iszap gyűjtésére ne használjon üvegedényeket.

23. A háttér-gáztermelés, illetve a vakpróbák befolyásának csökkentése érdekében meg lehet fontolni az iszap előrothasztását. Amennyiben előrothasztásra van szükség, az iszap számára legfeljebb 7 napig 35 ± 2 °C hőmérsékletet biztosítunk, tápanyagok vagy szubsztrátumok hozzáadása nélkül. Azt találták, hogy a körülbelül 5 napig tartó előrothasztás általában a kontroll gáztermelésének optimális csökkenését eredményezi a lappangási vagy az inkubációs időszak vizsgálati fázisban mutatkozó elfogadhatatlan növekedése, illetve a kyszámú tesztelt anyag irányában mutatott aktivitás elvesztése nélkül.
24. A nehezen lebontható vagy várhatóan nehezen lebontható vizsgált anyagok esetében a jobban adaptált oltóanyag nyérése érdekében mérlegelni kell az iszap vizsgált anyaggal történő előexpozícióját. Ilyen esetben a vizsgált anyagot 5–20 mg/l szervesszén-koncentráción adjuk hozzá a rothasztott iszaphoz, és maximum 2 hétig inkubáljuk. Az előexponált iszapot használat előtt óvatosan átmoszuk (lásd a 25. pontot), és a vizsgálati jegyzőkönyvben megadjuk az előexpozíció feltételeit.

Oltóanyag

25. Az iszapot az IC koncentrációjának csökkentése céljából közvetlenül használat előtt átmoszuk (lásd a 22. és 24. pontot), hogy az IC koncentrációja a végső vizsgálati szuszpenzióban legfeljebb 10 mg/l legyen. Az iszapot lezárt csövekben centrifugáljuk (pl. 3 000 g, 5 perc), majd a felülúszót elöntjük. A kapott pelletet oxigénmentesített közegben szuszpendáljuk (16. és 17. pont), majd a szuszpenziót ismét centrifugáljuk és a felülúszó folyadékot újból elöntjük. Ha az IC nem csökkent megfelelő mértékben, az iszap mosási eljárását legfeljebb kétszer meg lehet ismételni. Úgy tűnik, hogy ez az eljárás nem befolyásolja hátrányosan a mikroorganizmusokat. Végül a pelletet a szükséges térfogatú vizsgálati közegben szuszpendáljuk, és meghatározzuk az összes szilárd anyag koncentrációját [pl. ISO 11923 (15)]. A szilárd anyagok végső koncentrációja a vizsgálati edényekben az 1–3 g/l tartományban legyen (avagy a hígítatlan rothasztott iszapban lévő érték körülbelül 10 %-a). A fenti műveleteket olyan módon hajtjuk végre, hogy az iszap minimális mértékben érintkezzen oxigénnel (pl. használjunk nitrogénatmoszférát).

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

26. A következő kezdeti eljárásokat olyan technikákkal hajtjuk végre, amelyek a rothasztott iszap és az oxigén közötti érintkezést a lehetséges legalacsonyabb szinten tartják, például szükség lehet arra, hogy egy kesztyűs manipulátorban, nitrogénatmoszférában dolgozzunk és/vagy a palackokat a nitrogénnel megtisztítsuk (4).

A vizsgálatok és a kontrollok előkészítése

27. A vizsgálati edényekből legalább három ismétlést készítünk elő (lásd a 13-b. pontot) a vizsgált anyag, a vakpróbák, a referenciaanyag, a gátlási kontrollok (feltételes) és a nyomáskontroll kamrák esetében (választható eljárás) (lásd a 7., 19. és 21. pontot). További edényeket is elő lehet készíteni az elsődleges biológiai lebontásnak a vizsgált anyag specifikus elemzéseivel segítségével történő értékelése céljából. Ugyanabban a vizsgálatban több vizsgált anyaghoz is lehet ugyanazokat a vakpróbákat használni, feltéve, hogy a fejter térfogata konzisztens.

28. A hígított oltóanyagot az edényekhez – pl. széles szájú pipettával – történő hozzáadás előtt kell elkészíteni. A jól elkevert inokulum (25. pont) olyan alikvot mennyiségeit kell hozzáadni, hogy az összes szilárd anyag koncentrációja minden edényben azonos legyen (1 g/l és 3 g/l között). A vizsgált és a referenciaanyag törzsoldatait a pH szükség esetén $7 \pm 0,2$ értékre történő beállítását követően adjuk hozzá. A vizsgált anyagot és a referenciaanyagot a leginkább megfelelő beviteli útvonalon kell hozzáadni (19).
29. A szerves szén vizsgálati koncentrációja általában 20–100 mg/l között legyen (4. pont). Ha a vizsgált anyag toxikus, a vizsgálati koncentrációt 20 mg C/l-re vagy még alacsonyabb értékre kell csökkenteni, ha csak az elsődleges biológiai lebontást mérjük specifikus elemzésekkel. Meg kell jegyezni, hogy a vizsgálati eredmények szóródása alacsonyabb vizsgálati koncentrációk esetén növekszik.
30. A vak edények esetében a törzsoldat, szuszpenzió vagy emulzió helyett a vizsgált anyag bevitelére használt hordozó ekvivalens mennyiségét adjuk hozzá. Ha a vizsgált anyagot üvegszálból készült szűrők vagy szerves oldószerek használatával vittük be, a vakpróbákhoz hozzáadunk egy szűrőt vagy az elpárolgott oldószert ekvivalens térfogatát. Készíteni kell egy extra ismétlést a vizsgált anyaggal a pH érték mérésére is. Szükség esetén a pH-t kis mennyiségű híg ásványi savval vagy lúggal $7 \pm 0,2$ értékre állítjuk be. Azonos mennyiségű semlegesítő szert kell hozzáadni az összes vizsgálati edényhez. Ezeket a kiegészítéseket elvileg nem kellene megtenni, mivel a vizsgált anyag és a referenciaanyag törzsoldatainak pH-értékét korábban már korrigáltuk (lásd a 19. és 20. pontot). Ha a cél az elsődleges biológiai lebontás mérése, a pH-kontroll edényből vagy egy kiegészítő vizsgálati edényből kell megfelelő mintát venni, és a vizsgált anyag koncentrációját specifikus elemzésekkel kell megmérni. Mágneses keveőmagokat is hozzá lehet adni az edényekhez, ha a reakciókeveréket majd kevergetni kell (választható).
31. Gondoskodni kell arról, hogy a folyadék teljes térfogata (V_1) és a fejtér térfogata (V_h) minden edényben azonos legyen; a V_1 és V_h értékeket fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell. Az edényeket egy gázszeptummal lezárjuk, és átviszük a kesztyűs manipulátorból (lásd a 26. pontot) az inkubátorba (lásd a 13-a pontot).

Oldhatatlan vizsgált anyagok

32. A vízben rosszul oldódó anyagok lemért mennyiségeit közvetlenül az előkészített edényekhez kell hozzáadni. Ha oldószert használata szükséges (lásd a 19. pontot), a vizsgált anyag oldatát vagy szuszpenzióját kell az üres edényekbe átvinni. Az oldószert nitrogéngáznak az edényeken való átáramoltásával lehetőség szerint elpárologtatjuk, majd hozzáadjuk a többi összetevőt, nevezetesen a hígított iszapot (25. pont) és az oxigénmentesített vizet. Kiegészítő oldószeres kontrollt is kell készíteni (lásd a 19. pontot). Az oldhatatlan anyagok hozzáadásának egyéb módszereivel kapcsolatban az ISO 10634 szabvány (13) ad tájékoztatást. Ha a kezdeti pH-érték várhatóan nem haladja meg a 7 ± 1 értéket, a folyékony vizsgált anyagokat fecskendővel is hozzá lehet adni a teljesen előkészített lezárt edényekhez, egyéb esetben a fentebb leírtak szerint kell eljárni (lásd a 19. pontot).

Inkubáció és a gáznyomás mérése

33. Az előkészített edényeket az egyensúlyi állapot beállása érdekében 35 ± 2 °C hőmérsékleten mintegy 1 órán át inkubáljuk, a felesleges gázt pedig kiengedjük légkörbe, például úgy, hogy az edényeket összerázzuk, a nyomásmérő tűjét (13-c. pont) a tömítésen keresztül beszurjuk és a szelepet mindaddig nyitva tartjuk, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat. Ha ebben a szakaszban vagy a köztés mérések alkalmával a fejtér nyomása alacsonyabbnak bizonyul a légköri nyomásnál, nitrogéngázt kell bevezetni a légköri nyomás helyreállítása céljából. A szelepet (lásd a 13-c. pontot) elzárjuk és az inkubálást sötétben folytatjuk, biztosítva, hogy az edények minden része a rohasztási hőmérsékleten legyen. Az edényeket 24–48 órás inkubáció után megvizsgáljuk. Az edényt kivesszük a további vizsgálatokból, ha az edény tartalma a felülülő folyadékban jellegzetes rózsaszín elszíneződést mutat, azaz ha a rezaurin (lásd a 16. pontot) színe megváltozott, ami oxigén jelenlétét jelzi (lásd az 50. pontot). Míg kis mennyiségű oxigént a rendszer esetleg el tud viselni, a magasabb koncentrációk nagymértékben gátolják az anaerob biológiai lebomlás menetét. A három ismétlésből alkalmanként egy-egy edény kivétele még elfogadható, de a hibák ezt meghaladó előfordulási gyakoriságának a kísérleti eljárások vizsgálatához, illetve a vizsgálat megismétléséhez kell vezetnie.

34. Az edények tartalmát legalább hetente 2–3-szor, illetve közvetlenül a nyomásmérések előtt keveréssel vagy néhány percig tartó rázással óvatosan összekeverjük. A rázás újraszuszpendálja az oltóanyagot, és biztosítja a gáznemű anyagok egyensúlyi állapotát. A nyomásméréseket gyorsan kell elvégezni, mert a vizsgálati edények hőmérséklete csökkenhet, ami téves leolvasásokhoz vezet. A nyomás mérése alatt az egész vizsgálati edényt – beleértve a fejteret is – rothasztási hőmérséklen kell tartani. A gáz nyomását például egy nyomásmérőhöz csatlakoztatott fecskendőtünek a szeptumon keresztül történő beszúrásával (13-c. pont) mérjük. Ügyelni kell arra, hogy megakadályozzuk a víz behatolását a fecskendőtübe; ha ez bekövetkezik, a nedves részeket ki kell szárítani, és egy új tűt kell felszerelni. A nyomást millibarban kell mérni (lásd a 42. pontot). A gáz nyomását az edényekben időszakonként (pl. hetente) lehet mérni, illetve a felesleges gázmennyiséget ki lehet bocsátani a légkörbe. Alternatív megoldásként csak a vizsgálat végén kerül sor a nyomás mérése a termelt biogáz mennyiségének megállapítása céljából.
35. Javasolt a gáznyomásról köztes leolvasásokat is végezni, mivel a nyomás növekedése útmutatást nyújt abban a tekintetben, hogy mikor lehet a vizsgálatot befejezni, illetve lehetővé teszi a kinetika nyomon követését is (lásd a 6. pontot).
36. A vizsgálatot általában 60 nap inkubációs idő után fejezzük be, kivéve akkor, ha a nyomásmérésekből nyert biológiai lebomlási görbe korábban elérte a platót; ez az a szakasz, amelyben a maximális lebomlást már sikerült elérni, és a biológiai lebomlási görbe kiegyenlítődött. Ha a plató értéke 60 %-nál alacsonyabb, az értelmezés problematikus, mivel ez azt jelzi, hogy a molekulának csak egy része mineralizálódott, vagy hiba történt. Ha a szokásos inkubációs időszak végén gáz termelődik, de a plató fázisát nyilvánvalóan nem értük el, akkor meg kell fontolni a vizsgálat meghosszabbítását annak ellenőrzésére, hogy a plató (> 60 %) elérhető-e.

A szerveszén mérése

37. A vizsgálat végén – a gáznyomás utolsó mérése után – engedjük az iszapot leülepedni. Egymás után kinyitjuk mindegyik edényt, és azonnal mintát veszünk a szerveszén (IC) koncentrációjának (mg/l) a felülúszó folyadékban történő meghatározása céljából. A felülúszó folyadékon sem centrifugálást, sem szűrést nem szabad alkalmazni, mivel az oldott szén-dioxid elfogadhatatlan veszteséget okozna. Ha a folyadékot a mintavétel után nem lehet haladéktalanul elemezni, a mintát lezárt üvegben, fejtér nélkül, 4 °C-ra lehűtve, maximum 2 napig tároljuk. Az IC mérése után megmérjük és feljegyezzük a pH értékét is.
38. Alternatív megoldásként az IC-t a felülúszóban közvetett módon, az oldott IC szén-dioxidként történő felszabadulása alapján is meg lehet határozni, amely a fejtérben mérhető. A gáznyomás utolsó mérése után a vizsgálati edények nyomását légköri nyomásra állítjuk be. Az edények tartalmát körülbelül pH 1-re savasítjuk tömény ásványi savnak (pl. H₂SO₄) a lezárt edények szeptumán keresztüli hozzáadásával. Az összerázott edényeket 35 ± 2 °C-on körülbelül 24 órán át inkubáljuk, és a képződött szén-dioxidból származó gáznyomást nyomásmérő segítségével megmérjük.
39. Hasonló méréseket kell végezni a megfelelő vakpróbákon, referenciaanyagon és – ha van – a gátlási kontroll edényeken is (lásd a 21. pontot).
40. Egyes esetekben – különösen, ha ugyanazonokat a kontroll edényeket használjuk több vizsgált anyaghoz is – mérlegelni kell, hogy köztes IC-koncentráció-méréseket is végezzünk a vizsgált és a kontroll edényekben. Ebben az esetben elegendő számú edényt kell előkészíteni az összes köztes méréshez. Ezt az eljárást kell előnyben részesíteni azzal a módszerrel szemben, amikor minden mintát egyetlen edényből veszünk. Az utóbbi csak akkor valósítható meg, ha a DIC-elemzéshez szükséges mennyiség nem tekinthető túl magasnak. A DIC-mérést a gáznyomás – felesleges gáz kiengedése nélkül elvégzett – mérése után kell végrehajtani az alábbiakban leírtak szerint:
 - a lehető legkisebb térfogatú felülúszó-mintákat kell venni az edények megnyitása nélkül, a szeptumon keresztül beszúrt fecskendővel, és a mintákban meg kell határozni az IC-t;
 - a mintavétel után a felesleges gázt kiengedjük, vagy nem;

- figyelembe kell venni, hogy a felülúszó térfogatának akár kismértékű csökkenése is (pl. körülbelül 1 %) a fejtér gáztérfogatának (V_h) jelentős növekedését eredményezheti;
- szükség szerint az egyenleteket (lásd a 44. pontot) a V_h 3. egyenletben történő megnövelésével korrigáljuk.

Specifikus elemzések

41. Ha az elsődleges anaerob lebontást (lásd a 30. pontot) kell meghatározni, a specifikus elemzések céljára a vizsgálat elején és végén veszünk megfelelő mennyiségű mintát a vizsgált anyagot tartalmazó edényekből. Ha ez megtörtént, fel kell jegyezni, hogy a fejtér (V_h) és a folyadék (V_f) térfogata megváltozott, és ezt figyelembe kell venni a gázképződés eredményeinek kiszámításakor. Alternatív megoldásként a korábban erre a célra felállított további keverékekből is lehet mintát venni a specifikus elemzések céljára (30).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

42. Gyakorlati okokból a gáz nyomását millibarban ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^2 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), a térfogatot literben, a hőmérsékletet pedig Celsius-fokban mérjük.

Szén a fejtérben

43. Mivel 1 mol metán és 1 mol szén-dioxid egyaránt 12 g szenet tartalmaz, a szén tömege adott térfogatú képződő gázban a következőképpen fejezhető ki:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad [1] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m = a szén tömege (mg) adott térfogatú képződő gázban;

12 = a szén relatív atomtömege;

n = a gáz móljainak száma az adott térfogatban.

Ha jelentős mennyiségű, a metántól és a szén-dioxidtól elérő gáz (pl. N_2O) keletkezik, az [1] egyenletet módosítani kell, hogy alkalmas legyen a képződő gázok lehetséges hatásainak leírására.

44. A gáztörvényekből n a következőképpen fejezhető ki:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad [2] \text{ egyenlet}$$

ahol:

p = a gáz nyomása (Pa);

V = a gáz térfogata (m^3);

R = az egyetemes gázállandó: $8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$;

T = az inkubációs hőmérséklet (kelvin).

Az [1] és a [2] egyenlet kombinációjával, illetve a vakpróba gáztermelésének figyelembevételét célzó ésszerűsítéssel:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad [3] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m_h = a fejtérben gázként termelődött nettó szén tömege (mg);

Δp = a vizsgálati edények kezdeti és végső nyomásértékei közötti különbség átlaga mínusz a vak edények megfelelő átlaga (millibar);

V_h = az edény fejterének térfogata (l);

0,1 = a newton/ m^2 -t millibarra és a m^3 -t literre átváltó szorzó.

35 °C (308 K) normál inkubációs hőmérséklet esetén a [4] egyenletet kell alkalmazni:

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad [4] \text{ egyenlet}$$

Megjegyzés: Alternatív térfogatszámítás. A nyomásmérő leolvasott értékeit a képződő gáz egységnyi ml-jére konvertáljuk egy olyan standard görbe alkalmazásával, amelyet a befecskendezett térfogatnak (ml) a mérő által mutatott érték függvényében történő ábrázolásával kaptunk (2. függelék). Az edények fejrészében lévő gáz móljainak számát (n) úgy számítjuk ki, hogy az összesített gáztermelést (ml) elosztjuk 25 286 ml/mol-lal, amely az egy mól gáz által 35 °C-on és normál légköri nyomáson elfoglalt térfogat. Mivel 1 mól CH_4 és 1 mól CO_2 egyaránt 12 g szén tartalmaz, a szén mennyiségét (m , mg) a fejtérben (m_h) az [5] egyenlet adja meg:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad [5] \text{ egyenlet}$$

A vakpróba gáztermelésének figyelembevételét célzó ésszerűsítés után:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad [6] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m_h = a fejtérben gázként képződött nettó szén tömege (mg);

ΔV = a vizsgálati edények és a vakpróbaedények fejterében képződött gázmennyiség térfogatkülönbségének átlaga;

25 286 = 1 mol gáz által elfoglalt térfogat 35 °C-on, 1 atmoszféra nyomáson.

45. A biológiai lebomlás menetét szükség esetén a D_p kumulált nyomásemelkedés (millibar) idő függvényében történő ábrázolásával lehet nyomon követni. E görbéből azonosítjuk és feljegyezzük a lappangási fázist (nap). A lappangási fázis a vizsgálat kezdetétől a jelentős bomlás kezdetéig tartó időszak (például lásd a 3. függelék). Amennyiben a felülúszóból köztes mintákat vettünk és elemeztük azokat (lásd a 40., 46. és 47. pontot), a kumulált nyomásemelkedés helyett a teljes megtermelt C mennyiségét (gáz plusz a folyadékban lévő) lehet ábrázolni.

Szén a folyadékban

46. A folyadékban lévő metán mennyiségét elhanyagoljuk, mert ismeretes, hogy a metán vízben való oldhatósága nagyon alacsony. A vizsgálati edényekben lévő folyadékban található szervesetlen szén tömegének kiszámításához a [7] egyenlet használható:

$$m_l = C_{\text{net}} \times V_l \quad [7] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m_l = a szervesetlen szén tömege a folyadékban (mg);

C_{net} = a szervesetlen szén koncentrációja a vizsgálati edényekben mínusz a kontrollédényekben a vizsgálat végén (mg/l);

V_l = a folyadék térfogata az edényben (l).

Összes gázzá alakított szén

47. A gázzá alakított szén teljes tömegét az edényben a [8] egyenlet használatával kell kiszámítani:

$$m_t = m_h + m_l \quad [8] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m_t = a gázzá alakított szén teljes tömege (mg);

m_h és m_l a fentiek szerint meghatározott mennyiségek.

A vizsgált anyag széntartalma

48. A hozzáadott vizsgált anyagból származó szén tömegét a vizsgálati edényekben a [9] egyenlet felhasználásával számítjuk ki:

$$m_v = C_c \times V_l \quad [9] \text{ egyenlet}$$

ahol:

m_v = a vizsgált anyag széntartalmának tömege (mg);

C_c = a vizsgált anyagból származó szén koncentrációja a vizsgálati edényben (mg/l);

V_l = a folyadék térfogata a vizsgálati edényben (l).

A biológiai lebomlás mértéke

49. A fejtérben lévő gázból történő százalékos biológiai lebomlást a [10] egyenlet, a teljes százalékos biológiai lebomlást a [11] egyenlet alkalmazásával számítjuk ki:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad [10] \text{ egyenlet}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad [11] \text{ egyenlet}$$

ahol:

D_h = a biológiai lebomlás a fejtérben lévő gázból (%);

D_t = a teljes biológiai lebomlás (%);

m_h , m_v és m_t a fentiek szerint meghatározott mennyiségek.

Az elsődleges biológiai lebontás mértékét a vizsgált anyag koncentrációjának az inkubálás elején és végén történő (választható) méréséből számítjuk ki a [12] egyenlet alkalmazásával:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad [12] \text{ egyenlet}$$

ahol:

D_p = a vizsgált anyag elsődleges lebomlása (%);

S_i = a vizsgált anyag kezdeti koncentrációja (mg/l);

S_e = a vizsgált anyag végső koncentrációja (mg/l).

Ha az analitikai módszer a vizsgált anyag jelentős koncentrációját jelzi a nem módosított anaerob iszap oltóanyagban, a [13] egyenletet kell használni:

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

ahol:

D_p^1 = a vizsgált anyag korrigált elsődleges lebomlása (%);

S_{ib} = a vizsgált anyag kezdeti »látszólagos« koncentrációja a vakpróbákban (mg/l);

S_{eb} = a vizsgált anyag végső »látszólagos« koncentrációja a vakpróbákban (mg/l).

Az eredmények érvényessége

50. Csak az olyan edényekből származó leolvasott nyomásértékeket szabad felhasználni, amelyek nem mutatnak rózsaszín elszíneződést (lásd a 33. pontot). Az oxigénszennyeződés megfelelő anaerob kezelési technikák használatával minimalizálható.
51. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a referenciaanyag elér egy legalább 60 %-os biológiai lebomlásnak megfelelő platót. (1)
52. Ha a pH a vizsgálat végén túllépte a 7 ± 1 tartományt és elégtelen biológiai lebomlás következett be, a vizsgálatot a közeg megnövelt pufferkapacitásával meg kell ismételni.

(1) Ezt újra kell értékelni, ha adszorpciós és oldhatatlan referencia-vegyianyagokat használunk.

A lebomlás gátlása

53. A vizsgált anyagot és a referenciaanyagot egyaránt tartalmazó edényekben a gáztermelésnek legalább ugyanakkorának kell lennie, mint a csak referenciaanyagot tartalmazó edényekben; az ettől eltérő eseteket a gáztermelés gátlásának kell tekinteni. Egyes esetekben a vizsgált anyagot a referenciaanyag nélkül tartalmazó edényekben a gáztermelés alacsonyabb lesz, mint a vakpróbákban, ami a vizsgált anyag gátló hatását jelzi.

Vizsgálati jegyzőkönyv

54. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

- közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok;
- a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződései).

Vizsgálati feltételek:

- a hígított rothasztó folyadék térfogata (V_1) és a fejtér térfogata (V_H) az edényben;
- a vizsgálati edények leírása, a biogáz mérés (pl. a nyomásmérő típusa) és az IC-analizátor fő jellemzői;
- a vizsgált anyag és referenciaanyag bevitele a vizsgálati rendszerbe: az alkalmazott vizsgálati koncentrációk és az oldószerek használata;
- az alkalmazott oltóanyag részletes jellemzése: a szennyvíztisztító telep neve, a kezelt szennyvíz forrásának leírása (pl. működési hőmérséklet, iszaptartózkodási idő, túlnyomórészt háztartási stb.), koncentráció, minden ennek alátámasztásához szükséges információ, és az inokulum előkezelésére vonatkozó információk (pl. előemésztés, előexpozíció);
- inkubálási hőmérséklet,
- ismétlések száma.

Eredmények:

- pH- és IC-értékek a vizsgálat végén;
- a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálat elején és végén, ha specifikus mérések történtek;
- a vizsgálati, vakpróba-, referenciaanyag- és gátlásikontroll-edényekben gyűjtött összes mért adat megfelelő módon (pl. nyomás millibarban, szerves szén koncentráció (mg/l)), táblázatos formában (a fejtér és a folyadék vonatkozásában mért adatokat külön kell megadni);
- az adatok statisztikai kezelése, a vizsgálat időtartama, valamint a vizsgált anyag, a referenciaanyag és a gátlási kontroll biológiai lebomlásának grafikonja;
- a vizsgált anyag és a referenciaanyag százalékos biológiai lebomlása;
- a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka;
- az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

- (1) E melléklet következő fejezetei:

C.4., A »gyors« biológiai lebonthatóság meghatározása;

C.9, Biológiai lebomlás – Zahn-Wellens vizsgálat;

C.10, Szimulációs vizsgálat – Aerob szennyvízkezelés;

A: Eleveniszapos berendezések, B: Biofilmek

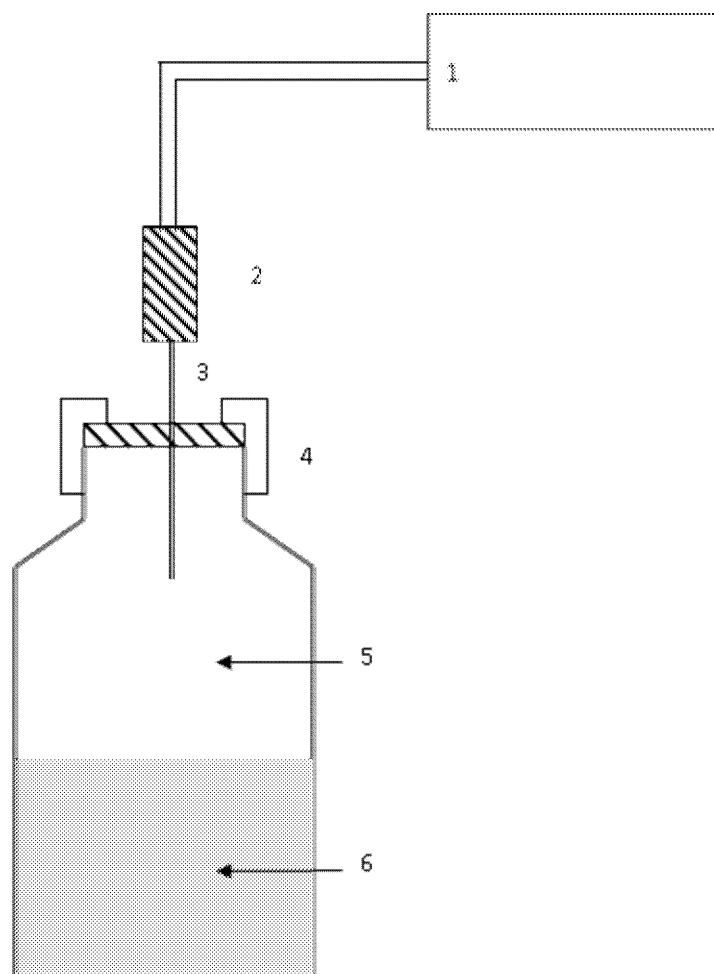
C.11, Biológiai lebomlás – Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata

- (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. *Toxic. Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
 - (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.
 - (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

1. függelék

Példa a biogáztermelést gáznyomás útján mérő készülékre



Jelmagyarázat:

- 1 – Nyomásmérő
- 2 – Háromutas légmentesen záró szelep
- 3 – Injekciós tű
- 4 – Légmentesen záró tömítés (peremezett sapka és szeptum)
- 5 – Fejtér (V_h)
- 6 – Rothasztott iszap oltóanyag

Vizsgálati edények 35 ± 2 °C-os környezetben

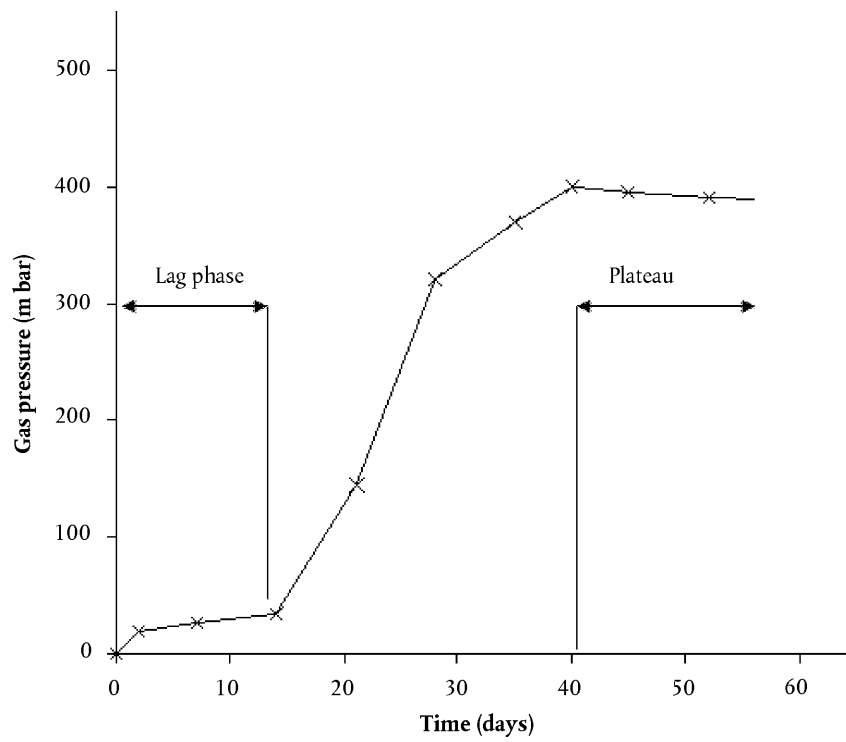
*2. függelék***A mért nyomásértékek konverziója**

A nyomásmérőn leolvasott értékeket a gázmennyiségekkel egy standard görbe segítségével lehet kapcsolatba hozni, amelyet ismert térfogatú 35 ± 2 °C hőmérsékletű levegőnek a reakcióeleggyel (V_R) megegyező térfogatú vizet tartalmazó szérumpalackokba történő befecskendezésével lehet előállítani:

- V_R ml alikvot mennyiségű vizet töltünk öt db 35 ± 2 °C hőmérsékleten tartott szérumpalackba. A palackokat lezárjuk és 1 órára 35 ± 2 °C hőmérsékletű vízfürdőbe helyezjük, hogy egyensúlyi állapotba kerüljenek;
- Bekapcsoljuk a nyomásmérőt és megvárjuk, amíg stabilizálódik, majd nullára állítjuk;
- A fecskendőtűt átszűrjük az egyik palack tömítésén, kinyitjuk a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, majd újra elzárjuk a szelepet;
- Az eljárást megismételjük a többi palackkal is;
- Minden palackba 1 ml 35 ± 2 °C hőmérsékletű levegőt injektálunk. A tűt (a mérőre csatlakoztatva) átszűrjük az egyik palack tömítésén, és megvárjuk, amíg a nyomás stabilizálódik. Feljegyezzük a nyomást, és kinyitjuk a szelepet, amíg a nyomás nullát nem mutat, majd újra elzárjuk a szelepet;
- Az eljárást megismételjük a többi palackkal is;
- A teljes fenti eljárást megismételjük 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, és 50 ml levegővel is;
- Felvesszük a nyomás (Pa) konverziós görbét a beadott gázmennyiség (V_b , ml) függvényében. Az eszköz válasza lineáris a 0–70 000 Pa és a 0–50 ml gáztermelés tartományban.

3. függelék

Példa a lebomlási görbére (kumulált nettó nyomásnövekedés)



4. függelék

Példa az anaerob biológiai lebomlási vizsgálat adatlapjaira – A vizsgált anyag adatlapja

Laboratórium: Vizsgált anyag: Vizsgálat száma:
 Vizsgálati hőmérséklet (°C): Fejtér térfogata (V_h):(l) Folyadék térfogata (V_f): (l)
 Szén a vizsgált anyagban $C_{c,v}$: (mg/l) m_v (1): (mg)

Nap	p_1 (vizsgálat) (mbar)	p_2 (vizsgálat) (mbar)	p_3 (vizsgálat) (mbar)	p (vizsgálat) átlag (mbar)	p_4 (vakpróba) (mbar)	p_5 (vakpróba) (mbar)	p_6 (vakpróba) (mbar)	p (vakpróba) átlag (mbar)	p (nettó) vizsgálat – vakpróba átlag (mbar)	Δp (nettó) Kumulált érték (mbar)	m_h fejtér C (2) (mg)	D_h Biológiai lebomlás (3) (%)
	$C_{IC,1}$ vizsgálat (mg)	$C_{IC,2}$ vizsgálat (mg)	$C_{IC,3}$ vizsgálat (mg)	C_{IC} vizsgálat átlaga (mg)	$C_{IC,4}$ vakpróba (mg)	$C_{IC,5}$ vakpróba (mg)	$C_{IC,6}$ vakpróba (mg)	C_{IC} vakpróba átlaga (mg)	$C_{IC,net}$ vizsgálat – vakpróba átlag (mg)	m_f folyadék C (4) (mg)	m_t összes C (5) (mg)	D_t Biológiai lebomlás (6) (%)
IC (végső)												
pH (végső)												

(1) Szén a vizsgálati edényben, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_f$
 (2) Szén a fejtérben, m_h (mg) normál inkubációs hőmérsékleten (35 °C): $m_h = 0,468\Delta p \times V_h$
 (3) Biológiai lebomlás a fejtérben lévő gáz alapján meghatározva, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
 (4) Szén a folyadékban, m_f (mg): $m_f = C_{IC,net} \times V_f$
 (5) Összes gázzá alakított szén, m_t (mg): $m_t = m_f + m_h$
 (6) Teljes biológiai lebomlás, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

Laboratórium: Referenciaanyag: Vizsgálat száma:
 Vizsgálati hőmérséklet (°C): Fejtér térfogata (V_h): (l) Folyadék térfogata (V_f) (liter):
 Szén a referenciagyagban $C_{c,v}$ (mg/l): m_v ⁽¹⁾ (mg):

Nap	p_1 (referencia) (mbar)	p_2 (referencia) (mbar)	p_3 (referencia) (mbar)	p (referencia) átlag (mbar)	p_4 (gátlás) (mbar)	p_5 (gátlás) (mbar)	p_6 (gátlás) (mbar)	p (gátlás) átlag (mbar)	p (referencia) referencia – vakpróba (mbar)	Δp (referencia) kumulált (mbar)	m_h fejtér C ⁽²⁾ (mg)	D_h Biológiai lebomlás ⁽³⁾ (%)
	$C_{ic,1}$ referencia (mg)	$C_{ic,2}$ referencia (mg)	$C_{ic,3}$ referencia (mg)	C_{ic} referencia átlaga (mg)	$C_{ic,4}$ gátlás (mg)	$C_{ic,5}$ gátlás (mg)	$C_{ic,6}$ gátlás (mg)	C_{ic} gátlás átlaga (mg)	$C_{ic,net}$ referencia – gátlás (mg)	m_f folyadék C ⁽⁴⁾ (mg)	m_t összes C ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Biológiai lebomlás ⁽⁶⁾ (%)
IC (végső)												
pH (végső)												

⁽¹⁾ Szén a vizsgálati edényben, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_f$

⁽²⁾ Szén a fejtérben, m_h (mg) normál inkubációs hőmérsékleten (35 °C): $m_h = 0,468\Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Biológiai lebomlás a fejtérben lévő gáz alapján meghatározva, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

⁽⁴⁾ Szén a folyadékban, m_f (mg): $m_f = C_{ic,net} V_f$

⁽⁵⁾ Összes gázzá alakított szén, m_t (mg): $m_t = m_h + m_f$

⁽⁶⁾ Teljes biológiai lebomlás, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

C.44. KIMOSÓDÁS TALAJOSZLOPOKBAN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 312. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A mesterséges vegyi anyagok közvetlenül, szándékos alkalmazás révén (pl. mezőgazdasági vegyszerek), vagy közvetett útvonalakon (pl. szennyvíz → szennyvíziszap → talaj vagy levegő → nedves/száraz ülepedés) kerülhetnek be a talajba. E vegyi anyagok kockázatértékeléséhez fontos megbecsülni a talajban való átalakulásra, illetve a mélyebb talajrétegek és végül a talajvíz irányába történő mozgásra (kimosódás) vonatkozó potenciáljukat.
2. Számos módszer áll rendelkezésre a vegyi anyagok talajbeli kimosódási potenciáljának ellenőrzött laboratóriumi körülmények között történő mérésére, pl. a talaj vékonyréteg-kromatográfia, a talaj vastagréteg-kromatográfia, a talaj-oszlopkromatográfia, és az adszorpciós-deszorpciós mérések (1) (2). A nem ionizált vegyi anyagok esetében az n-oktanol-víz megoszlási hányados (P_{ow}) lehetővé teszi az adszorpciós és a kimosódási potenciál korai becslését (3) (4) (5).
3. A jelen vizsgálati módszerben leírt eljárás bolygatott talajban végzett talaj-oszlopkromatográfián alapul (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben). Kétféle kísérletet hajtunk végre: (i) a vizsgált vegyi anyag kimosódási potenciáljának és (ii) az átalakulási termékek kimosódási potenciáljának (érlelt maradványokkal végzett vizsgálat) talajokban, ellenőrzött laboratóriumi körülmények között történő meghatározása⁽¹⁾. A vizsgálati módszer meglévő módszereken alapul (6) (7) (8) (9) (10) (11).
4. A talajok/üledékek kiválasztásával foglalkozó OECD Workshopon (Belgirate, Olaszország, 1995.) (12) megállapodás született az e vizsgálati módszerben használandó talajok számát és típusát illetően. Ajánlásokat tettek a talajminták kimosódási kísérletek céljából történő gyűjtése, kezelése és tárolása tekintetében is.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

5. Megfelelően inert anyagból (pl. üveg, rozsdamentes acél, alumínium, teflon, PVC stb.) készült oszlopokat megtöltünk talajjal, majd »mesterséges eső« oldattal (a fogalmak meghatározását lásd az 1. függelékben) telítjük és egyensúlyba hozzuk, ezt követően pedig hagyjuk az oldatot kicsorogni belőle. Ezután a talajoszlopok felületét a vizsgált vegyi anyaggal és/vagy a vizsgált vegyi anyag érlelt maradványaival kezeljük. A talajoszlopokat ezután mesterséges esőnek tesszük ki, és összegyűjtjük a csurgalékvizet. A kimosódási folyamat után az oszlopokból eltávolítjuk a talajt, és – a vizsgálatról elvárt információktól függően – megfelelő számú szegmensre osztjuk. A talajszegmenseket és a csurgalékvizet ezután analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, illetve – adott esetben – az átalakulási termékekre vagy az érdeklődésre számot tartó egyéb vegyi anyagokra.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

6. A módszer olyan (nem jelölt vagy radioaktív izotóppal – pl. ^{14}C -vel – jelölt) vizsgált vegyi anyagokra alkalmazható, amelyek kimutatására megfelelő pontosságú és érzékenységu analitikai módszer áll rendelkezésre. A vizsgálati módszer nem alkalmazható olyan vegyi anyagok esetében, amelyek talajból és vízből illékonyak, és így a vizsgálati eljárás kísérleti körülményei között nem maradnak meg a talajban és/vagy a csurgalékvízben.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A kimosódás talajoszlopokban történő mérésére nem jelölt vagy radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagokat lehet használni. Radioaktív izotóppal jelölt anyagra van szükség az átalakulási termékek (a vizsgált vegyi anyag érlelt maradványai) kimosódásának vizsgálatához és a tömegegyensúly meghatározásához. ^{14}C -vel való jelölés ajánlott, de egyéb izotópok, például ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P is hasznosak lehetnek. Amennyire csak lehet, a jelölést a molekula legstabilabb részében vagy részeiben kell elhelyezni. A vizsgált vegyi anyag tisztasága legalább 95 % legyen.
8. A legtöbb vegyi anyagot önálló anyagként kell alkalmazni. A növényvédő szerek hatóanyagai esetében azonban a formulázott termékeket is használni lehet a kiindulási vizsgált anyag kimosódásának vizsgálatára, és a formulázott termékek vizsgálata különösen fontos akkor, ha a keverék valószínűleg befolyásolja a kibocsátás mértékét (pl. szemcsés vagy szabályozott hatóanyag-leadású készítmények). A vizsgálat elvégzése előtt hasznos lehet konzultálni a szabályozó hatósággal a keverékek vizsgálati tervet érintő különleges követelményei tekintetében. Az érlelt maradványok kimosódási vizsgálatai esetében tiszta kiindulási vizsgált anyagot kell használni.

⁽¹⁾ A növényvédelmi termékekkel végzett oszlopkimosódási vizsgálatok mobilitási információt nyújthatnak a vizsgált vegyi anyagról és átalakulási termékeiről, illetve kiegészíthetik a tétel szorpciós vizsgálatokat.

9. A kimosódási vizsgálat talajoszlopban történő elvégzését megelőzően a következő információknak kell rendelkezésre állnia a vizsgált vegyi anyagra vonatkozóan:
- (1) vízben való oldhatóság [A.6. vizsgálati módszer] (13);
 - (2) szerves oldószerekben való oldhatóság;
 - (3) gőznyomás [A.4. vizsgálati módszer] (13) és Henry-féle állandó;
 - (4) n-oktanol/víz megoszlási hányados [A.8. és A.24. vizsgálati módszer] (13);
 - (5) adszorpciós együttható (K_d , K_f vagy K_{oc}) [C.18. és/vagy C.19. vizsgálati módszer] (13);
 - (6) hidrolízis [C.7. vizsgálati módszer] (13);
 - (7) disszociációs állandó (pK_a) [OECD 112. vizsgálati iránymutatás] (25);
 - (8) aerob és anaerob átalakulás talajban [C23. vizsgálati módszer] (13)
- Megjegyzések:* A hőmérsékletet, amelynél ezeket a méréseket végeztük, fel kell tüntetni az adott vizsgálati jegyzőkönyvben.
10. A talajoszlopokon alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye az alkalmazott dózis legalább 0,5 %-ának kimutatását bármely szegmensben. A növényvédő szerekben lévő hatóanyagok esetében az alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyisége megfelelhet a maximális ajánlott használati aránynak (egyszeri alkalmazás).
11. Rendelkezésre kell állnia olyan analitikai módszernek, amely ismert pontossággal, precizitással és érzékenységgel bír a vizsgált vegyi anyag és – szükség esetén – átalakulási termékei talajban és csurgalékvízben történő mennyiségi meghatározására. Szintén ismerni kell a vizsgált vegyi anyag és jelentős átalakulási termékei (általában legalább az összes olyan átalakulási termék, amelyekből a vegyi anyag alkalmazott adagja ≥ 10 %-ának megfelelő mennyiséget figyeltek meg az átalakulási útvonalakat elemző vizsgálatokban, de lehetőleg minden aggodalomra okot adó lényeges átalakulási termék) analitikai kimutathatósági határát (lásd a 17. pontot).

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. Ismert kimosódási viselkedésű referencia-vegyianyagokat – mint az atrazin vagy monuron, amelyek a terepen közepesen kimosódnak tekinthetők – kell alkalmazni a vizsgált vegyi anyag talajban mutatott relatív mobilitásának értékelésére (1) (8) (11). Egy nem szorbeálódó és nem lebomló poláris referencia-vegyianyag (pl. trícium, bromid, fluoreszcein, eozin) alkalmazása is hasznos lehet a víz oszlopban való mozgásának nyomon követésére, amellyel igazolni lehet a talajoszlop hidrodinamikai tulajdonságait.
13. Az analitikai szabvány vegyi anyagok is hasznosak lehetnek a talajszegmensekben és a csurgalékvízben talált transzformációs termékek jellemzésére és/vagy azonosítására kromatográfias, spektroszkópiai vagy más vonatkozó módszerekkel.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

14. Lásd a 1. függelékét.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

Visszanyerés

15. A kimosódási vizsgálatban a visszanyerést a kimosódást követően a vizsgált vegyi anyagnak a talajszegmensekben és az oszlop csurgalékvízben talált százalékainak összege adja meg. A visszanyerésnek a 90–110 % tartományban kell lennie a radioaktív izotóppal jelölt vegyi anyagok (11), illetve 70–110 % között a nem jelölt vegyi anyagok esetében (8).

Az analitikai módszer ismételhetsége és érzékenysége

16. A vizsgált vegyi anyag és átalakulási termékeinek mennyiségi meghatározására használt analitikai módszer ismételhetségét a talajszegmens vagy csurgalékvíz ugyanazon kivonatának párhuzamos elemzésével lehet ellenőrizni (lásd a 11. pontot).

17. A vizsgált vegyi anyag és az átalakulási termékek analitikai módszerének kimutatási határértéke (limit of detection, LOD) legalább 0,01· mg/kg legyen minden talajszegmensben vagy csurgalékvízben (a vizsgált vegyi anyagra vonatkoztatva), illetve az alkalmazott dózis 0,5 %-a bármely szegmensben (amelyik az alacsonyabb). A mérhetőségi határértéket (limit of quantification, LOQ) is meg kell határozni.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati rendszer

18. A vizsgálatban megfelelően inert anyagból (például üveg, rozsdamentes acél, alumínium, teflon, PVC stb.) készült, részekre bontható vagy nem részekre bontható kimosódási oszlopokat használunk, amelynek belső átmérője legalább 4 cm, magassága pedig legalább 35 cm. Az oszlopok anyagait meg kell vizsgálni a vizsgált vegyi anyaggal és/vagy az átalakulási termékekkel való lehetséges kölcsönhatások szempontjából. A részekre bontható és a nem részekre bontható oszlopokra példákat a 2. melléklet tartalmaz.
19. A talajoszlopok feltöltésére és tömörítésére kanalat, dugattyút és vibrációs berendezéseket használunk.
20. A mesterséges eső talajoszlopokon történő alkalmazására dugattyús vagy perisztaltikus szivattyúkat, zuhanyfejeket, Mariotte-palackokat vagy egyszerű csepegtető tölcséreket lehet használni.

Laboratóriumi berendezések és vegyi anyagok

21. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:
- (1) analitikai eszközök, mint például GLC-, HPLC-, TLC-berendezés, beleértve a jelölt és nem jelölt vegyi anyagok elemzésére alkalmas, illetve az inverz izotóphígítási módszerben szükséges kimutatási rendszereket;
 - (2) az anyagok azonosítására alkalmas eszközök (pl. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, stb.);
 - (3) folyadékszintillációs számláló a radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagokhoz;
 - (4) oxidáló a jelölt vegyi anyag elégetéséhez;
 - (5) extrakciós készülék (például centrifugacsövek a hideg extrakcióhoz és Soxhlet-készülék a reflux alatti folyamatos extrakcióhoz);
 - (6) műszerek az oldatok és kivonatok koncentrálására (pl. rotációs bepárló).
22. A felhasznált vegyszerek a következők: szerves oldószerek, analitikai tisztaságú, mint az acetone, metanol stb.; szcintillációs folyadék; 0,01 mólos CaCl₂-oldat desztillált vagy ioncserélt vízben (= mesterséges eső).

Vizsgált vegyi anyag

23. A vizsgált vegyi anyagot a talajoszlopra történő felvitelhez ioncserélt vagy desztillált vízben fel kell oldani. Ha a vizsgált vegyi anyag rosszul oldódik vízben, akkor formulázott terméként (szükség esetén vízben szuszpendálva vagy emulgeálva) vagy bármely szerves oldószerben feloldva lehet alkalmazni. Abban az esetben, ha szerves oldószert használunk, annak mennyiségét minimális szinten kell tartani és a kimosódási eljárás megkezdése előtt a talajoszlop felszínéről el kell párologtatni. A szilárd készítményeket – például a granulátumokat – víz nélkül, szilárd formában kell alkalmazni; a talajoszlop felületén való jobb eloszlás érdekében a formulázott terméket az alkalmazás előtt el lehet keverni kis mennyiségű (pl. 1 g) kvarchomokkal.
24. A talajoszlopokon alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye az alkalmazott dózis legalább 0,5 %-ának kimutatását bármely szegmensben. A növényvédő szerekben lévő hatóanyagok esetében ez a mennyiség a maximális ajánlott használati arányon alapulhat (egyszeri kijuttatási arány), és – a kiindulási és az érlelt anyag kimosódása esetében egyaránt – a használt talajoszlop felületéhez kell viszonyítani ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ A hengeres talajoszlopokon alkalmazandó mennyiséget a következő képlettel lehet kiszámítani:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

ahol:

M = oszloponként alkalmazott mennyiség [μg]

A = kijuttatási arány [kg/ha]

d = talajoszlop átmérője [cm]

π = 3,14

Referencia-vegyianyag

25. A kimosódási vizsgálatokban referencia-vegyianyagot kell használni (lásd a 12. pontot). A referencia-vegyianyagot a vizsgált vegyi anyaghoz hasonló módon kell felvinni a talajoszlop felületére, olyan arányban, amely lehetővé teszi a megfelelő szintű kimutatást, akár belső standardként a vizsgált vegyi anyaggal együtt azonos talajoszlopon, akár önállóan egy külön talajoszlopon alkalmazva. Előnyös, ha mindkét vegyi anyagot ugyanazon az oszlopon futtatjuk, kivéve, ha a két vegyi anyag hasonlóképpen jelölt.

Talajok

A talaj kiválasztása

26. A kiindulási vegyi anyaggal végzett kimosódási vizsgálatokhoz 3–4 eltérő pH-jú, szerves széntartalmú és szerkezetű talajt kell használni (12). A kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatás az alábbi 1. táblázatban található. Az ionizálható vizsgált vegyi anyagok esetében a kiválasztott talajoknak széles pH-tartományt kell lefedniük annak érdekében, hogy a vegyi anyag mobilitását ionizált és nem ionizált formában is értékelni lehessen; legalább 3 talajnak olyan pH-val kell rendelkeznie, amely mellett a vizsgált vegyi anyag mobilis formában van.

1. táblázat

Útmutató a kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására

Talaj sorszám	pH-érték	Szerves szén %	Agyagtartalom %	Állag (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	agyagos vályogtalaj
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	iszapos vályogtalaj
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	vályogtalaj
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	vályogos homoktalaj
5	< 4,5	> 10 #	< 10	vályogos homoktalaj/ homok

(*) A FAO és az USDA rendszerek szerint (14).

§ A megfelelő változók lehetőleg mutassanak értéket a megadott tartományban. Ha azonban nehezen található megfelelő talajanyag, a jelzett minimum alatti értékek is elfogadhatók.

‡ A kevesebb, mint 0,3 % szerves szenet tartalmazó talajok zavarhatják a szervesanyag-tartalom és az adszorpció közötti összefüggést. Ezért minimum 0,3 % szerves szenet tartalmazó talajok használata ajánlott.

A nagyon magas széntartalmú (pl. > 10 %) talajok jogi szempontból elfogadhatatlanok lehetnek pl. növényvédőszeres engedélyezése céljából.

27. Időnként egyéb talajtípusok is szükségesek lehetnek a hidegebb, mérsékelt és trópusi régiók reprezentálására. Ezért ha más talajtípusokat részesítünk előnyben, azokat ugyanazokkal a paraméterekkel kell jellemezni és a tulajdonságok ugyanolyan változékonyságával kell rendelkezniük, mint amelyeket a kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatásban leírtak (lásd a fenti 1. táblázatot), akkor is, ha nem felelnek meg pontosan a kritériumoknak.
28. Az »érelt maradványokkal« végzett kimosódási vizsgálatokhoz egyetlen talajt kell használni (12). Ennek a talajnak > 70 % homoktartalommal és 0,5–1,5 % közötti szerves széntartalommal kell rendelkeznie (pl. a 4. számú talaj az 1. táblázatban). Ha az átalakulási termékekre vonatkozó adatok fontosak, több talajtípus használatára lehet szükség.

29. A talajokat legalább a következő adatokkal kell jellemezni: textúra [homok %, iszap %, agyag % a FAO és az USDA osztályozási rendszer szerint (14)], pH, kationcserélő kapacitás, szerves széntartalom, térfogatsűrűség (bolygatott talajban) és víztartó képesség. A mikrobiális élőanyag-tömeg mérése csak az olyan talajban szükséges, amelyet az érlelt anyag kimosódási vizsgálata előtt végrehajtott érlelés/inkubáció időszakában használnak. A talaj további tulajdonságaira vonatkozó információk (pl. a talaj osztályozása, agyag ásványtan, fajlagos felület) is hasznosak lehetnek a vizsgálat eredményeinek értelmezéséhez. A talaj jellemzőinek meghatározására a (15) (16) (17) (18) (19) szakirodalmi hivatkozásban ajánlott módszerek használhatók.

Talajok gyűjtése és tárolása

30. A talajokat a felső rétegből (A-horizont) kell venni, legfeljebb 20 cm mélységből. A növényzet maradványait, a makrofaunát és a köveket el kell távolítani. A talajokat (kivéve a vizsgált vegyi anyag érlelésére használt talajokat) levegőn, szobahőmérsékleten (lehetőleg 20–25 °C-on) megszáritjuk. A fellazítást minimális erőfeszítéssel kell végezni, hogy a talaj eredeti textúrája a lehető legkisebb mértékben változzon. A talajokat < 2 mm-es rostán átszítálgjuk. Ajánlott az óvatos homogenizálás, mivel ez növeli az eredmények reprodukálhatóságát. Felhasználás előtt a talaj szobahőmérsékleten tárolható, és levegőn szárított állapotban kell tartani (12). A tárolás idejére nézve nincs ajánlott korlátozás, de a három évnél tovább tárolt talajokat felhasználás előtt szerves széntartalmuk és pH-értékük tekintetében újra kell elemezni.
31. Rendelkezésre kell állnia a vizsgálati talajok gyűjtésére szolgáló helyszín történetére vonatkozó részletes információknak. A részletek közé tartozik a pontos földrajzi hely (UTM [Universal Transversal Mercator-Projection/ European Horizontal Datum] segítségével vagy földrajzi koordinátákkal pontosan meghatározva), a növényzettel való borítottság, a növényvédő vegyszerekkel történt kezelések, a szerves és szervesetlen műtrágyákkal történt kezelések, a biológiai anyagokkal történt kiegészítések, valamint a véletlen szennyezések (12). A talaj nem használható a kimosódási vizsgálatokban, ha a megelőző négy évben a vizsgált vegyi anyaggal vagy szerkezeti analógjaival kezelték.

Vizsgáló körülmények

32. A vizsgálat során a talaj kimosódási oszlopokat sötétben és szobahőmérsékleten kell tartani, feltéve, hogy ezt a hőmérsékletet a ± 2 °C tartományon belül lehet tartani. Az ajánlott hőmérséklet 18–25 °C között van.
33. A talajoszlopok felszínén folyamatosan mesterséges esőt (0,01 mólos CaCl_2) kell alkalmazni 200 mm/48 óra sebességgel ⁽¹⁾; ez a sebesség 251 ml kijuttatásának felel meg 4 cm-es belső átmérőjű oszlopra vetítve. Ha a vizsgálat céljai megkövetelik, kiegészítésként a mesterséges csapadék ettől eltérő sebességeit és hosszabb időtartamokat is lehet használni.

A vizsgálat végrehajtása

A szülő vegyi anyag kimosódása

34. Legalább két párhuzamos kimosódási oszlopot töltünk meg kezeletlen, levegőn szárított és szitált talajjal (< 2 mm) legfeljebb kb. 30 cm magasságig. Az egységes töltés érdekében a talajt kanállal, kis részletekben adjuk hozzá az oszlopokhoz, és az oszlop egyidejű enyhe rezegtetése mellett dugattyúval préseljük, amíg a talajoszlop teteje már nem süllyed tovább. Az egységes feltöltésre azért van szükség, hogy reprodukálható eredményeket lehessen nyerni a kimosódási oszlopokból. Az oszlopfeltöltési technikák részleteit lásd a (20) (21) és (22) szakirodalmi hivatkozásban. A feltöltési eljárás reprodukálhatóságának szabályozása érdekében meghatározott tömegű talajt lehet az oszlopokba tölteni ⁽²⁾; a párhuzamos oszlopok tömegének hasonlóknak kell lennie.

⁽¹⁾ Ez a mennyiség rendkívül nagy mennyiségű csapadékot szimulál. Az átlagos éves csapadékmennyiség Közép-Európában például nagyságrendileg 800–1 000 mm.

⁽²⁾ Példák a bolygatott talajok térfogatsűrűségére:
homoktalaj esetén 1,66 g/ml
vályogos homoktalaj esetén 1,58 g/ml
vályogtalaj esetén 1,17 g/ml
iszaptalaj esetén 1,11 g/ml

35. Feltöltés után a talajoszlopokat mesterséges esővel (0,01 mólos CaCl_2) előnedvesítjük, mégpedig alulról felfelé a talajpórusokban lévő levegő vízzel való helyettesítése érdekében. Ezt követően a talajoszlopokat hagyjuk egyensúlyi állapotba kerülni, és a felesleges víz a gravitáció hatására lecsorog. Az oszlopok telítésére használt módszerekről a (23) szakirodalom nyújt áttekintést.
36. Ezután alkalmazzuk a vizsgált vegyi anyagot és/vagy a referencia-vegyianyagot a talajoszlopokon (lásd még a 23–25. pontot). Az oldatok, szuszpenziók vagy emulziók homogén eloszlása érdekében a vizsgált vegyi anyagot és/vagy a referencia-vegyianyagot egyenletesen kell alkalmazni a talajoszlopok felületén. Ha a vizsgált vegyi anyag alkalmazása céljából a talajba történő bedolgozás ajánlott, a vizsgált vegyi anyagot el kell keverni kis mennyiségű (például 20 g) talajban, és hozzáadni a talajoszlop felszínéhez.
37. A talajoszlopok felületét ezután lefedjük egy üveg tömörítő koronggal, üveggyöngyökkel, üvegszálas szűrővel vagy kerek szűrőpapírral annak érdekében, hogy a mesterséges esőt az egész felületen egyenletesen lehessen eloszlatni, illetve hogy elkerülhető legyen a vízcseppek okozta zavaró hatás a talaj felszínén. Minél nagyobb az oszlop átmérője, annál nagyobb gondot kell fordítani a mesterséges eső talajoszlopokra történő felvitelére, hogy biztosítható legyen a mesterséges eső egyenletes eloszlása a talaj felszínén. Ezután a mesterséges esőt cseppenként adjuk hozzá a talajoszlopokhoz dugattyú, perisztaltikus pumpa, vagy csepegtető tölcser segítségével. A csurgalékvizet lehetőleg frakciókban kell gyűjteni és fel kell jegyezni azok térfogatát ⁽¹⁾.
38. A kimosódás és az oszlopok lecsorgása után a talajoszlopokat a vizsgálatról várt információktól függő megfelelő számú szegmensre vágjuk, majd a szegmenseket megfelelő oldószerekkel vagy oldószer-keverékekkel extraháljuk és analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, illetve – adott esetben – az átalakulási termékekre, az össze radioaktivitásra és a referencia-vegyianyagra. A kimosott vagy csurgalékvíz-frakciókat közvetlenül vagy ugyanezen termékek extrakcióját követően analizáljuk. Radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatakor az alkalmazott radioaktivitás legalább 10 %-át tartalmazó összes frakciót azonosítani kell.

Az érlelt maradványok kimosódása

39. A friss (előzetesen levegőn nem szárított) talajt olyan arányban kezeljük a radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyaggal, amely megfelel a talajoszlopok felületének (lásd a 24. pontot), és a C.23. vizsgálati módszer szerint aerob körülmények között inkubáljuk (13). Az inkubálás (érelés) időtartamának elegendően hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy jelentős mennyiségű átalakulási termék keletkezzen; a vizsgált vegyi anyag felezési ideje felének megfelelő érlelési idő ajánlott ⁽²⁾, de nem haladhatja meg a 120 napot. A kimosódás előtt az érlelt talajt analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra és átalakulási termékeire.
40. A kimosódási oszlopokat 28 cm-es magasságig töltjük fel ugyanazzal a (de levegőn szárított) talajjal, mint amelyet a 34. pontban leírt érlelési kísérletben használtunk, és meghatározzuk a feltöltött talajoszlopok teljes tömegét. A talajoszlopokat ezután a 35. pontban leírtak szerint előnedvesítjük.
41. Ezt követően a vizsgált vegyi anyagot és átalakulási termékeit érlelt talajmaradékok formájában (lásd a 39. pontot), 2 cm-es talajszegmenseként alkalmazzuk a talajoszlopok felszínén. A talajoszlopok teljes magassága (kezeletlen talaj + érlelt talaj) lehetőleg ne haladja meg a 30 cm-t (lásd a 34. pontot).
42. A kimosást a 37. pontban leírtak szerint végezzük.
43. Kimosódás után a talajszegmenseket és csurgalékvizet a 38. pontban megadottak szerint analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, átalakulási termékeire és a nem-kivont radioaktivitásra. Annak meghatározására, hogy a kimosódás után az érlelt maradék mekkora hányada marad vissza a felső 2 cm-es rétegben, ezt a szegmenst külön kell elemezni.

⁽¹⁾ A csurgalékvíz tipikus térfogata 230–260 ml között mozog, amely 4 cm átmérőjű és 30 cm hosszúságú talajoszlopok használata esetén az alkalmazott összes mesterséges eső (251 ml) kb. 92–104 %-ának felel meg.

⁽²⁾ Egnél több fő átalakulási termék is képződhet a talajban, amelyek különböző időpontokban jelenhetnek meg az átalakulási vizsgálat során. Ilyen esetekben szükség lehet arra, hogy különböző korú érlelési maradványokkal is elvégezzük a kimosódási vizsgálatokat.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

44. A vizsgált vegyi anyag, az átalakulási termékek, a nem kivonható anyagok és – ha van – a referencia-vegyianyag mennyiségét az alkalmazott kezdeti dózis %-ában kell megadni mindegyik talajszegmens és csurgalékvíz-frakció vonatkozásában. Az oszlopok eredményeit grafikusán is ábrázolni kell, a kapott százalékokat a talajmélység függvényében ábrázolva.
45. Amikor referencia-vegyianyag is szerepel az oszlopkimosódási vizsgálatokban, a vegyi anyag kimosódását relatív skálán lehet értékelni a relatív mobilitási tényezők (relative mobility factor, RMF; a fogalom meghatározását lásd a 3. mellékletben) (1) (11) használatával, ami lehetővé teszi a különféle vegyi anyagok különböző talajtípusokban kapott kimosódási adatainak összehasonlítását. A különböző növényvédő vegyi anyagok RMF-értékeinek példái a 3. függelékben találhatók.
46. Az oszlopkimosódási eredményekből a K_{oc} (szerves szén normalizált adszorpció együttható) és a K_{om} (szerves anyag normalizált eloszlási együttható) becslült értékeit is meg lehet kapni az átlagos kimosódási távolság vagy az RMF és a K_{om} , illetve a K_{oc} (4) között megállapított összefüggések felhasználásával, vagy az egyszerű kromatográfiai elmélet alkalmazásával (24). Az utóbbi módszert azonban körültekintően kell alkalmazni, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a kimosódási folyamatban nem kizárólag telített áramlási viszonyok, hanem inkább telítetlen rendszerek játszanak szerepet.

Az eredmények értelmezése

47. Az e módszerben ismertetett oszlopkimosódási vizsgálatok lehetővé teszik a vizsgált vegyi anyag (a kiindulási anyag kimosódási vizsgálatában) és/vagy átalakulási termékei (az érlelt maradványok kimosódási vizsgálatában) kimosódási vagy mobilitási potenciáljának meghatározását a talajban. Ezek a vizsgálatok mennyiségileg nem jelzik előre a terepi körülmények közötti kimosódási viselkedést, de felhasználhatók egy vegyi anyag »kimosódási képességének« olyan vegyi anyagokéval való összehasonlítására, amelyek kimosódási viselkedése esetleg már ismert (24). Hasonlóképpen, az alkalmazott vegyi anyag talajvízbe esetleg bejutó százalékos arányát sem méri mennyiségileg (11). Az oszlopkimosódási vizsgálatok eredményei azonban segíthetnek annak eldöntésében, hogy kell-e további felterepi vagy terepi vizsgálatokat végezni olyan vegyi anyagok esetében, amelyek a laboratóriumi vizsgálatok során fokozott mobilitási potenciált mutatnak.

Vizsgálati jegyzőkönyv

48. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag és referencia-vegyianyag (ha van):

- közönséges név, kémiai név (IUPAC- és CAS-nómenklátúra), CAS-szám, kémiai szerkezet (megadva a jelölőanyag helyzetét, ha radioaktív izotóppal jelölt anyagot használunk) és fontos fizikai-kémiai tulajdonságok;
- a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége);
- az izotóppal jelölt vegyi anyag radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (ahol szükséges).

Vizsgálati talajok:

- a gyűjtőhelyre vonatkozó adatok;
- a talajok tulajdonságai, mint például a pH, a szerves szén- és az agyagtartalom, textúra és térfogatsűrűség (bolygatott talaj esetén);
- a talaj mikrobiális aktivitása (csak a vizsgált vegyi anyag érlelésére használt talaj esetén);
- a talaj tárolásának hossza és a tárolási körülmények.

Vizsgálati feltételek:

- a vizsgálatok elvégzésének időpontja;
- a kimosódási oszlopok hossza és átmérője;
- a talajoszlopokban lévő talaj összes tömege;
- a vizsgált vegyi anyag és – adott esetben – az alkalmazott referencia-vegyianyag mennyisége;

- a mesterséges eső mennyisége, gyakorisága és alkalmazásának időtartama;
- a kísérleti összeállítás hőmérséklete;
- az ismétlések száma (legalább kettő);
- a különböző talajszegmensekben és csurgalékvizekben található vizsgált vegyi anyag, az átalakulási termékek, és adott esetben a referencia-vegianyag analitikai módszerei;
- a talajszegmensekben és csurgalékvizekben található átalakulási termékek jellemzésére és azonosítására használt módszerek.

Vizsgálati eredmények:

- a talajszegmensek és a csurgalékvizek koncentrációban és az alkalmazott dózis %-ában kifejezett eredményeinek táblázatai;
- tömegegyensúly, ha szükséges;
- csurgalékvíz-térfogatok;
- kimosódási távolságok és – adott esetben – a relatív mobilitási tényezők;
- a talajszegmensekben talált %-ok grafikus ábrázolása a talajszegmens mélységének függvényében;
- az eredmények szöveges elemzése és értelmezése.

SZAKIRODALOM

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, 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) A növényvédők szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról szóló 95/36/EK bizottsági irányelv (1995. július 14.) I. melléklete, HL L 172., 1995.7.22., 8. o.
- (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) E melléklet következő fejezetei:
- A.4. fejezet: Gőznyomás
 - A.6. fejezet: Vízdékonyság
 - A.8. fejezet: Megoszlási hányados, lombikrázásos módszer
 - A.24. fejezet: Megoszlási hányados, HPLC-módszer
 - C.7. fejezet: Lebomlás – Abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében
 - C.18. fejezet: Adszorpció/deszorpció tétel egyensúlyi módszerrel
 - C.23. fejezet: Aerob és anaerob átalakítás a talajban
- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- (15) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D. R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). *Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris
-

1. függelék

Fogalom meghatározások és mértékegységek

Érlelt talajmaradvány: A vizsgált vegyi anyag és az átalakulási termékek előfordulása a talajban a kijuttatást követően egy olyan időtartam után, amely elég hosszú ahhoz, hogy lehetővé tegye, hogy az alkalmazott vegyi anyag egy részének eloszlása és kémiai jellege szállítási, adszorpciós, metabolikus és szétterjedési folyamatok révén megváltozzon (1).

Mesterséges eső: 0,01 mólos CaCl_2 -oldat desztillált vagy ioncserélt vízben.

Átlagos kimosódási távolság: A talajszakasz alsó része, ahol az összes visszanyert vizsgált vegyi anyag 50 %-a kumulálódik [normál kimosódási kísérlet], vagy (az alsó talajszakasz, ahol az összes visszanyert vizsgált vegyi anyag 50 %-a kumulálódik) – ((érlelt maradványréteg vastagsága)/2) [érlelt maradvány kimosódási vizsgálat]

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Csurgalékvíz: Egy talajprofilon vagy talajoszlopon keresztülszivárogatott vizes fázis (1).

Kimosódás: Az a folyamat, amelynek során egy vegyi anyag lefelé mozog a talajprofilban vagy a talajoszlopban (1).

Kimosódási távolság: Az a legmélyebb talajszegmens, amelyben az alkalmazott vizsgált vegyi anyag vagy érlelt szermaradvány $\geq 0,5$ %-a található a kimosódási folyamat után (egyenértékű a behatolási mélységgel).

Kimutatási határérték (LOD) és mérhetőségi határérték (LOQ): A kimutatási határérték (LOD) az adott vegyi anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a vegyi anyag egyértelmű azonosításához szükséges jel nem különböztethető meg az analitikai háttérzajtól. A mérhetőségi határérték (LOQ) az adott vegyi anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a koncentráció nem határozható meg elfogadható pontossággal.

RMF Relatív Mobilitási Tényező: (vizsgált vegyi anyag kimosódási távolsága (cm)) / (referencia-vegyianyag kimosódási távolsága (cm))

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Átalakulási termék: A vizsgált vegyi anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakcióiból származó minden vegyi anyag, beleértve a CO_2 -t és a maradványokban kötött termékeket.

Talaj: Ásványi és szerves kémiai összetevők keveréke, az utóbbi magas szén- és nitrogén-tartalmú és nagy molekula-tömegű vegyületeket tartalmaz, amelyben jellemzően kicsi (főleg mikro-) organizmusok élnek. A talajt két állapotában lehet kezelni:

- nem bolygatott, ahogyan a talaj az idő folyamán, a különböző talajtípusok jellegzetes rétegeiben kialakul;
- bolygatott, ahogyan a szántóföldeken általában megtalálható, vagy ahogyan az ásással vett mintákban és a vizsgálati módszerben használt a mintákban előfordul (2).

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

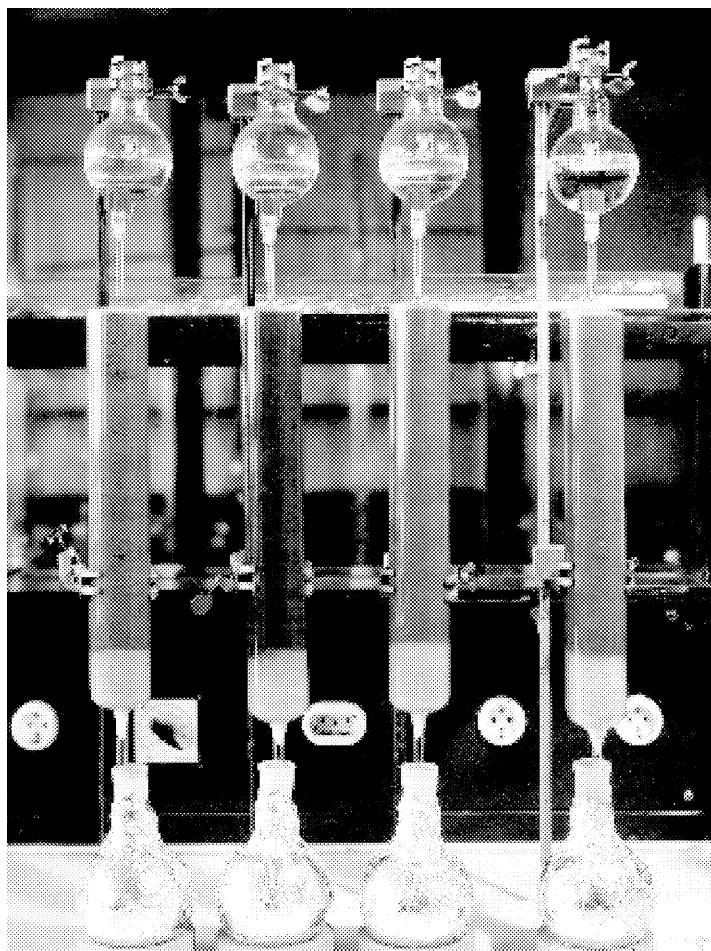
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherens biológiai lebonthatóság a talajban (elfogadva: 1981. május 12.).

2. függelék

1. ábra

Példa az üvegből készült nem részekre bontható kimosódási oszlopra

Hossza 35 cm, belső átmérője 5 cm (1)



← Csepegtető tölcsér mesterséges eső felviteléhez

← Üveg tömörítő korong a talajfelszín bolygatásának elkerülésére és a mesterséges eső egyenletes elosztatására

← Vizsgálati talajjal feltöltött üvegoszlop (fénybomlékony termékek vizsgálata esetén az oszlopokat alufóliába kell csomagolni)

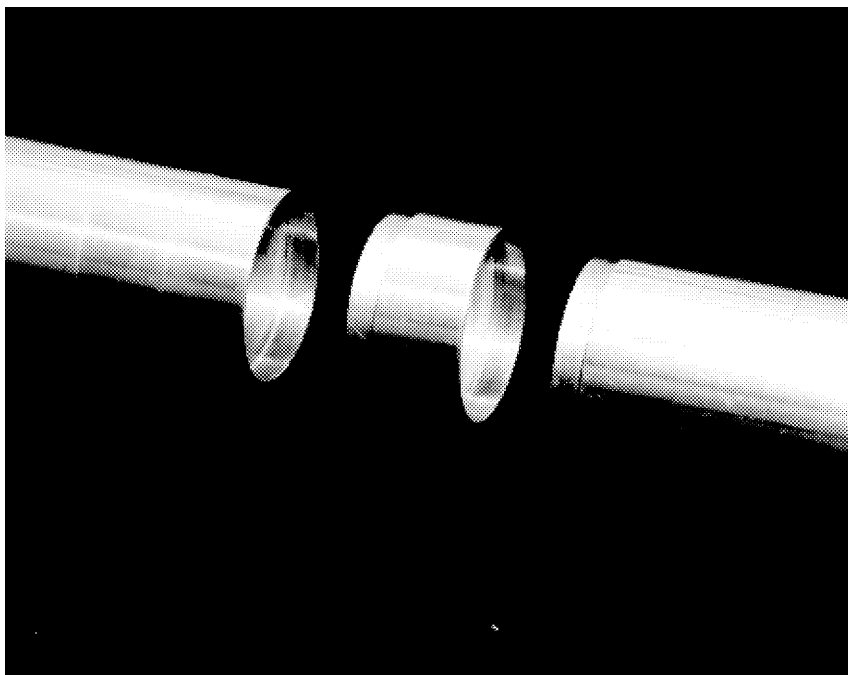
← Kvarchomokréteg

← Üveggyapot dugó a talaj oszlopban tartására

← Kerek fenekű lombik a csurgalékvíz összegyűjtésére; alufóliába csomagolva a fotolízis kizárására

- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

2. ábra

Példa a 4 cm-es belső átmérőjű részekre bontható fémoszlopra (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. függelék

A relatív mobilitási tényezők (*) (RMF) példái különböző növényvédő vegyszerek esetében (1) (2), illetve az ennek megfelelő mobilitási osztályok +

RMF-tartomány	Vegyí anyag (RMF)	Mobilitási osztály
≤ 0,15	Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I. immobilis
0,15–0,8	Profenofosz (0,18), Propikonazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutilazin (0,52), Metidation (0,56), Prometrin (0,59), Propazin (0,64), Alaklór (0,66), Metolaklór (0,68)	II. enyhén mobilis
0,8–1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazin (1,03), Simazin (1,04), Fluometuron (1,18)	III. mérsékeltén mobilis
1,3–2,5	Prometon (1,67), Cianazin (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV. meglehetősen mobilis
2,5–5,0	Karbofurán (3,00), Dioxakarb (4,33)	V. mobilis
> 5,0	Monokrotofosz (> 5,0), Dikrotofosz (> 5,0)	VI. nagyon mobilis

(*) A relatív mobilitási tényező a következőképpen kapható meg (3):

$$RMF = \frac{\text{vizsgált vegyi anyag kimosódási távolsága (cm)}}{\text{referencia-vegyianyag kimosódási távolsága (cm)}}$$

(**) Referencia-vegyianyag

+ A vegyi anyagok talajban való mobilitásának egyéb osztályozási rendszerei a talaj vékonyréteg-kromatográfiából származó R_f -értékeken (4) és a K_{oc} -értékeken alapulnak (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. A KONZERVÁLÓSZERREL KEZELT FAANYAGOKBÓL A KÖRNYEZETBE TÖRTÉNŐ KIBOCSÁTÁSOK BECSLÉSE: LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK FÁBÓL KÉSZÜLT, NEM FEDETT, ÉDES- VAGY TENGERVÍZZEL ÉRINTKEZÉSBE LÉVŐ ÁRUCIKKEK VIZSGÁLATÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 313. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. A konzerválószerrel kezelt faanyagból a környezetbe történő kibocsátást a kezelt faanyaghoz kapcsolódó környezeti kockázatértékelés céljából számszerűsíteni kell. Ez a vizsgálati módszer egy laboratóriumi módszert ír le a konzerválószerrel kezelt faanyagból származó kibocsátások becslésére két olyan esetben, amikor a kibocsátások a környezetbe juthatnak:
 - Az édesvízzel érintkező kezelt faanyagból származó kibocsátások. A kezelt faanyag felszínéről származó kibocsátások a vízbe kerülhetnek.
 - A tengervízzel érintkező kezelt faanyagból származó kibocsátások. A kezelt faanyag felszínéről származó kibocsátások a tengervízbe kerülhetnek.
2. Ez a vizsgálati módszer olyan faanyagok és fából készült termékek kibocsátásainak ellenőrzésére szolgál, amelyek nincsenek lefedve és édesvízzel vagy tengervízzel érintkezésben állnak. A használati osztályok nemzetközileg alkalmazottak, és azt a biológiai veszélyt kategorizálják, amelynek a kezelt árucikk ki lesz téve. A használati osztályok meghatározzák azt a helyzetet is, amelyben a kezelt árucikket használják, és meghatározzák azokat a környezeti elemeket (levegő, víz, talaj), amelyekre nézve a konzerválószerrel kezelt faanyag potenciálisan kockázatot jelent.
3. A vizsgálati módszer egy laboratóriumi eljárás, amely olyan vízminták (emisszárum) expozíció utáni növekvő időközönként történő gyűjtésére irányul, amelyekbe kezelt faanyagot merítettek. A fluxus $\text{mg/m}^2/\text{nap}$ mértékegységben történő becsléséhez az emisszárumban lévő kibocsátott mennyiséget a faanyag felületéhez és az expozíció időtartamához viszonyítjuk. Így megbecsülhető az expozíció növekvő időszakai utáni fluxus mértéke (a kimosódási sebesség).
4. A kibocsátott mennyiséget a kezelt faanyaghoz kapcsolódó környezeti kockázatok értékelésére lehet használni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A fafelület édesvíz révén bekövetkező kimosódásának mechanizmusa jellegében és súlyosságában feltételezhetően nem egyezik meg a fafelület tengervíz révén történő kimosódásával. Így a tengervízi környezetben használt faanyagok kezelésére alkalmazott fakonzerváló termékek vagy keverékek esetében tengervíz vonatkozásában végzett kimosódási vizsgálatra van szükség.
6. Fakonzerváló szerrel kezelt faanyag esetében a faanyagnak a kereskedelmi forgalomban használt faanyagra nézve reprezentatívnak kell lennie. A faanyagot a konzerválószer gyártójának utasításai szerint, illetve a megfelelő szabványokkal és előírásokkal összhangban kell kezelni. A faanyag kezelés utáni kondicionálásának paramétereit a vizsgálat megkezdése előtt meg kell állapítani.
7. A használt famintáknak reprezentatívnak kell lenniük a használt árukra nézve (pl. faj, sűrűség és egyéb jellemzők tekintetében).
8. A vizsgálat alkalmazható behatolásos folyamattal vagy felületre történő felvitellel kezelt faanyagra, illetve olyan kezelt faanyagra, amely további kötelező felületkezelést kapott (például olyan festéket, amelyet a kereskedelmi felhasználás követelményeként visznek fel).
9. A víz összetétele, mennyisége, pH-ja és fizikai formája fontos szempont a faanyagból származó kibocsátás mennyiségének, tartalmának és jellegének meghatározásában.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

10. Konzerválószerrel kezelt faanyagból vett vizsgálati mintadarabokat merítünk el vízben. A vizet (emisszárum) összegyűjtjük és az expozíciós idő alatt több – a statisztikai számítások elvégzéséhez elegendő – alkalommal kémiai analízisnek vetjük alá. A $\text{mg/m}^2/\text{nap}$ mértékegységben megadott kibocsátási rátákat az analitikai eredményekből számítjuk ki. A mintavételi időszakokat fel kell jegyezni. A kezeletlen mintákkal végzett vizsgálatokat fel lehet függeszteni, ha nem mutatható ki háttérszint az első három adatpontban.

11. A kezeletlen fa mintadarabok vizsgálatba való bevonása lehetővé teszi a faanyagból származó – az alkalmazott konzerválószeretől eltérő – emisszátumok háttérszintjének meghatározását.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

Pontosság

12. A vizsgálati módszer pontossága a kibocsátás becslése szempontjából attól függ, hogy a vizsgálati minadarabok reprezentatív-e a kereskedelemben kapható kezelt faanyagokra nézve, hogy mennyire reprezentatív a víz az igazi vízre nézve, és hogy mennyire reprezentatív az expozíció a természetes körülmények tekintetében.
13. Az analitikai módszer pontosságát, precizitását és ismételhetőségét a vizsgálat elvégzése előtt meg kell határozni.

Reprodukálhatóság

14. Három vízmintát veszünk és analizálunk, majd az átlagos értéket tekintjük kibocsátási értéknek. Az eredmények laboratóriumon belüli és a különböző laboratóriumok közötti reprodukálhatósága a bemelegítés rendszerétől és a vizsgálati mintadarabokként felhasznált faanyagtól függ.

Az eredmények elfogadható tartománya

15. E vizsgálatban az eredmények olyan tartománya fogadható el, ahol a felső és alsó értékek közötti különbség egy nagyságrendnél kisebb.

VIZSGÁLATI FELTÉTELEK

Víz

16. Édesvízi kimosódási forgatókönyvek: Ha édesvíznek kitett faanyagot kell értékelni, akkor a kimosódási próba során ioncserélt víz (pl. ASTM D 1193 Type II) használata ajánlott. A víz hőmérséklete $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ legyen és a mért pH-értéket és a víz hőmérsékletét a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell. A használt vízből a kezelt mintadarabok bemelegítése előtt vett minták analízise lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagoknak a vízben történő becslését. Ez egy ellenőrzés azon vegyi anyagok háttérszintjeinek meghatározására, amelyek majd kémiai elemzésre kerülnek.
17. A tengervízbe való kimosódás forgatókönyvei: Ha tengervíznek kitett faanyagot kell értékelni, akkor a kimosódási próba során szintetikus tengervíz (pl. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, nehézfémek nélkül) használata ajánlott. A víz hőmérséklete $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ legyen, és a mért pH-értéket és a víz hőmérsékletét a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell. A használt vízből a kezelt mintadarabok bemelegítése előtt vett minták analízise lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagoknak a vízben történő becslését. Ez az ellenőrzés a fontos vegyi anyagok háttérszintjeinek elemzésére szolgál.

Faanyagú vizsgálati mintadarabok

18. A fafajnak a fakonzerváló szerek hatékonysági vizsgálatai során használt fafajok jellegzetes képviselőjének kell lennie. Az ajánlott fajok a *Pinus sylvestris* L. (erdeifenyő), a *Pinus resinosa* Ait. (vörösfenyő), vagy a *Pinus*-fajok (déli fenyő). További vizsgálatok végezhetőek egyéb fajok használatával.
19. Görcsmentes, egyenes szálirányú faanyagot kell használni. Kerülni kell a gyantás megjelenésű anyagokat. A faanyagnak jellegzetes, a kereskedelmi forgalomban kapható faanyagoknak kell lennie. A beszerzési forrást, a sűrűségét és az évgyűrűk 10 mm-enkénti számát fel kell jegyezni.
20. Ajánlott, hogy a faanyagú vizsgálati mintadarabok öt darab, az EN 113 szabvány szerinti méretű (25 mm × 50 mm × 15 mm) blokkból álló tételeket képezzenek, és hosszanti felületük párhuzamos legyen a faanyag szálirányával, bár egyéb méretek – mint az 50 mm × 150 mm × 10 mm – is használhatók. A vizsgálati darabokat teljesen el kell meríteni a vízben. A vizsgálati daraboknak 100 %-ban szíjácsból kell állnia. Minden darabot egyedileg megjelölünk, hogy a vizsgálat alatt azonosítani lehessen.
21. A vizsgálati mintadarabokat le kell gyalulni vagy le kell síkfűrészelni, de a felületeket nem szabad lecsiszolni.

22. Az elemzésre használt faanyagú vizsgálati mintadarabok tételeinek száma legalább öt legyen: a mintadarabok három tételét konzerválószerrel kezeljük, egy tétel kezeletlen marad, egy tételt pedig a vizsgálati mintadarabok sütőben szárított nedvességtartalmának kezelés előtti becslésére használunk. Elegendő számú vizsgálati mintadarabot készítünk ahhoz, hogy ki lehessen választani három olyan tételt, amelyekben a konzerválószer retenciója az együtt tekintett vizsgálati mintadarabok átlagos értékének 5 %-os tartományán belül van.
23. Minden vizsgálati mintadarab bütűjét le kell zárni olyan vegyi anyaggal, amely meggátolja a konzerválószernek a mintadarabok bütűjébe történő behatolását, illetve megakadályozza a mintadarabokból a bütűkön keresztül történő kimosódást. A bütűzáró alkalmazása szempontjából különbséget kell tenni a felületre való felvitelre és a behatolós folyamatokra használt mintadarabok között. Kezelés előtt bütűzárót csak a felületre való felvitel esetében kell alkalmazni.
24. A bütűnek a behatolós folyamatok révén történő kezelés céljából nyitva kell állnia. Ezért a darabok bütűjét a kondicionálási időszak végén kell lezárni. A kibocsátást csak a hosszanti felület tekintetében kell megbecsülni. A záróanyagokat ellenőrizni és – szükség esetén – a kimosódás megkezdése előtt újból alkalmazni kell; a kimosódás megkezdése után a záróanyagot már nem szabad újra alkalmazni.

Merítőtartály

25. A tartály inert anyagból készüljön, és elég nagy legyen ahhoz, hogy elférjen benne 5 db EN 113 szerinti faanyagú mintadarab 500 ml vízben úgy, hogy az 0,4 cm²/ml felület-víztérfogat arányt eredményezzen.

Mintavizsgálati állvány

26. A vizsgálati mintadarabokat egy olyan állvány támasztja alá, amely lehetővé teszi, hogy a mintadarabok valamennyi kitett felülete érintkezzen a vízzel.

A KONZERVÁLÓSZERREL TÖRTÉNŐ KEZELÉSI ELJÁRÁS

A kezelt vizsgálati mintadarabok elkészítése

27. A vizsgált konzerválószerrel kezelendő faanyagú vizsgálati mintadarabot a konzerválószerhez megadott eljárás szerint kezeljük, amely behatolós folyamat vagy felületre való felvitel lehet, és ez utóbbit alámerítéssel, permetezéssel vagy ecseteléssel lehet elvégezni.

Behatolós kezelési eljárással alkalmazandó konzerválószerek

28. A konzerválószerből olyan oldatot kell készíteni, amely a behatolós kezelési eljárás alkalmazása esetén biztosítja a meghatározott felvételt vagy retenciót. Megmérjük a faanyagú vizsgálati mintadarab tömegét és méreteit. A behatolós kezelési folyamatnak meg kell egyeznie a konzerválószernek a 4. vagy 5. használati osztályba sorolt faanyagok esetére meghatározott alkalmazásával. A darabot a kezelés után ismét lemérjük és a konzerválószer retencióját (kg/m³) a következő egyenlettel számítjuk ki:

$$\frac{\text{Kezelés utáni tömeg (kg)} - \text{Kezelés előtti tömeg (kg)}}{\text{Vizsgálati minta térfogata (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Oldatkonzentráció (tömeg/ tömeg \%)} }{100}$$

29. Megjegyzendő, hogy a vizsgálatban az ipari kezelőtelepeken (pl. vákuumimpregnálással) kezelt faanyagok is használhatók. Az alkalmazott eljárásokat fel kell jegyezni, és az ilyen módon kezelt anyag retencióját elemezni kell és fel kell jegyezni.

Felületre felvitt konzerválószerek

30. A felületre való felvitel eljárásai közé tartozik a faanyagú vizsgálati darabok alámerítése, permetezése és ecsetelése. A folyamatnak és a felviteli aránynak (pl. liter/m²) meg kell egyeznie a konzerválószer felületi alkalmazásához megadott folyamattal és felviteli aránnyal.

31. Ebben az esetben is megjegyzendő, hogy a vizsgálatban az ipari kezelő telepeken kezelt faanyagok is használhatók. Az alkalmazott eljárásokat fel kell jegyezni, és az ilyen módon kezelt anyag retencióját elemezni kell és fel kell jegyezni.

A vizsgálati mintadarabok kezelést követő kondicionálása

32. A kezelés után a kezelt vizsgálati mintadarabokat a konzerválószer szállítójának ajánlásaival összhangban, a konzerválószer címkéjén szereplő követelményeknek, a kereskedelmi kezelési gyakorlatnak, vagy az EN 252 szabványnak megfelelően kondicionálni kell.

A vizsgálati mintadarabok előkészítése és kiválasztása

33. A kezelést követő kondicionálás után kiszámítjuk a vizsgálati mintadarabok átlagos retencióját, és a kimosódási mérésekhez véletlenszerűen kiválasztunk három reprezentatív tételt, amely a csoport átlagos retenciójához viszonyított 5 %-os tartományon belül van.

A KONZERVÁLÓSZER-KIBOCSÁTÁS MÉRÉSE

Immerziós módszer

34. A vizsgálati mintadarabokat lemérjük, majd ezt követően teljesen alámerítjük a vízben, és feljegyezzük a dátumot és az időpontot. A tartályt a párolgás csökkentése érdekében lefedjük.
35. A vizet az alábbi időpontokban cseréljük: 6 óra, 1 nap, 2 nap, 4 nap, 8 nap, 15 nap, 22 nap és 29 nap elteltével (megjegyzés: ezek összesített időtartamok és nem időintervallumok). Fel kell jegyezni a vízcseré időpontját és dátumát, valamint a tartályból visszanyert víz tömegét.
36. További kémiai elemzés céljából minden vízcseré után megtartunk egy mintát a vizsgálati mintadarabok adott tételének bemelegítésére szolgáló vízből.
37. A mintavételi eljárás lehetővé teszi a kibocsátott mennyiség / idő profil kiszámítását. A mintákat olyan körülmények között tároljuk, amelyek megőrzik az elemzett anyagot, pl. hűtőszekrényben és sötétben, hogy lecsökkentsük a mikrobák elszaporodását a mintában az elemzés előtt.

KIBOCSÁTÁSI MÉRÉSEK

Kezelt minták

38. Az összegyűjtött vizet kémiaileg analizáljuk a hatóanyagra és/vagy a releváns bomlástermékekre/átalakulási termékekre.

Kezeletlen minták

39. Ebben a rendszerben a víz (emisszárum) gyűjtése és a kezeletlen famintákból kimosódott vegyi anyagok ezt követő elemzése lehetővé teszi a konzerválószer kezeletlen faanyagból való lehetséges kibocsátási rátájának becslését. Az emisszárum egyre hosszabb expozíciós időszakok utáni gyűjtése és elemzése lehetővé teszi a kibocsátási ráta idő függvényében történő változásának becslését. Ez az elemzés egy olyan ellenőrzés a vizsgált anyag kezeletlen faanyagban lévő háttérszintjének megállapítására, amellyel igazolható, hogy a minták forrásaként használt faanyagot korábban nem kezelték a konzerválószerrel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Kémiai elemzések

40. Az összegyűjtött vizet kémiai analízisnek vetjük alá, és a vízanalízis eredményét megfelelő mértékegységben (pl. µg/l-ben) fejezzük ki.

Adatok jegyzőkönyvezése

41. Minden eredményt feljegyzünk. A függelék bemutat egy példát a kezelt vizsgálati mintadarabok egy tétele részére javasolt jegyzőkönyv formátumára, illetve egy összefoglaló táblázatot az egyes mintavételi intervallumokban megfigyelt átlagos kibocsátásértékek kiszámításához.
42. A $\text{mg/m}^2/\text{nap}$ mértékegységben megadott napi kibocsátási fluxust úgy számítjuk ki, hogy a három ismétlés három mérésének átlagát elosztjuk a bemerítés napjainak számával.

Vizsgálati jegyzőkönyv

43. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább az alábbi információkat kell tartalmaznia:
 - A vizsgálat alatt álló konzerválószer szállítójának neve;
 - A vizsgált konzerválószer különleges és egyedi neve vagy kódja;
 - A hatóanyag(ok) kereskedelmi vagy közönséges neve a segédanyagok (pl. segédoldószer, gyanta) általános leírásával, valamint az összetétel az összetevők m/m %-ában megadva;
 - A vízzel érintkezve használt faanyagokra megadott retenció vagy terhelés (kg/m^3 vagy l/m^2);
 - A felhasznált fafaj, annak sűrűsége és növekedési üteme $\text{gyűrű}/10$ mm mértékegységben megadva;
 - A vizsgált konzerválószer terhelése és retenciója, valamint a retenció kiszámítására használt képlet l/m^2 vagy kg/m^3 mértékegységben kifejezve;
 - A konzerválószer alkalmazásának módja, meghatározva a behatolásos folyamathoz használt kezelés ütemezését, illetve az alkalmazás módja, ha a felületi kezelést használták;
 - A konzerválószer alkalmazásának időpontja, valamint a vizsgálati mintadarabok becsült nedvességtartalma százalékban kifejezve;
 - Az alkalmazott kondicionálási eljárások, megjelölve azok jellegét, körülményeit és időtartamát;
 - A használt bütüzáró specifikációja, illetve alkalmazásainak száma;
 - A faanyag bármely későbbi kezelésének adatai, pl. a festék szállítója, típusa, jellemzői és terhelése;
 - Az immerziós események időpontja és dátuma, a vizsgálati mintadarabok alámerítéséhez használt víz mennyisége az egyes események során, és a faanyag által az alámerítés során felszívott víz mennyisége;
 - A leírt módszertől való eltérések, illetve minden olyan tényező, amely befolyásolhatta az eredményeket.

SZAKIRODALOM

- (1) EN 84:1997 európai szabvány: Faanyagvédő szerek. Kezelt faanyagok biológiai vizsgálatok előtti gyorsított érlelése. Kimosódási eljárás.
- (2) EN 113/A1:2004 európai szabvány: Faanyagvédő szerek. Vizsgálati módszer a fát megtámadó basidiomycetes elleni védő hatékonyság meghatározására. A toxikus értékek meghatározása.
- (3) EN 252:1989 európai szabvány: Terepi vizsgálati módszer a talajjal érintkező faanyagvédő szerek relatív védő hatékonyságának vizsgálatához.
- (4) EN 335 európai szabvány – 1. rész: 2006. A faanyagok és a fa alapanyagú termékek tartóssága – A használati osztályok meghatározása – 1. rész: Általános tudnivalók.

-
- (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. függelék

A vizsgálati módszer adatfelvételi űrlapjának mintája

A konzerválószerrel kezelt faanyagokból származó környezeti kibocsátások becslése: Laboratóriumi módszerek fából készült, nem fedett, édes- vagy tengervízzel érintkezésben lévő árucikkek vizsgálatára

Vizsgálati létesítmény	
Fakonzerváló szer	
A konzerválószer szállítója	
A konzerválószer különleges és egyedi neve vagy kódja	
A konzerválószer kereskedelmi vagy közönséges neve	
Segédanyagok	
Vonatkozó retenció érték vízzel érintkezve használt faanyag esetében	
Alkalmazás	
Az alkalmazás módja	
Az alkalmazás dátuma	
A retenció kiszámításához használt képlet:	
Kondicionálási eljárás	
A kondicionálás időtartama	
Bütüzáró / alkalmazások száma	
Utólagos kezelés	adott esetben
Vizsgálati mintadarabok	
Fafaj	
A fa sűrűsége	(minimum ... átlagérték ... maximum)
Növekedési ütem (gyűrű/10 mm)	(minimum ... átlagérték ... maximum)
Nedvességtartalom	

Vizsgálati szerelvények (*)	Retenció (pl. kg/m³)
Kezelt »x«	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezelt »y«	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezelt »z«	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezeletlen	
A vizsgálati módszer paramétereinek változása	például vízminőség, vizsgálati darabok méretei, stb.

(*) x, y és z a három párhuzamos mintát jelenti

Időpont	Vízcsere	Mintadarab tömege		Vízfelvétel		Víz minta				
		Kezelt (átlag)	Kezeletlen	Kezelt (átlag)	Kezeletlen		Vizsgált víz	x	y	z
	Dátum	g	g	g	g	szám	pH	pH	pH	pH
Kezdés										
6 óra						1				
24 óra						2				
2 nap						3				
4 nap						4				
8 nap						5				
15 nap						6				
22 nap						7				
29 nap						8				

Kérjük, hogy minden hatóanyag esetében külön táblázatot készítsen

Időpont	Vízcsere	Analitikai eredmények														
		Kezeletlen mintadarabok			Kezelt mintadarabok											
		Hatóanyag-koncentráció a vízben mg/l	Kibocsátott mennyiség mg/m ²	Kibocsátási ráta mg/m ² /d	Hatóanyag-koncentráció a vízben				Kibocsátott mennyiség				Kibocsátási ráta			
					x	y	z	Átlag	x	y	z	Átlag	x	y	z	Átlag
mg/l	mg/l				mg/l	mg/l	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d		
Dátum																
6 óra																
24 óra																
2 nap																
4 nap																
8 nap																
15 nap																
22 nap																
29 nap																

Megjegyzések: Mivel a kezeletlen mintadarabok eredményeit esetleg a kezelt mintákból származó kibocsátási értékek korrigálására kell használni, a kezeletlen eredményeket kell először bevinni, és a kezelt minták értékei »korrigált értékek« lesznek. Esetleg a kezdeti vízanalízis korrekciójára is szükség lehet.

*2. függelék***Fogalommeghatározások**

Vegyí anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyí anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

C.46. BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS ÜLEDÉKLAKÓ BENTIKUS KEVÉSSERTÉJŰEKBEN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 315. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. Az üledékfogyasztó endobentikus állatok üledékhez kötött anyagoknak lehetnek kitéve (1). Ezek közül az üledékfogyasztó állatok közül a vízi kevéssertéjűek fontos szerepet játszanak a vízi rendszerek alsó részében. Az üledékben élnek és gyakran a legnagyobb abundanciával előforduló fajok közé tartoznak, különösen a más állatok számára kedvezőtlen környezeti feltételekkel rendelkező élőhelyeken. Ezek az állatok az üledék bioturbációja révén és zsákmányállatként nagy hatással vannak az ilyen anyagok más élőlények – például bentivor halak – számára való biológiai elérhetőségére. Az epibentikus organizmusokkal szemben az endobentikus vízi kevéssertéjűek az üledékbe ássák magukat, és az üledék felszíne alatt üledékrészecskéket fogyasztanak. Ezért ezek az organizmusok számos felvételi úton keresztül ki vannak téve különféle anyagoknak, így közvetlen érintkezés, illetve a szennyezett üledékrészecskék, pórusvíz és fedővíz felvétele útján is. A bentikus kevéssertéjűek közé tartozó egyes fajokat, amelyeket az ökotoxikológiai vizsgálatokban jelenleg felhasználnak, a 6. függelék ismerteti.
2. Az anyag biológiai felhalmozódását jellemző paraméterek a biológiai felhalmozódási tényező (BAF), az üledék felvételi sebességi állandó (k_u) és az ürülési sebességi állandó (k_e). E paraméterek részletes meghatározása az 1. függelékben található.
3. Általánosságban az anyagok biológiai felhalmozódási potenciáljának értékelése, illetve az üledékekbe vagy üledékekre történő megoszlásra hajlamos anyagok biológiai felhalmozódásának vizsgálata kompartment-specifikus vizsgálati módszert igényel (1) (2) (3) (4).
4. E vizsgálati módszer célja az üledékhez kapcsolódó anyagok biológiai felhalmozódásának értékelése endobentikus kevéssertéjű férgekben. A vizsgált anyagot szennyezésként bevisszük az üledékbe. Az így elszennyezett üledék hivatott szimulálni a szennyezett üledéket.
5. Ez a módszer a meglévő üledéktoxicitási és biológiai felhalmozódási vizsgálati módszereken alapul (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Egyéb hasznos dokumentumok: nemzetközi workshop megbeszélései és eredményei (11), valamint egy nemzetközi körvizsgálat eredményei (12).
6. A vizsgálat az üledékekhez való kapcsolódásra hajlamos stabil, semleges szerves anyagokra alkalmazható. A módszerrel az üledékekhez kapcsolódó, stabil fémorganikus vegyületek biológiai felhalmozódását is mérni lehet (12). A módszer nem alkalmazható fémekre és egyéb nyomelemekre a vizsgálati terv – a szubsztrátumot és a vízmennyiséget, valamint esetleg a szövetminta méretét érintő – módosítása nélkül (11).

ELŐFELTÉTELEK ÉS A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A biológiai felhalmozódási folyamatokkal kapcsolatban csak néhány jól megalapozott mennyiségi szerkezet-aktivitás összefüggés (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) áll jelenleg rendelkezésre (14). Legelterjedtebben a stabil szerves anyagok biológiai felhalmozódása és biokoncentrációja, illetve lipofilitása közötti összefüggést használják (ez utóbbi mennyiséget az oktanol-víz megoszlási hányados logaritmusaként kifejezve [$\log K_{ow}$]; a fogalom meghatározását lásd az 1. mellékletben), amely egy anyag víz és halak közötti megoszlásának leírására lett kifejlesztve. Ezen összefüggés felhasználásával az üledék kompartment vonatkozásában is megalapoztak már korrelációkat (15) (16) (17) (18). A $\log K_{ow}$ - $\log BCF$ korreláció – mint jelentős QSAR – hasznos lehet az üledékhez kapcsolódó anyagok biológiai felhalmozódási potenciáljának első előzetes becslésére. A BAF-ot azonban befolyásolhatja a vizsgálati organizmus lipidtartalma és az üledék szervesszéntartalma. Ezért a szerves szén-víz megoszlási hányadost (K_{ow}) is lehet az üledékhez kapcsolódó szerves anyagok biológiai felhalmozódásának fő meghatározójaként használni.
8. Ez a vizsgálat a következőkre alkalmazható:
 - stabil, szerves anyagok, amelyek $\log K_{ow}$ -értéke 3,0 és 6,0 közötti (5) (19), valamint szuperlipofil anyagok, amelyek 6,0 feletti $\log K_{ow}$ -értéket mutatnak (5);
 - olyan anyagok, amelyek az élő szervezetekben ismert biológiai felhalmozódási potenciált mutató szerves anyagok csoportjába tartoznak, pl. felületaktív anyagok vagy nagymértékben adszorbeáló anyagok (pl. magas K_{ow}).

9. A vizsgálat megkezdése előtt össze kell gyűjteni a vizsgált anyagra vonatkozó információkat, például a biztonsági előírásokat, a megfelelő tárolási körülményeket és az analitikai módszereket. A (20) és a (21) szakirodalom iránymutatást ad a fizikai-kémiai jellegzetességeiknél fogva nehezen vizsgálható anyagok vizsgálatához. A vízi kevéssertjűekkel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálat végrehajtása előtt ismerni kell az alábbi információkat:
- közönséges név, kémiai név (lehetőleg az IUPAC név), szerkezeti képlet, CAS nyilvántartási szám, tisztaság;
 - vízdoldhatóság [A.6. vizsgálati módszer (22)];
 - oktanol-víz megoszlási hányados, K_{ow} [A.8. és A.24. vizsgálati módszer (22)];
 - üledék-víz megoszlási hányados, K_d vagy K_{oc} formájában kifejezve [C.19. vizsgálati módszer (22)];
 - hidrolízis [C.7. vizsgálati módszer] (22);
 - fototranszformáció vízben (23);
 - gőznyomás [A.4. vizsgálati módszer (22)];
 - gyors biológiai lebonthatóság [C.4. és C.29. vizsgálati módszer (22)];
 - felületi feszültség [A.5. vizsgálati módszer (22)];
 - kritikus micellakonzentráció (24).
- Ezenkívül – ha rendelkezésre állnak – a következő adatok lehetnek lényegesek:
- biológiai lebomlás vízi környezetben [C.24. és C.25. vizsgálati módszer (22)];
 - Henry-állandó.
10. A radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyagok megkönnyíthetik a víz, az üledékek és a biológiai minták elemzését, és annak eldöntésére is felhasználhatók, hogy szükség van-e a lebomlási termékek azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az itt leírt módszert nemzetközi körvizsgálatban validálták (12) $a^{14}C$ -vel jelölt anyagok tekintetében. Amennyiben az összes radioaktív maradékot megmérjük, a biológiai felhalmozódási tényező (BAF) a kiindulási anyagon alapul, beleértve a visszatartott bomlástermékeket is. Lehetőség van a metabolizmus vizsgálatok és a biológiai felhalmozódási vizsgálatok összekapcsolására is a kiindulási anyag és bomlástermékeinek a felvételi fázis végén vagy a biológiai felhalmozódás legmagasabb szintje mellett vett mintákban történő elemzése és százalékos számszerűsítése útján. Ajánlott, hogy a BAF-számítás a kiindulási anyag organizmusokban lévő koncentrációján alapuljon, és ne az összes radioaktív maradványon.
11. A vizsgált anyag tulajdonságai mellett szükség van a vizsgálat során használandó kevéssertjű fajjal szembeni toxicitásra vonatkozó információra is (például a felvételi fázishoz szükséges időtartamra vonatkozó közepes letális koncentráció (LC_{50}) annak érdekében, hogy a kiválasztott expozíciós koncentrációk sokkal alacsonyabbak legyenek, mint a toxikus szintek. Lehetőség szerint a szubletális végpontokkal végzett hosszú távú vizsgálatokból származó toxicitási értékeket (EC_{50}) kell alkalmazni. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, a biológiai felhalmozódási vizsgálat feltételeivel megegyező feltételek mellett végzett akut toxicitási vizsgálat, vagy a helyettesítő fajokra vonatkozó toxicitási adatok hasznos információval szolgálhatnak.
12. Rendelkezni kell egy ismert pontosságú, precizitású és érzékenységgel rendelkező megfelelő analitikai módszerrel az anyag vizsgálatához használt oldatokban, üledékben és biológiai anyagokban való mennyiségi meghatározására, valamint a minták előkészítésére és tárolására vonatkozó részletes eljárásokkal, illetve az anyagok biztonsági adatlapjaival. Ismerni kell a vizsgált anyag analitikai kimutathatósági határát vízben, üledékben és feregszövetekben. Radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyag használata esetén ismerni kell a fajlagos radioaktivitást (Bq/mol), a radioaktív izotóppal jelölt atom helyzetét, illetve a szennyeződésekhez kapcsolódó radioaktivitás százalékos arányát is. A lehető legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk kimutatása érdekében a vizsgált anyag fajlagos radioaktivitásának a lehető legmagasabbnak kell lennie (11).
13. Rendelkezésre kell állnia a használandó üledék jellemzőinek (pl. az üledék vagy összetevőinek eredete, a pórusvíz (terepi üledék) pH-ja és ammóniakoncentrációja, szerves széntartalom (TOC), szemcseméret-eloszlás [a homok, iszap és agyag százalékos aránya], száraztömeg-százalék) (6).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgálat két fázisból áll: a felvételi (expozíciós) fázisból és az ürülési (expozíció utáni) fázisból. A felvételi fázis alatt a férgek a vizsgált anyaggal szennyezett, mesterséges vízzel feltöltött és megfelelő módon egyensúlyba került üledéknek tesszük ki (11). A kontroll férgek csoportjait azonos körülmények között tartjuk, de a vizsgált anyag nélkül.
15. Az ürülési fázishoz a férgek átelyezünk egy vizsgált anyagtól mentes üledék-víz rendszerbe. Az ürülési fázisra azért van szükség, hogy információt lehessen szerezni a vizsgált anyagnak a vizsgálati organizmusokból való kiürülési sebességről (19) (25). Az ürülési fázis csak akkor hagyható el, ha a vizsgált anyag felvétele az expozíciós fázis alatt elhanyagolható mértékű volt (pl. nincs statisztikai különbség a vizsgált anyagnak a vizsgálati és kontroll férgekben mért koncentrációja között). Ha az állandósult állapotot a felvételi fázis alatt nem értük el, a kinetika (BAF_k , felvételi és ürülési konstans(ok)) meghatározása az ürülési fázis eredményeinek felhasználásával is történhet. A vizsgált anyag koncentrációjának változását a férgekben/fergéken a vizsgálat mindkét fázisa során mindvégig figyelemmel kell kísérni.
16. A felvételi fázis alatt mindaddig méréseket végzünk, amíg a BAF eléri a platót vagy az állandósult állapotot. Alapértelmezésben a felvételi fázis 28 napig tart. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a 12–14 napos felvételi fázis több stabil, semleges szerves anyag esetében is elegendő az állandósult állapot eléréséhez (6) (8) (9).
17. Ha azonban 28 napon belül nem érjük el az állandósult állapotot, elindítjuk az ürülési fázist a szennyezésnek kitett kevéssertéjűeket olyan edényekbe áthelyezve, amelyek ugyanazt a közeget tartalmazzák, de a vizsgált anyag nélkül. Az ürülési fázis akkor ér véget, amikor a férgekben elérjük a felvételi fázis 28. napján mért koncentráció 10 %-os szintjét, vagy egy 10 napos maximális időtartam elteltével. A férgekben az ürülési fázis végén mért maradványszintet kiegészítő végpontként kell jegyzőkönyveznünk, pl. nem kiválasztott maradványokként (non-eliminated residues, NER). A biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_{ss}) lehetőleg a férgekben (C_w) és az üledékben (C_s) láthatóan állandósult állapotban mért koncentrációk hányadosaként, illetve kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőként (BAF_k) (az üledék felvételi sebességi állandó (k_w) és az ürülési sebességi állandó (k_s) hányadosa, elsőrendű kinetikát feltételezve) is ki kell számítani. Ha az állandósult állapotot nem érjük el 28 napon belül, a BAF_k értékét a felvételi és az ürülési sebességi állandó(k)ból kell kiszámítani. A számításat lásd a 2. függelékben. Ha nem alkalmazható az elsőrendű kinetika, összetettebb modelleket kell használni (2. függelék és (25) szakirodalom).
18. Ha az állandósult állapot nem érhető el 28 napon belül, a felvételi fázis választhatóan meghosszabbítható a kitett férgek csoportjait – ha vannak – a további méréseknek alávétve mindaddig, amíg az állandósult állapotot elérik; ezzel párhuzamosan az ürülési fázist a felvételi fázis 28. napján azonban meg kell kezdeni.
19. A felvételi sebességi állandót, az ürülési sebességi állandót (vagy komplexebb modellek használata esetén állandókat), a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_k) és – amennyiben lehetséges – e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciaintervallumot számítógépes módszerrel, modellegyenletekből kell kiszámítani (az útmutatást lásd a 2. függelékben). Bármely modell esetében az illeszkedés megfelelősége meghatározható például a korrelációs együttható vagy a determinációs együttható alapján (az együttható 1-hez közeli értéke jelzi a jó illeszkedést).
20. Magas lipofilitású szerves anyagok esetében a vizsgálati eredmények variabilitásának csökkentése érdekében a biológiai felhalmozódási tényezőket ezen kívül a vizsgált organizmusok lipidtartalmához és az üledék szervesszén-tartalmához (TOC) viszonyítva is ki kell fejezni (bióta-üledék felhalmozódási tényező vagy BSAF, kg üledék TOC/kg féreg lipidtartalom). Ez a megközelítés a vízi kompartmentre vonatkozó tapasztalatokon és elméleti összefüggéseken alapul, ahol – egyes kémiai osztályok esetén – egyértelmű összefüggés áll fenn az anyagok biológiai felhalmozódási potenciálja és lipofilitása között, amely már jól megalapozott a halak, mint modellszervezetek esetében (14) (25) (27). Kapcsolat áll fenn a vizsgálati halak lipidtartalma és az ilyen anyagok megfigyelt biológiai felhalmozódása között is. Bentikus organizmusok esetében is hasonló korrelációt állapítottak meg (15) (16) (17) (18). Ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a vizsgálati állatok lipidtartalmát ugyanabból a biológiai anyagból lehet meghatározni, mint amelyet a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására is használunk. Célszerű azonban legalább a felvételi fázis kezdetén vagy – lehetőleg – a végén akklimatizált kontroll állatokat használni a lipid tartalom mérésére, amelyet azután a BAF-értékek normalizálására lehet használni.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

21. A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:
- A férgek kumulatív mortalitása (kontrollok és kezelések) a vizsgálat végéig nem haladhatja meg az eredeti szám 20 %-át.
 - Bizonyítani kell továbbá, hogy a férgek beássák magukat az üledékbe, ami lehetővé teszi a maximális expozíciót. A részleteket lásd a 28. pontban.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A vizsgálathoz használt fajok

22. A vízi kevéssertéjűek több fajtát lehet használni a vizsgálathoz. A leggyakrabban használt fajok jegyzéke a 6. függelékben található.
23. Rendszeres időközönként (pl. minden hónapban) toxicitási vizsgálatot (96 óra, csak vízben) kell végezni egy toxikus referenciaanyaggal, például kálium-kloriddal (KCl) vagy réz-szulfáttal (CuSO_4) (1) a vizsgálati állatok egészségi állapotának igazolása céljából (1) (6). Ha rendszeres időközönkénti referencia toxicitási vizsgálatokat nem végzünk, az organizmusok üledék biológiai felhalmozódási vizsgálatban használandó tételét toxikus referenciaanyaggal kell ellenőrizni. A lipidtartalom mérése szintén hasznos információkkal szolgálhat az állatok állapota tekintetében.

A vizsgálathoz használt organizmusok tenyésztése

24. Annak érdekében, hogy elegendő számú féreg álljon rendelkezésre a biológiai felhalmozódási vizsgálatok lefolytatására, a férgeket egyetlen fajt tartalmazó állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani. A kiválasztott fajok laboratóriumi tenyésztési módszereit a 6. függelék összegzi. A részleteket lásd a (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32) szakirodalmi hivatkozásban.

Készülékek

25. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, amelyek abszorbeálhatják a vizsgált anyagot, amelyek révén más anyagok mosódhatnak ki, valamint amelyek ártalmasak lehetnek a vizsgálathoz használt állatokra. Szabványos, kémiaiilag inert anyagból készült, a terhelés mértékének – vagyis a kísérleti állatok számának – megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres kamrák használhatók. Kerülni kell a puha műanyag csövek használatát a víz vagy levegő adagolásához. A vizsgálati közeggel érintkező berendezésekben politetrafluoretilént, rozsdamentes acélt és/vagy üveget kell használni. Magas adszorpciós együtthatóval rendelkező anyagok – például szintetikus piretroidok – vizsgálata esetén szilanizált üveg használata lehet szükséges. Ilyenkor a felszerelést használat után meg kell semmisíteni (5). A radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyagok és az illékony anyagok esetében ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a kihajtást és a kihajtott vizsgált anyag kijutását. Megfelelő abszorbenst tartalmazó csapdákat (pl. üveg gázmosó palackokat) kell használni a vizsgálati kamrákból elpárolgó maradványok visszatartására (11).

Víz

26. A fedővíz minőségének lehetővé kell tennie a vizsgálati fajok túlélését az akklimatizációs és a kísérleti időszakok alatt anélkül, hogy bármilyen rendellenes külső megjelenés vagy viselkedés jelentkezne. A vizsgálatokban, valamint a férgek laboratóriumi tenyészeiben fedővízként a C.1. vizsgálati módszer szerinti mesterséges víz (25) használata ajánlott. Kimutatták, hogy ebben a vízben számos vizsgálati faj képes túlélni, növekedni és szaporodni (8), és biztosított vizsgálati és tenyésztési körülmények maximális szabványosítása. A vizet legalább a pH-val, a vezetőképességgel és a keménységgel kell jellemezni. A vízben található mikroszennyező anyagok felhasználás előtti analízise hasznos információkat nyújthat (4. függelék).
27. A vizsgálati időszak alatt a víznek állandó minőségűnek kell lennie. A fedővíz pH-értékének az egész vizsgálat során 6 és 9 között kell lennie. Az összes keménységnek a vizsgálat kezdetén 90 és 400 mg CaCO_3 /liter között kell lennie (7). Az említett mesterséges víz pH- és keménységtartományait a C.1. vizsgálati módszer adja meg (25). Ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag közötti kölcsönhatás gyanúja áll fenn, lágyabb vizet kell használni. A 4. függelék összefoglalja az elfogadható hígítóvíznek az OECD 210. vizsgálati iránymutatása szerinti további kritériumait (34).

Üledék

28. A vizsgálathoz olyan minőségű üledéket kell használni, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt organizmusok túlélését és lehetőség szerinti szaporodását az akklimatizációs és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A férgeknek be kell ásnuk magukat az üledékbe. A beásási viselkedés jelentős hatást gyakorolhat az expozícióra és ennek következtében a BAF-értékre. Ezért a vizsgálati organizmusok üledékkerülő vagy beásási viselkedését fel kell jegyezni, ha a fedővíz zavarossága lehetővé teszi az ilyen megfigyeléseket. A férgeknek (kontroll és kezelések) a vizsgálati edényekbe történő behelyezést követően 24 órán belül be kell ásnuk magukat az üledékbe. Ha állandósult beásási hiba vagy az üledék elkerülése figyelhető meg (pl. a férgek több mint 20 %-ánál a felvételi fázis több mint felén át), az azt jelzi, hogy a vizsgálati körülmények nem megfelelőek, vagy a vizsgálati organizmusok nem egészségesek, vagy a vizsgált anyag koncentrációja váltja ki ezt a viselkedést. Ilyen esetben a vizsgálatot le kell állítani, és jobb körülmények között megismételni. Az üledékfogyasztásra vonatkozó további információk nyerhetők a (35) és (36) szakirodalmi hivatkozásban leírt módszerek alkalmazásával, amelyek meghatározzák az üledékfogyasztást és a részecskék kiválasztását a vizsgálati organizmusokban. Amennyiben megfigyelhető, fel kell jegyezni legalább az üledék férgek általi elfogyasztását jelző székletpelletek jelenlétét vagy hiányát az üledék felszínén, és ezt a vizsgálati eredmények értelmezése során az expozíciós útvonalak tekintetében figyelembe kell venni.
29. A vizsgálatokban és a férgek laboratóriumi tenyészeiben (5. függelék) a C.8. vizsgálati módszerben leírt mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék (40) használata ajánlott, mivel a megfelelő minőségű természetes üledékek nem állnak rendelkezésre egész évben. Ezenkívül a természetes üledékekben eleve jelen lévő mikroorganizmusok, valamint a lehetséges mikroszennyezők is befolyásolhatják a vizsgálatot. A mesterséges üledékben több vizsgált faj is képes túlélni, fejlődni és szaporodni (8).
30. A mesterséges üledéket legalább az összetevők eredetével, a szemcseméret eloszlásával (homok, iszap és agyag százalékos aránya), az összes szerves széntartalommal (TOC), a víztartalommal és a pH-val kell jellemezni. A redox potenciál mérése választható. Nem szennyezett területekről származó természetes üledékek is szolgálhatnak azonban vizsgálati és/vagy tenyésztő üledékként (1). A természetes üledékeket legalább az eredet (gyűjtőhely), a pórúsvíz pH-jával és ammóniatartalmával, a szerves széntartalommal (TOC), a szemcseméret-eloszlással (homok, iszap és agyag százalékos aránya), valamint a százalékos víztartalommal kell jellemezni (6). Ha ammónia képződésére lehet számítani, a vizsgált anyaggal való szennyezés előtt ajánlott a természetes üledéket – az elkövetkező vizsgálat során uralkodóval megegyező körülmények között – hét napig kondicionálni. E kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Az üledékben, illetve az összetevőiben található mikroszennyező anyagok analízise a felhasználás előtt hasznos információkat szolgáltathat.

Elkészítés

31. A természetes üledékek használat előtti kezelését a laboratóriumban az (1), (6) és (44) szakirodalom írja le. A mesterséges üledék elkészítését a 5. függelék mutatja be.

Tárolás

32. A természetes üledékek tárolása a laboratóriumban a lehető legrövidebb időtartamú legyen. Az US EPA (6) a tárolás maximális időtartamának a 8 hetet javasolja 4 ± 2 °C-on és sötétben. A tárolótartályokban nem lehet fejtér az üledék felett. A mesterséges üledék tárolására vonatkozó ajánlások az 5. függelékben találhatóak.

A vizsgált anyag bevitele

33. Az üledéket beszennyezzük a vizsgált anyaggal. A szennyezési eljárás magában foglalja egy vagy több üledékösszetevő vizsgált anyaggal való bevonását. Például a kvarchomokot, vagy annak egy részét (pl. vizsgálati edényenként 10 g kvarchomokot) át lehet itatni a vizsgált anyag megfelelő oldószerezrel elkészített oldatával, amely azután elpárolog. Ezt követően a bevont részt össze lehet keverni a nedves üledékkel. Az üledék elkészítése során a vizsgált anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni, azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni (6).

34. Természetes üledék esetében a vizsgált anyagot úgy is be lehet vinni, hogy az üledék egy kiszárított részét szennyezzük be a mesterséges üledék kapcsán fentebb leírtak szerint, vagy a vizsgált anyagot elkeverjük a nedves üledékben és a használt oldódást segítő szert utólag elpárologtatjuk. A nedves üledék szennyezésére felhasználható oldószerek: etanol, metanol, etilén-glikol-metil-éter, etilén-glikol-dimetil-éter, dimetil-formamid és trietilén-glikol (5) (34). A megfelelő oldódást segítő szer kiválasztásakor az oldószer toxicitása és illékonyága, illetve a vizsgált anyagnak a kiválasztott oldószerben való oldhatósága legyen a fő kritérium. A szennyezési eljárásokra vonatkozó további útmutatást az Environment Canada (1995) szolgáltat (41). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Analizálni kell a szennyezett üledék párhuzamos részmintáit a vizsgált anyag üledékben lévő koncentrációjának ellenőrzése céljából, illetve hogy meghatározzuk a vizsgált anyag eloszlásának homogenitását.
35. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyni kell, hogy a vizsgált anyag eloszoljon az üledék és a vízfázis között. Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A kiegyensúlyozódási időszak üledék- és anyagspecifikus, tartama órától napokig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet (28) (42). Ebben a vizsgálatban az egyensúly beálltát nem kell megvárni, hanem egy 48 óra és 7 nap közötti hosszúságú kiegyensúlyozási időszak használata ajánlott. A vizsgálat céljától függően (pl. ha a környezeti feltételeket kell utánozni) a szennyezett üledéket hosszabb ideig lehet hagyni, hogy közelítse az egyensúlyi állapotot, illetőleg hogy érjen.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Előzetes vizsgálat

36. Hasznos lehet elővizsgálatot végezni a meghatározó vizsgálat körülményeinek optimalizása céljából, pl. a vizsgált anyag koncentrációjának és a felvételi és ürülési fázisok időtartamának megválasztása érdekében. Az előzetes vizsgálat során meg kell figyelni és fel kell jegyezni a férgek viselkedését, például az üledék elkerülését (amikor a férgek elmenekülnek az üledékből), amit a vizsgált anyag és/vagy maga az üledék okozhat. Az előzetes vizsgálat során az üledék elkerülését szubletális paraméterként is lehet használni a vizsgált anyag biológiai felhalmozódási vizsgálatban használandó koncentrációjának/koncentrációinak becslésére.

Expozíciós körülmények

A felvételi fázis időtartama

37. A vizsgálatához használt organizmusokat a felvételi fázisban tesszük ki a vizsgált anyagnak. Az első mintát 4–24 órával a felvételi fázis kezdete után kell venni. A felvételi fázis legfeljebb 28 napig tart (1) (6) (11), kivéve ha igazolható, hogy az egyensúly korábban beállt. Az állandósult állapot akkor jelentkezik, ha: (i) az egyes mintavételi időszakokra vonatkozó és az idő függvényében ábrázolt biológiai felhalmozódási tényezők görbéje párhuzamos az időtengellyel; (ii) a BAF legalább kétnapos időközönként vett mintákon végzett három egymást követő elemzése nem tér el ± 20 %-ot meghaladó mértékben egymástól; és (iii) a három mintavételi időszak között nincsenek szignifikáns különbségek (statisztikai összehasonlítás alapján, pl. varianciaanalízis és regresszióanalízis). Amennyiben az állandósult állapot nem áll be 28 napon belül, a felvételi fázist az ürülési fázis megkezdésével be lehet fejezni, és a BAF_k értékét a felvételi és ürülési sebességi állandókból lehet kiszámítani (lásd még a 16. és 18. pontot).

Az ürülési fázis időtartama

38. Az első mintát 4–24 órával az ürülési fázis megkezdése után kell venni, mivel a kezdeti időszakban gyors változások következhetnek be a szöveti maradványokban. Az ürülési fázist akkor javasolt befejezni, amikor a vizsgált anyag koncentrációja az egyensúlyi koncentráció legfeljebb 10 %-a, vagy egy 10 napos maximális időtartam után. A férgekben az ürülési fázis végén mért maradványszintet másodlagos végpontként kell jegyzőkönyvezni. Az időtartamot azonban az a periódus is megszabhatja, amely alatt a férgekben a vizsgált anyag koncentrációja az analitikai kimutathatósági határérték fölött marad.

A vizsgálathoz használt organizmusok

A vizsgálathoz használt férgek száma

39. A férgek mintánkénti számának egy olyan féregszövet-tömeget kell biztosítania, hogy a vizsgált anyag mintánkénti tömege a felvételi fázis elején és az ürülési fázis végén lényegesen magasabb legyen, mint a vizsgált anyag kimutathatósági határa biológiai anyagokban. A felvételi és ürülési fázis említett szakaszaiban a koncentráció a vizsgálati állatokban rendszerint viszonylag alacsony (6) (8) (18). Mivel a vízi kevéssertéjűek számos faja esetén az egyes példányok tömege nagyon alacsony (5–10 mg nedves tömeg példányonként a *Lumbriculus variegatus* és a *Tubifex tubifex* esetén), az egy vizsgálati kamrában lévő férgeket a tömegmérés és kémiai analízis céljára össze lehet vonni. A magasabb egyedi tömeggel rendelkező vizsgálati fajok (pl. *Branchiura sowerbyi*) esetén egy példányt tartalmazó ismétléseket is lehet használni, de ilyen esetben az ismétlések számát mintavételi pontonként ötre kell emelni (11). Meg kell azonban jegyezni, hogy a *B. sowerbyi* fajt nem vonták be a körvizsgálatba (12), és ezért nem szerepel a módszerben előnyben részesítendő fajok között.
40. Hasonló méretű férgeket kell választani (az *L. variegatus* esetében lásd a 6. pontot). A férgek ugyanabból a forrásból származzanak, és azonos korosztályú, felnőtt és nagytestű állatok legyenek (lásd a 6. függelékét). Az állat tömege és kora jelentős hatással lehet a BAF-értékekre (pl. az eltérő lipidtartalom és/vagy a peték jelenléte miatt); ezeket a paramétereket pontosan fel kell jegyezni. Az átlagos nedves és száraz tömeg mérése céljából a vizsgálat megkezdése előtt meg kell mérni a férgek egy részmintáját.
41. A *Tubifex tubifex* és a *Lumbriculus variegatus* esetében szaporodás várható a vizsgálati időszak alatt. A biológiai felhalmozódási vizsgálat alatti szaporodás hiányát fel kell jegyezni, és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.

Betelepítés

42. Nagy üledék/féreg és víz/féreg arányokat kell használni, hogy minimalizálható legyen a vizsgált anyag üledékkoncentrációjának csökkenése a felvételi fázisban, illetve hogy elkerülhető legyen az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése. A kiválasztott betelepítési aránynak a kiválasztott faj természetben előforduló populációsűrűségének is meg kell felelnie (43). Például a *Tubifex tubifex* esetében 1–4 mg féregszövet betelepítési arány (nedves tömeg) ajánlott a nedves üledék egy grammjára vetítve (8) (11). Az (1) és (6) szakirodalom ≤ 1 g féregszövet száraz tömeg betelepítési arányt ajánl *L. variegatus* esetében 50 g üledékbeli szerves széntartalomra vetítve.
43. A vizsgálatban használandó férgeket a tenyésztőüledék szitálásával távolítjuk el a tenyészetből. Az állatokat (közelmúltban lezajlott fragmentáció jeleit nem mutató felnőtt vagy nagy férgeket) tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (pl. Petri-csészékbe) helyezzük át. Ha a vizsgálati feltételek eltérnek a tenyésztési körülményektől, akkor 24 órás akklimatizációs szakaszra van szükség. Mérés előtt a felesleges vizet el kell távolítani a férgéről. Ez úgy történhet, hogy a férgeket óvatosan egy előnedvesített papírkendőre helyezzük. Nem ajánlott nedvszívó papírt használni a férgek szárítására, mert stresszt okozhat vagy károsíthatja a férgeket. Brunson és munkatársai (1998) a kívánt élőanyag-tömeg 1,33-szorosának megfelelő nem letörölgetett féreg használatát javasolják. A többlet 33 % a letörölgetett és a nem letörölgetett férgek közötti különbségnek felel meg (28).
44. A felvételi fázis elején (a vizsgálat 0. napján) a vizsgálati organizmusokat eltávolítjuk az akklimatizációs kamrából, és véletlenszerűen szétosztjuk a mesterséges vizet tartalmazó edények (pl. Petri-csészék) között úgy, hogy minden edényhez két féregből álló csoportokat adunk hozzá, amíg minden edény tíz férget nem tartalmaz. Ezután a féregcsoportokat véletlenszerűen áthelyezzük külön vizsgálati edényekbe, pl. lágycél csipesszel. Ezt követően a vizsgálati edényeket vizsgálati körülmények között inkubáljuk.

Táplálás

45. Tekintettel a mesterséges üledék alacsony tápanyagtartalmára, az üledéket táplálékforrással kell kiegészíteni. Annak érdekében, hogy ne becsüljük alá a vizsgálati organizmusok expozícióját (pl. nem szennyezett táplálék szelektív etetésével), a vizsgált organizmusok szaporodásához és növekedéséhez szükséges táplálékot egyszerűen kell hozzáadni az üledékhez a vizsgált anyag alkalmazása előtt vagy az alkalmazás során (lásd az 5. függelékét).

Üledék-víz arány

46. Az ajánlott üledék-víz arány 1:4 (45). Ezt az arányt megfelelőnek tekintik az oxigénkoncentráció megfelelő szinten tartásához, illetve az ammónia fedővízben történő felhalmozódásának elkerüléséhez. A fedővíz oxigéntartalmát a telítettség ≥ 40 %-án kell tartani. A vizsgálati edények fedővizét óvatosan levegőztetni kell (pl. 2–4 buborék másodpercenként) egy Pasteur-pipettán keresztül, amelyet kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett kell elhelyezni, hogy minimalizáljuk az üledék felkavarodását.

Fény és hőmérséklet

47. A tenyészetben és a vizsgálatban a megvilágítási időszak általában 16 óra (1) (6). A vizsgálati területen mintegy 500–1 000 lux megvilágítást kell fenntartani. A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani.

Vizsgálati koncentrációk

48. Egyetlen vizsgálati koncentrációt (a lehető legalacsonyabbat) használunk a felvétel kinetika meghatározására, de egy második (magasabb) koncentráció is használható (pl. (46)). Ebben az esetben az állandósult állapotban vagy 28 nap után mintákat veszünk, és az alacsonyabb koncentráción mért BAF megerősítése céljából elemezzük azokat (11). A magasabb koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy a káros hatások kizárhatók legyenek (pl. a megfelelő krónikus toxicitási vizsgálatokban kapott EC_x krónikus hatást okozó legkisebb koncentráció körülbelül 1 %-ának kiválasztásával). Az alacsonyabb vizsgálati koncentrációnak jelentős mértékben meg kell haladnia az alkalmazott analitikai módszer kimutathatósági határértékét üledékekben és biológiai mintákban. Ha a vizsgált anyag hatáskonzentrációja közel van az analitikai kimutatási határhoz, radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyag használata ajánlott nagy fajlagos radioaktivitással.

Kezelt és kontroll ismétlések

49. A kinetikai mérésekhez a kezelt ismétlések minimális száma az egész felvételi és ürülési fázis során mintavételi pontonként három legyen (11). További ismétléseket kell alkalmazni például a választható kiegészítő mintavételi dátumokhoz. Az ürülési fázis esetében megegyező számú ismétlést készítünk nem szennyezett üledékkel és fedővízzel, hogy a felvételi fázis végén a kezelt férgek a kezelt edényekből nem kezelt edényekbe helyezhessük át. A kezelt ismétlések összes számának a felvételi és az ürülési fázishoz egyaránt elegendőnek kell lennie.
50. Alternatív megoldásként az ürülési fázisban történő mintavételre kijelölt férgeket egy olyan nagy tartályban is ki lehet tenni a vizsgált anyagnak, amely a felvételi kinetika során használttal megegyező tételből származó szennyezett üledéket tartalmaz. Bizonyítani kell, hogy a vizsgálati körülmények (pl. az üledék mélysége, az üledék-víz arány, a betelepítés, a hőmérséklet, a víz minősége) hasonlóak a felvételi fázishoz kijelölt ismétlések körülményeihez. A felvételi fázis végén víz-, üledék- és féregmintákat kell venni ebből a tartályból analízis céljára, és elegendő számú, a közelmúltban bekövetkezett fragmentáció jeleit nem mutató nagy férget kell ebből a tartályból óvatosan eltávolítani és áthelyezni az ürülési fázishoz előkészített ismétlésekbe (pl. ismétlésenként tíz férget).
51. Ha oldószert nem, csak vizet használunk, legalább 9 negatív kontroll ismétlést (legalább 3-ból az indításkor, 3-ból a felvétel végén és 3-ból az ürülés végén kell mintát venni) kell biztosítani a biológiai és a háttérelmézés céljára. Ha a vizsgált anyag bevitelére oldódást segítő szert alkalmazunk, egy oldószeres kontrollt is futtatni kell (legalább 3 ismétlésből az indításkor, 3-ból a felvételi fázis végén és 3-ból az ürülési fázis végén kell mintát venni). Ebben az esetben a legalább 4 negatív kontroll ismétlést (oldószer nélkül) kell biztosítani a felvételi fázis végén történő mintavételhez. Ezek az ismétlések az oldószeres kontrollal való biológiai összehasonlításra szolgálnak, amelyből az oldószernek a vizsgálatához használt organizmusokra gyakorolt lehetséges hatásáról kaphatunk tájékoztatást. Ennek részletei a 3. függelékben szerepelnek.

A vízminőség mérésének gyakorisága

52. A fedővízben legalább az alábbi vízminőségi paramétereket kell mérni a felvételi és az ürülési fázis alatt:

Hőmérséklet	minden kezelési szinten mintavételi időpontonként egy edényben, valamint egy kontroll edényben hetente egyszer és a felvételi és az ürülési fázis elején és végén; a környező közeg (környezeti levegő vagy vízfürdő) vagy egy reprezentatív vizsgálati edény hőmérsékletét is fel kell jegyezni, pl. folyamatosan vagy óránként;
Oldott oxigén koncentrációja	minden kezelési szinten egy edényben, valamint mintavételi időpontonként egy kontroll edényben; mg/l-ben és az ASV (levegő telítettségi érték) százalékában kifejezve;
Levegőellátás	legalább naponta egyszer kell ellenőrizni (munkanapokon), és szükség esetén módosítani kell;
pH	minden kezelési szinten mintavételi időpontonként egy edényben, valamint egy kontroll edényben hetente egyszer és a felvételi és az ürülési fázis elején és végén;
A víz összes keménysége	legalább egy kezelt edényben és egy kontroll vizsgálati edényben a felvételi és az ürülési fázis elején és végén, mg CaCO ₃ /l mértékegységben kifejezve;
Összes ammóniatartalom	legalább egy kezelt edényben és egy kontroll vizsgálati edényben a felvételi és az ürülési fázis elején és végén; mg/l NH ⁴⁺ vagy NH ₃ vagy összes ammónia-N formában kifejezve.

A féreg, üledék- és vízminták gyűjtése és analízise

Mintavételi ütemterv

53. A 28 napos felvételi fázisra és 10 napos ürülési fázisra vonatkozó mintavételi ütemtervre a 3. függelék mutat példákat.
54. A vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározásához a férgek behelyezése előtt, valamint a felvételi és az ürülési fázis során kell víz- és üledékmintákat venni a vizsgálati edényekből. A vizsgálat alatt meghatározzuk a vizsgált anyag koncentrációját a férgekben, az üledékben, és a vízben, hogy nyomon követhessük a vizsgált anyagok a vizsgálati rendszer kompartmentjei közötti eloszlását.
55. A felvételi, illetve az ürülési fázis során egyaránt legalább hat alkalommal kell mintát venni a férgekben, az üledékben és a vízből.
56. Addig folytassuk a mintavételt, amíg egy plató (állandósult állapot) nem alakul ki (lásd az 1. függelék), vagy 28 napig. Ha a platót nem sikerül 28 napon belül elérni, el kell kezdeni az ürülési fázist. Az ürülési fázis elején a kijelölt férgeket kezeletlen üledéket és vizet tartalmazó ismétlésekbe helyezük át (lásd még a 17. és 18. pontot).

Mintavételezés és a minták előkészítése

57. A vízmintákat dekantálás, kiszívás vagy pipettázás útján vegyük a vizsgált anyag mintában lévő mennyiségének mérésére elegendő térfogatban.
58. A fennmaradó fedővizet óvatosan dekantáljuk vagy kiszívjuk a vizsgálati kamrá(k)ból. Az üledékmintákat óvatosan kell venni, hogy a férgeket csak minimális mértékben zavarjuk.
59. A mintavétel időpontjában az összes férget távolítsuk el a vizsgálati ismétlésből, pl. szuszpendáljuk az üledéket a fedővízzel, terítsük szét az ismétlés tartalmát egy lapos tálban, majd szedegessük ki a férgeket egy lágy acélcspeszszel. A férgeket gyorsan öblítsük le vízzel egy lapos üveg- vagy acéltálcán. Távolítsuk el a vízfelesleget. Óvatosan helyezzük át a férgeket egy előzetesen lemért edénybe, és mérjük le a tömegüket. A férgeket fagyasz-tással (pl. ≤ -18 °C-on) pusztítsuk el. Fel kell jegyezni a bábok és/vagy fiatal egyedek jelenlétét és számát.

60. A férgek a mintavétel után általában azonnal, a béltartalom ürítése nélkül kell megmérni és elpusztítani, hogy egy konzervatív BAF-értéket kapjunk, amely magában foglalja a szennyezett béltartalmat is, és hogy elkerüljük a testben lévő maradványok elvesztését a csak vízből álló környezetben bekövetkező bélürítési időszak alatt (8). Az 5 feletti $\log K_{ow}$ értékkel rendelkező anyagok várhatóan nem ürülnek ki jelentős mértékben a vizes környezetben bekövetkező bélürítési időszakban, míg a 4 alatti $\log K_{ow}$ -értékű anyagok számottevő mennyisége elveszhet (47).
61. Az ürülési fázis alatt a tiszta üledékben a férgek kiürítik a béltraktusukat. Ez azt jelenti, hogy a közvetlenül az ürülési fázis előtt végzett mérések még tartalmazzák a szennyezett bélüledéket is, az ürülési fázis kezdeti 4–24 órás időszaka után a szennyezett béltartalom nagyobb része helyébe azonban feltételezhetően már tiszta üledék került (11) (47). Az ebbe a mintába tartozó férgekben mérhető koncentrációt emiatt úgy lehet tekinteni, hogy az a bélürítés utáni szöveti koncentrációval egyezik meg. Annak figyelembevételére érdekében, hogy az ürülési fázisban a vizsgált anyag koncentrációja a nem szennyezett üledék általi hígítás miatt csökkenhet, a béltartalom tömegét a férgek nedves tömegének az elhamvasztott férgek tömegéhez viszonyított aránya, illetve a férgek száraz tömegének az elhamvasztott férgek tömegéhez viszonyított aránya alapján lehet megbecsülni.
62. Ha egy specifikus vizsgálat célja a biológiai hozzáférhetőség és a valódi szöveti maradványok mérése a vizsgált organizmusokban, akkor a kezelt állatok legalább egy – lehetőleg az állandósult állapot alatt gyűjtött – részmintájának (pl. három további ismétlésből) a tömegét meg kell mérni, ezután a béltartalmat tiszta vízben 6 órán keresztül üríteni kell (47), majd részmintát az analízis előtt újból meg kell mérni. E részmintának a férgek tömegére és a testi koncentrációkra vonatkozó adatait ezután össze lehet hasonlítani a bélürítésen át nem esett férgekben kapott értékekkel. Az ürülés mérésére kijelölt férgeseket a tiszta üledékre történő áthelyezés előtt nem szabad bélürítésnek alávetni, hogy minimalizáljuk az állatokra gyakorolt stresszt.
63. A vízből, üledékből és férgesből vett mintákat az eltávolítás után lehetőleg azonnal elemezzük (azaz 1–2 napon belül), hogy megakadályozzuk a lebomlást és az egyéb veszteségeket, és hogy a közelítőleges felvételi és ürülési arányokat a vizsgálat előrehaladtával párhuzamosan számíthassuk ki. Az azonnali analízis lehetővé teszi annak kiküszöbölését is, hogy egy platót késve ismerjünk fel.
64. Ha az azonnali analízis nem történik meg, a mintákat megfelelő feltételek mellett kell tárolni. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgált anyag stabilitásáról és megfelelő tárolási körülményeiről (pl. a tárolás időtartama és hőmérséklete, kivonási eljárások, stb.). Ha ilyen információ nem áll rendelkezésre, de azt szükségesnek ítéljük, a tárolási stabilitás meghatározása céljából szennyezett kontroll szöveteket is lehet párhuzamosan futtatni.

Az analitikai módszer minősége

65. Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgált anyaghoz használt analitikai módszer pontossága, precizitása és érzékenysége határozza meg, kísérlettel ellenőrizni kell, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált anyag víz-, üledék- és férgemintákból való visszanyerése kielégítő-e az adott módszerhez. Ellenőrizzük azt is, hogy a vizsgált anyag ne legyen a háttérkoncentrációt meghaladó koncentrációban kimutatható a kontroll kamrákban. Szükség esetén korrigáljuk a C_w -, C_s - és C_a -értékeket a visszanyert értékekkel és a kontrollok háttérértékeivel. A mintákat az egész vizsgálat során olyan módon kezeljük, hogy minimális legyen a szennyezés és a veszteség (pl. a vizsgált anyagnak a mintavételi eszközön való adszorpciója miatt).
66. A teljes visszanyerést, illetve a vizsgált anyag férgesből, üledékből, vízből és – ha alkalmazzuk – az elpárolgott vizsgált anyag visszatartását szolgáló abszorbenseket tartalmazó csapdákból történő visszanyerését fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell.
67. Mivel radioaktív izotóppal jelölt anyagok használata ajánlott, lehetőség van a teljes radioaktivitás elemzésére is (azaz a kiindulási és a bomlástermékek együttes elemzésére). Ha azonban analitikusan megoldható, a kiindulási anyag és a bomlástermékek állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén történő számszerűsítése fontos információt nyújthat. Ha ilyen méréseket szándékozunk végezni, a mintákat megfelelő kivonási eljárásoknak kell alávetni, hogy a kiindulási anyagot elkülönítve lehessen mennyiségileg meghatározni. Ha egy észlelt lebomlási termék a vizsgálati organizmusokban az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén mért radioaktivitás jelentős hányadát (pl. > 10 %) képviseli, ajánlott az ilyen lebomlási termékeket azonosítani (5).

68. Az alacsony egyéni élőanyag-tömeg miatt gyakran nem lehet a vizsgált anyag koncentrációját minden egyes féregben meghatározni, kivéve, ha a *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg nedves tömeg férgenként) fajt használjuk vizsgálati fajként (11). Ezért az adott vizsgálati tartályból mintázott férgek összevonása elfogadható, de ez korlátozza az adatokra alkalmazható statisztikai eljárásokat. Amennyiben a statisztikai eljárás és annak ereje fontos szempont, megfelelő számú kísérleti állatot és/vagy párhuzamos edényt kell bevonnai a vizsgálatba, hogy megfeleljünk a kívánt összevonásnak, illetve statisztikai eljárásnak és erőnek.
69. A BAF értékét ajánlott a teljes nedves tömeg, a teljes száraz tömeg és – ha szükséges (pl. erősen lipofil anyagok esetében) – a lipidtartalom és az üledék TOC-értéke függvényében is kifejezni. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell használni (48) (49). Szabvány módszerként a kloroform/metanol extrakciós technika (50) ajánlott (48). A klórozott oldószer használata azonban kerülendő, ezért a Bligh- és Dyer-féle módszer (50) körvizsgálatban ellenőrzött és a szakirodalomban (51) leírt módosítását kell alkalmazni. Mivel a különböző módszerek eltérő értékeket eredményeznek (48), az alkalmazott módszert részletesen ismertetni kell. Amennyiben lehetséges, vagyis ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a lipidtartalom mérését a vizsgált anyag analíziséhez vett mintán vagy extraktumon kell elvégezni, mivel a lipideket a kromatográfiai módszerrel történő analízis előtt gyakran el kell távolítani az extraktumból (5). Célszerű azonban legalább a felvételi fázis kezdetén vagy – lehetőleg – a végén akklimatizálódott kontrollállatokat használni a lipidtartalom mérésére, pl. három mintában.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

70. A vizsgált anyag felvételi görbét úgy kapjuk meg, hogy a vizsgált anyagnak a felvételi fázis alatt a férgekben/ férgekben mért koncentrációit aritmetikus skálán ábrázoljuk az idő függvényében. Ha a görbe elérte a platót, kiszámítjuk az állandósult állapot BAF_{ss}-értékét:

$$\frac{C_a \text{ az állandósult állapotban vagy a 28. napon (átlag)}}{C_s \text{ az állandósult állapotban vagy a 28. napon (átlag)}}$$

71. A kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFK) a ks és a ke hányadosaként kell meghatározni. Az ürülési állandó (ke) meghatározása általában az ürülési görbe alapján történik (amely a vizsgált anyag férgekben mért koncentrációjának alakulását ábrázolja az ürülési fázisban). A felvételi sebességi állandó (ks) ezután a felvételi görbe kinetikájából számítható ki. A BAFK és a sebességi állandók (ks és ke) meghatározásához lehetőleg számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslést kell használni (lásd a 2. függelék). Ha az ürülés folyamata nyilvánvalóan nem az elsőrendű kinetikát követi, akkor összetettebb modelleket kell alkalmazni (25) (27) (52).
72. A bióta-üledék felhalmozódási tényező (BSAF) a BAFK-nak a férgek lipidtartalmával és az üledék összes szervesszén-tartalmával történő normalizálása segítségével határozható meg.

Az eredmények értelmezése

73. Amennyiben a vizsgált oldatok koncentrációi az analitikai módszer detektálási határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell értelmezni.
74. Az egyértelműen definiált felvételi és ürülési görbe megbízható biológiai felhalmozódási adatokat jelez. A jól megtervezett vizsgálatokból származó BAF-értékek konfidencia intervalluma általában nem haladhatja meg a 25 %-ot (5).

Vizsgálati jegyzőkönyv

75. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag

- fizikai jelleg, valamint fizikai-kémiai tulajdonságok, például log K_{ow} vízben való oldhatóság,
- kémiai azonosító adatok; a vizsgált anyag forrása, illetve az alkalmazott oldószer azonosítása és koncentrációja;
- ha a vizsgált anyag radioaktív izotóppal jelölt, a jelzett atomok pontos helyzete, a fajlagos radioaktivitás és a szennyező anyagokhoz kapcsolódó radioaktivitás százaléka.

A vizsgálathoz használt fajok

- tudományos név, törzs, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, életkor, mérettartomány, stb.

Vizsgálati körülmények

- alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. statikus, félstatikus vagy átfolyásos);
- az alkalmazott megvilágítás típusa és jellemzői, valamint a megvilágítási időszak(ok),
- vizsgálati terv (pl. a vizsgálati kamrák száma, anyaga és mérete, víztérfogat, az üledék tömege és térfogata, a víztérfogat helyettesítési rátája (átfolyásos vagy félstatikus eljárások esetében), a vizsgálat előtti és alatti levegőztetés, az ismétlések száma, a férgek száma ismétlésenként, a vizsgálati koncentrációk száma, a felvételi és ürülési fázis hossza, mintavételi gyakoriság);
- a vizsgált anyag előkészítése és alkalmazása, valamint az adott módszer választásának okai,
- névleges vizsgálati koncentrációk;
- a mesterséges víz és a mesterséges üledék összetevőinek forrása vagy – ha természetes közeget használunk – a víz és az üledék eredete, az előkezelés leírása, a vizsgálati állatok használt közegben való élet- és/vagy szaporodóképességének demonstrálása, az üledék jellemzői (a pórusvíz pH-ja és ammóniatartalma (természetes üledékek), szervesszén-tartalom (TOC), szemcseméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékban), százalékos víztartalom, és bármely egyéb elvégzett mérés), valamint a víz jellemzői (pH, keménység, vezetőképesség, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció, maradék klór szintek (amennyiben mérjük), és bármely egyéb elvégzett mérés);
- a mesterséges üledék névleges és mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány); a terepi üledék mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány);
- vízminőség a kísérleti kamrákban a hőmérséklettel, pH-val, ammóniummal, összes keménységgel, valamint az oldott oxigén koncentrációjával jellemezve;
- a víz-, üledék- és féregminták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés, tárolás, szennyezési eljárások és extrakció részleteit, az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a vizsgált anyagra és a lipidtartalomra vonatkozóan, valamint a vizsgált anyag visszanyerését.

Eredmények

- a kontroll férgek és az egyes vizsgálati kamrákban lévő férgek mortalitása, a megfigyelt szubletális hatások, beleértve a kóros viselkedést (pl. üledék elkerülése, székletpelletek jelenléte vagy hiánya, szaporodás hiánya);
- az üledék és a vizsgálati organizmusok mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány) (hasznos a normalizáláshoz);
- a férgek lipidtartalma;
- a vizsgált anyag férgek általi felvételének és férgekől való kiürülésének kinetikáját ábrázoló görbék, valamint az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő,
- C_a , C_s és C_w (adott esetben szórás és terjedelem) minden mintavételi időpontra (a C_a a férgek teljes teste nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban, a C_s az üledék nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban kifejezve, a C_w mg/l-ben kifejezve). Ha a bióta-üledék felhalmozódási tényezőt (BSAF; a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) is meg kell határozni (például a különböző lipidtartalmú állatokkal végzett kettő vagy több vizsgálat eredményeinek az összehasonlítása céljára), a C_a az organizmus lipidtartalmának kg-jára jutó g-ban, a C_s pedig az üledék szerves szén (OC) tartalmának kg-jára jutó g-ban is kifejezendő;

- BAF (kg nedves üledék/kg nedves féreg mértékegységben kifejezve), k_s üledék felvételi sebességi állandó (g nedves üledék/kg nedves féreg/nap mértékegységben kifejezve), valamint k_e ürülési sebességi állandó (az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki); a BSAF (amely azt fejezi ki, hogy az üledék szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára) értékét is jegyzőkönyvezni lehet;
- Nem kiválasztott maradványok (NER) az ürülési fázis végén;
- ha mérjük: a vizsgálati állatokban kimutatott kiindulási anyag, bomlástermékek, kötött maradványok százalékos aránya (azaz a vizsgált anyag százalékos aránya, amely a szokásos extrakciós módszerekkel nem vonható ki);
- az adatok statisztikai elemzéséhez használt módszerek.

Az eredmények értékelése

- az eredmények megfelelése a 21. pontban felsorolt érvényességi kritériumoknak,
- váratlan vagy szokatlan eredmények, pl. a vizsgált anyag hiányos kiürülése a vizsgálati állatokból; ilyen esetekben az előzetes vizsgálatok eredményei szolgálhatnak hasznos információkkal.

1. függelék

Fogalommeghatározások és mértékegységek

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy szintetikus üledék: anyagoknak a természetes üledék fizikai összetevőinek imitálására használt keveréke.

Biológiai felhalmozódás: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten a vizsgált anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva. A biológiai felhalmozódás biokoncentrációs és biomagnifikációs folyamatok eredménye (lásd lentebb).

Biológiai felhalmozódási tényező (BAF): a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálati szervezetben vagy a vizsgálati szervezeten (C_a , a férgek nedves vagy száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) a biológiai felhalmozódási vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában, elosztva az anyag környező közegben mért koncentrációjával (C_s , az üledék nedves vagy száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve). Annak érdekében, hogy a BAF a C_a és a C_s mértékegységére hivatkozzon, a BAF-et kg üledék/kg féreg mértékegységben adják meg (15).

Az üledékfelvételi sebességi állandónak az ürülési sebességi állandókkal (k_s és k_e – lásd alább) történő elosztásával kapott arányból közvetlenül számított **biológiai felhalmozódási tényezőket** kinetikai biológiai felhalmozódás tényezőnek (BAFK) nevezik.

Biokoncentráció: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag a testfelületen keresztül történő felvétel eredményeként – a vizsgált anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

Biomagnifikáció: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag szennyezett táplálékból vagy zsákmányállatból való felvétel eredményeként – a vizsgált anyagnak a szennyezett táplálékban vagy zsákmányállatban lévő koncentrációjához viszonyítva. A biomagnifikáció a vizsgált anyag táplálékhálón belüli átadásához vagy felhalmozódásához vezethet.

Bióta-üledék felhalmozódási tényező (BSAF): a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért, lipidtartalomra vonatkoztatott egyensúlyi koncentrációjának és a vizsgált anyag üledékben mért, szerves széntartalomra vonatkoztatott koncentrációjának hányadosa az állandósult állapotban. A C_a értékét az organizmus lipidtartalmának kilogrammjára jutó grammban, a C_s értékét pedig az üledék szerves széntartalmának kilogrammjára jutó grammban fejezzük ki.

A **kondicionálási időszakot** az üledék mikrobiális komponensének stabilizálására és pl. az üledékösszetevőkből származó ammónia eltávolítására használjuk; az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése előtt zajlik. A fedővizet a kondicionálás után általában elöntjük.

Ürülés: a vizsgált anyag kiürülése a vizsgálathoz használt organizmus szövetéből aktív vagy passzív folyamatok eredményeként, amelyek a vizsgált anyag környező közegben való jelenlététől vagy hiányától függetlenül mennek végbe.

Ürülési fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusokból való kiürülését (vagy a vizsgálathoz használt organizmusokban való nettó csökkenését) vizsgáljuk a vizsgálathoz használt organizmusok szennyezett közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően.

Ürülési sebességi állandó (k_e): a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgálathoz használt organizmusok vizsgált anyagot tartalmazó közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követő csökkenésének ütemét meghatározó számérték; a k_e az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki.

Kiegyensúlyozódási időszak: lehetővé teszi a vizsgált anyagnak a szilárd fázis, a pórusvíz és a fedővíz közötti eloszlását; az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése után és a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt kerül rá sor.

Oktanól-víz megoszlási hányados (K_{ow}): az anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának a hányadosa az egyensúlyi állapotban, esetenként P_{ow} -val is jelölik. Az anyag vízi szervezetekben való biológiai felhalmozódási képességének kifejezésére a K_{ow} logaritmusát ($\log K_{ow}$) használjuk.

Szerves szén – víz megoszlási hányados (K_{oc}): az anyag üledék szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának a hányadosa az egyensúlyi állapotban.

Fedővíz: az üledék fölött elhelyezkedő víz a vizsgálati edényben.

Állandósult állapot vagy **plató**: az expozíciós fázisban párhuzamosan végbemenő felvételi és ürülési folyamatok közötti egyensúly. Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a mintavételi időpontokban mért BAF alakulását az idő függvényében ábrázoló görbe párhuzamossá válik az időtengellyel, és a legalább kétnapos időközönként vett három egymást követő mintán végzett BAF analízis eredménye 20 %-nál kisebb eltérést mutat, és a három mintavételi időszak nem mutat statisztikailag szignifikáns eltéréseket. Ha a vizsgált anyag felvétele lassú, helyénvalóbb lehet a hétnapos időközök alkalmazása (5).

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék vagy a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Üledékből való felvétel sebességi állandója (k_s): a vizsgált anyag vizsgálatához használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgált anyag üledékfázisból való felvétele eredményeként bekövetkező növekedésének ütemét meghatározó számérték. A k_s azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve az üledék hány grammja jut a férgek kilogrammjára.

Szennyezett üledék: a vizsgált anyaggal szennyezett üledék.

Állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}): az állandósult állapothoz tartozó BAF, amely nem változik jelentősen egy hosszabb időtartamon keresztül, amely alatt a vizsgált anyag koncentrációja a környező közegben (C_s , az üledék száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) állandó.

Felvételi vagy expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgálatához használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált anyag hatásának.

2. függelék

A felvételi és az ürülési paraméterek kiszámítása

A biológiai felhalmozódási vizsgálatok fő végpontja a biológiai felhalmozódási tényező (BAF). A mért BAF-t úgy lehet kiszámítani, hogy az állandósult állapotban elosztjuk a vizsgált anyag vizsgálati organizmusokban mért koncentrációját (C_a) a vizsgált anyag üledékben mért koncentrációjával (C_s). Amennyiben az állandósult állapotot a felvételi fázis alatt nem sikerült elérni, a BAF értékét ugyanígy számítjuk ki a 28. napra. Jelezni kell azonban, hogy a BAF az állandósult állapothoz tartozó koncentrációkon alapul-e vagy sem.

A kinetikus biológiai felhalmozódási tényezők (BAF_k), az üledék felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e) kiszámításának előnyben részesített eszköze a számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslés. Tekintve véve a felvételi fázis átlagos felhalmozási tényezőinek (C_a , a mintavételi időpontok átlagai / C_s , a mintavételi időpontok átlagai = AF) idősorát a férgek és az üledék nedves tömege alapján, valamint a következő modellegyenletet:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [1. \text{ egyenlet}]$$

ahol $AF(t)$ a vizsgált anyag férgekben mért koncentrációjának és üledékben mért koncentrációjának aránya a felvételi fázis bármely adott időpontjában (t), ezek a számítógépes programok kiszámítják a BAF_k , k_s és k_e értékeket.

Ha sikerül elérni az állandósult állapotot a felvételi fázisban (azaz $t = \infty$), az 1. egyenletet lehet tovább lehet egyszerűsíteni:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e} \quad [2. \text{ egyenlet}]$$

ahol

k_s = felvételi sebességi állandó a szövetben [g üledék / kg féreg / nap]

k_e = ürülési sebességi állandó [nap⁻¹]

Ezt követően a vizsgált anyag állandósult állapothoz tartozó koncentrációja a feregszövetben ($C_{a,ss}$) a $k_s/k_e \times C_s$ képlettel számítható ki.

A bióta-üledék felhalmozódási tényezőt (BSAF) a következőképpen kell kiszámítani:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

ahol f_{oc} az üledék szerves szén frakciója, f_{lip} pedig a féreg lipidfrakciója, mindkettő a száraz tömeg vagy a nedves tömeg alapján.

A koncentrációértékek adott idősora esetén az ürülési kinetikát a következő modellegyenletekkel és nemlineáris paraméterbecslési módszerrel alapuló számítógépes kalkulációval lehet modellezni.

A felvételi fázis végén mért átlagos testi maradványértéket ajánlott alapértelmezett kiindulási pontként használni. A felvételi fázisból modellezett/becsült érték csak akkor használható, ha pl. a mért érték jelentősen eltér a modellezett testi maradványértéktől. Lásd még az 50. pontot az ürülésre kijelölt férgek alternatív előexponálásával kapcsolatban; e megközelítés esetén az előexponált férgekben az ürülési fázis 0. napján vett mintákat úgy tekintik, hogy reális testi maradványértéket biztosítanak az ürülési kinetika elindításához.

Ha az idő függvényében ábrázolt adatpontok a vizsgált anyag állatokban mért koncentrációjának folyamatos exponenciális csökkenését jelzik, akkor az ürülés időbeli lefolyása egykompartmentes modellel (4. egyenlet) jellemezhető.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [3. \text{ egyenlet}]$$

Az ürülési folyamatok esetenként kétfázisúak, azaz a korai fázisban a C_a gyors csökkenése figyelhető meg, amelyet az ürülés későbbi fázisaiban a vizsgált anyagok koncentrációjának lassúbb csökkenése vált fel, például (8) (19) (25). A két fázis azzal a feltevéssel értelmezhető, hogy a szervezet két különböző kompartmentből áll, amelyekből eltérő sebességgel ürül ki a vizsgált anyag. Ebben az esetben tanulmányozni kell a vonatkozó szakirodalmat, például (15) (16) (17) (25).

A kétkompartmentes ürülést például a következő egyenlet írja le (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [4. \text{ egyenlet}]$$

A és B a kompartmentek méretét jelenti (a teljes szöveti maradvány százalékában), ahol A az anyag gyors elvesztését mutató kompartment, és B a vizsgált anyag lassú elvesztését mutató kompartment. A és B összege az állat teljes kompartmenttérfogatának 100 %-ával egyenlő az állandósult állapotban. A k_a és k_b a megfelelő ürülési állandókat képviseli [nap^{-1}]. Ha a kétkompartmentes modellt a tisztulási adatokhoz illesztjük, a felvételi sebességi állandó (k_s) a következőképpen határozható meg (53) (54):

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

Mindazonáltal ezeket a modellegyenleteket körültekintően kell alkalmazni, különösen, ha a vizsgálat során változás következik be a vizsgált anyag biológiai hozzáférhetőségében (42).

Alternatív megoldásként a fenti modellegyenletekkel egyszerre is kiszámíthatók a kinetikai paraméterek (k_s és k_e), ha az elsőrendű kinetikai modellt a felvételi és az ürülési fázisból származó valamennyi adatra egyidejűleg alkalmazzuk. A felvételi és az ürülési sebességi állandók együttes kiszámítását lehetővé tévő módszer leírása az (55), (56) és (57) szakirodalmi hivatkozásban megtalálható.

A nem kiválasztott maradványokat (NER) másodlagos végpontként kell kiszámítani úgy, hogy a férgekben az ürülési fázis 10. napján mért átlagos koncentráció (C_a) és a férgekben az állandósult állapotban (a felvételi fázis 28. napján) mért átlagos koncentráció (C_a) arányát megszorozzuk 100-zal:

$$\text{NER}_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ az ürülés végén(átlag)} \times 100}{C_a \text{ az állandósult állapotban(átlag)}}$$

3. függelék

Példa a 28 napos biológiai felhalmozódási vizsgálat mintavételi ütemtervére**a) felvételi fázis (beleértve a 4 napos kiegyensúlyozódási fázist)**

Nap	Tevékenységek
- 6	A tőzgezsuszpenzió elkészítése üledéknek; a szuszpenzió kondicionálása 48 órán át;
- 4	Az üledék vagy az üledékfrakció szennyezése; az üledékösszetevők összekeverése; üledékminták vétele a kezelt és az oldószeres kontroll üledékekből a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására; a fedővíz hozzáadása; inkubáció vizsgálati körülmények mellett (kiegyensúlyozódási fázis);
- 3/- 2	A vizsgálati organizmusok elválasztása a tenyésztőtől akklimatizáció céljából;
0	A vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); ismétlések eltávolítása víz- és üledékminták vételére a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározása céljából; a férgek randomizált elosztása a vizsgálati kamrákba; elegendő féreg-részminták visszatartása az analitikai háttérértékek meghatározásához; a levegőellátás ellenőrzése, ha zárt vizsgálati rendszert használunk;
1	Ismétlések eltávolítása mintavételre; a levegőellátás, a férgek viselkedése, a vízminőség ellenőrzése (lásd az 56. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására;
2	A levegőellátás, a férgek viselkedése és a hőmérséklet ellenőrzése;
3	Ugyanaz, mint az 1. napon;
4-6	Ugyanaz, mint az 2. napon;
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
8-13	Ugyanaz, mint az 2. napon;
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
15-20	Ugyanaz, mint az 2. napon;
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
22-27	Ugyanaz, mint az 2. napon;
28	Ugyanaz, mint az 1. napon; a vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); a felvételi fázis vége; elegendő féreg-részminta megőrzése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a fennmaradó expozíciós ismétlésekből a férgek áthelyezése tiszta üledéket tartalmazó edényekbe az ürülési fázishoz (nincs bélürítés); víz-, üledék- és féregminták vétele az oldószeres kontrollokból; mintavétel a csapdákból lévő oldatokból, ha vannak.
	Az expozíció előtti tennivalókat (kiegyensúlyozódási fázis) a vizsgált anyag tulajdonságainak figyelembevételével kell ütemezni. Szükség esetén az előkészített üledék kondicionálása fedővíz alatt 20 ± 2 °C-on 7 napig; ebben az esetben az üledéket korábban kell elkészíteni!
	A 2. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

b) Ürülési fázis

Nap	Tevékenység
-6.	A tözegszuszpenzió elkészítése üledéknek; a szuszpenzió kondicionálása 48 órán át;
-4.	Az üledékösszetevők összekeverése; üledékminták eltávolítása a kezelt és az oldószeres kontroll üledékekből a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására; a fedővíz hozzáadása; inkubáció vizsgálati körülmények mellett;
0. (a felvételi fázis 28. napja)	A vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós ismétlésekből tiszta üledéket tartalmazó edényekbe; 4-6 óra után az ismétlések eltávolítása víz-, üledék- és féregminták vételére a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározása céljából; a férgek randomizált elosztása a vizsgálati kamrákba;
1.	Ismétlések eltávolítása mintavételre; a levegőellátás, a férgek viselkedése, a vízminőség ellenőrzése (lásd az 52. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására;
2.	A levegőellátás, a férgek viselkedése és a hőmérséklet ellenőrzése;
3.	Ugyanaz, mint az 1. napon;
4.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
5.	Ugyanaz, mint az 1. napon;
6.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
7.	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
8-9.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
10.	Ugyanaz, mint az 1. napon; az ürülési fázis vége; a vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele az oldószeres kontrollokból; mintavétel a csapdákból lévő oldatokból, ha vannak.
	Az ürülési fázis kezdete előtt ugyanúgy kell elkészíteni az üledéket, mint a felvételi fázis előtt.
	A 2. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

4. függelék

Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány fizikai-kémiai tulajdonsága

ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Finomszemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2µg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	<50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

AZ AJÁNLOTT MESTERSÉGES VÍZ ÖSSZETÉTELE

a) Kalcium-klorid oldat

Oldjunk fel 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

b) Magnézium-szulfát oldat

Oldjunk fel 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

c) Nátrium-karbonát oldat

Oldjunk fel 2,59 g NaHCO_3 -t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

d) Kálium-klorid oldat

Oldjunk fel 0,23 g KCl -t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A desztillált vagy ioncserélt víz vezetőképessége nem haladhatja meg a $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ értéket.

Keverjük össze 25 ml-t az a)–d) oldatok mindegyikéből, és a teljes térfogatot töltsük fel 1 literre ioncserélt vízzel. Ebben az oldatban a kalcium- és magnéziumionok összege 2,5 mmol/l.

A Ca:Mg ionok aránya 4:1, a Na:K ionoké pedig 10:1. Az oldat savas kapacitása ($K_{s4,3}$) 0,8 mmol/l.

A hígítóvizet az oxigéntelítettség eléréséig levegőztessük, majd felhasználás előtt körülbelül két napig további levegőztetés nélkül tároljuk.

A fedővíz pH-értékének a 6–9 tartományban kell lennie.

5. függelék

Mesterséges üledék – elkészítés és tárolás

A C.8. vizsgálati módszer követelményeivel ellentétben (40) a száraz tömeg 10 %-a helyett 2 % tőzegtartalom ajánlott a mesterséges üledékben, hogy az üledék megfeleljen a természetes üledékek alacsony-közepes szervesanyag-tartalmának (58).

A mesterséges üledék száraz összetevőinek százalékos aránya:

Összetevő	Jellemzők	% száraz üledék
Tőzeg	Tőzegmoha tőzeg, a lebomlás foka: »közepes«, levegőszáraz, látható növényi maradványok nincsenek, finomra őrölt (szemcseméret $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Kvarchomok	Szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék > 50 %-ának 50 – 200 μm között kell lennie	76
Kaolinit agyag	Kaolinitartalom ≥ 30 %	22 ± 1
Táplálékforrás	<i>Folia urticae</i> , az <i>Urtica</i> -fajok (nagy csalán) porított levelei, finomra őrölve (részecskeméret $\leq 0,5$ mm), vagy az <i>Urtica</i> -fajok porított leveleinek keveréke alfa-cellulózzal (1:1); a gyógyszerári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra; a száraz üledékhez hozzáadva	0,4–0,5 %
Kalcium-karbonát	CaCO_3 , porított, kémiailag tiszta, a száraz üledékhez hozzáadva	0,05–1
Ioncserélt víz	Vezetőképesség ≤ 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a száraz üledékhez hozzáadva	30–50

Ha megemelkedett ammóniakoncentrációk várhatók – például ha a vizsgált anyagról ismert, hogy gátolja a nitrifikációt –, hasznos lehet a nitrogénben gazdag *Urtica*-por 50 %-át cellulózzal helyettesíteni (pl. α -cellulóz por, kémiailag tiszta, részecskeméret $\leq 0,5$ mm).

Elkészítés

A tőzeget levegőn megszáritjuk és finom porrá őröljük (szemcseméret $\leq 0,5$ mm, látható növényi maradványok nélkül). A szükséges mennyiségű tőzegporból a száraz üledékhez adandó ioncserélt víz egy részével (a tőzeg száraz tömege 11,5-szeresének megfelelő vízmennyiséget elegendőnek találták a keverhető tőzegiszap elkészítéséhez (8)) szuszpenziót állítunk elő nagy teljesítményű homogenizáló készülék segítségével.

A szuszpenzió pH-ját CaCO_3 hozzáadásával $5,5 \pm 0,5$ értékre állítjuk be. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása céljából a szuszpenziót 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk. A végeredményként kapott keverék pH-ját ismételtlen megmérjük, és szükség esetén CaCO_3 hozzáadásával $6,0 \pm 0,5$ értékre állítjuk be. Ezután az egész szuszpenziót összekeverjük a többi száraz összetevővel, figyelembe véve a szennyezéshez használt részt. Hozzáadjuk a maradék ioncserélt vizet, hogy homogén üledéket kapjunk. A pH-t ismételtlen megmérjük, és szükség esetén CaCO_3 hozzáadásával $6,5$ – $7,5$ értékre állítjuk be. Ha azonban ammónia képződése várható, akkor hasznos lehet az üledék pH-ját $7,0$ alatt tartani (pl. $6,0$ – $6,5$ között). Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ha ammónia képződése várható, a mesterséges üledéket hét napig kondicionálni lehet olyan körülmények mellett, mint amelyek az ezt követő vizsgálat során, a vizsgált anyaggal történő szennyezés előtt érvényesülnek (pl. üledék-víz arány 1: 4, az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal), azaz fel kell önteni vízzel, amelyet levegőztetni kell. A kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Az üledékből mintákat veszünk a száraz tömeg és az összes szerves széntartalom meghatározására (pl. 3 mintát).

Ezt követően minden kezelési szint esetében összekeverjük a szennyezett kvarchomokot az üledékkel, majd az üledéket szétosztjuk a párhuzamos kezelt edények között, és feltöltjük a vizsgálati vízzel (pl. üledék-víz arány 1: 4, az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal). Az edényeket ezután a rákövetkező vizsgálat során érvényesülő feltételekkel megegyező feltételek mellett inkubáljuk. Ez az a pont, ahol a kiegyenlítődesi időszak elkezdődik. A fedővizet levegőztetni kell.

A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. Össze lehet keverni a tőzegszuszpenzióval is (lásd fent). A táplálékforrás túlzott lebomlása a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt – pl. hosszú kiegyensúlyozódási időszak esetén – úgy kerülhető el, ha a táplálék hozzáadása és az expozíció kezdete közötti időtartam a lehető legrövidebb. Annak érdekében, hogy a táplálék elegendő ideig kontaktusban legyen a vizsgált anyaggal, a táplálékforrást legkésőbb azon a napon kell összekeverni az üledékkel, amikor az üledéket beszenyvezik a vizsgált anyaggal. Kivételt lehet tenni, ha a kiegyensúlyozódási időszak hossza a táplálék túlzott mikrobiológiai lebomlásához vezet a vizsgált organizmusok hozzáadása előtt. Az üledékből mintákat veszünk a száraz tömeg és az összes szerves széntartalom meghatározására (pl. 3 mintát a szennyezett vagy kontroll üledékből).

A komponensek száraz tömegét (tőzeg, homok, kaolin) g-ban és a teljes száraz tömeg százalékában kell jegyzőkönyvezni.

A száraz komponensekhez az üledék elkészítése során hozzáadandó víztérfogatot is az összes száraz tömeg százalékában kell jegyzőkönyvezni (pl. a 100 % száraz tömeg + 46 % víz azt jelenti, hogy 1 000 g száraz tömeg összesen 460 ml vizet kap, ami 1 460 g nedves üledéket eredményez).

Tárolás

A mesterséges üledék száraz összetevőit száraz, hűvös helyen vagy szobahőmérsékleten lehet tárolni. Az elkészített nedves üledék 4 ± 2 °C-on, sötétben, az elkészítés napjától számított 2–4 héten át tárolható (csak a tenyészetben történő további használatra) (8).

A vizsgált anyaggal szennyezett üledéket azonnal fel kell használni, kivéve, ha olyan információk állnak rendelkezésre, amelyek szerint az adott üledék tárolása nem befolyásolja a vizsgált anyag toxicitását és biológiai hozzáférhetőségét. A szennyezett üledékmintákat az adott vizsgált anyag esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

6. függelék

A biológiai felhalmozódás vizsgálatához ajánlott kevéssertéjú-fajok***Tubifex tubifex* (Müller), Tubificidae, Oligochaeta**

A tubificid kevéssertéjúek (Tubificidae, Oligochaeta) közé tartozó *Tubifex tubifex* (Müller) édesvízi üledékekben, nyálkával kibélelt csövekben él. A férgek fejfelé laknak ezekben a csövekben, és üledékrészecskéket fogyasztanak, hasznosítva az azokhoz kötődő mikroorganizmusokat és szerves törmeléket. A férgek hátsó vége általában a fedővízben hullámszik légzés céljából. Bár a *Tubifex tubifex* az egész északi féltekén, számos üledéktípusban megél, a viszonylag finom szemcseméretű üledékeket kedveli (59). A faj ökotoxikológiai vizsgálatok céljára való megfelelőségét mutatja be például a (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63) szakirodalom.

A tenyésztés módszerei

A férgeket állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani, hogy elegendő számú *Tubifex tubifex* álljon rendelkezésre a biológiai felhalmozódási vizsgálatok lefolytatására. A *T. tubifex* tenyésztésre a C.8. vizsgálati módszer szerinti mesterséges talajon alapuló mesterséges üledékből (40) és a C.1. vizsgálati módszer szerinti mesterséges vízből álló rendszer ajánlott (8).

Tenyésztőedényként 12–20 cm magasságú üveg- vagy rozsdamentes acéltartályokat lehet használni. Minden tenyésztőtartályba egy réteg – az 5. függelékben leírt módon előállított – nedves mesterséges üledéket kell tölteni. Az üledékréteg mélységének lehetővé kell tennie a férgek természetes üledékbe ásó viselkedését (*T. tubifex* esetén a minimális mélység 2 cm). A rendszerhez mesterséges vizet adunk. Ügyelni kell arra, hogy csak minimális mértékben kavargassuk fel az üledéket. A víztestet egy 2 cm-rel az üledékfelszín fölött elhelyezett Pasteur-pipettán keresztül óvatosan levegőztetjük (pl. 2 buborék másodpercenként, 0,45 µm pórusméretű szűrőn átszűrt levegőből). Az ajánlott tenyésztési hőmérséklet 20 ± 2 °C.

A férgeket 20 000 példány/m² üledékfelület maximális betelepítési sűrűséggel adjuk hozzá a tenyészethez. A nagyobb betelepítési sűrűség a növekedés és a szaporodás sebességének csökkenését okozhatja (43).

A mesterséges üledéket tartalmazó tenyészetekben a férgeket táplálni kell. A finomra őrölt haleledelből (pl. TetraMin®) álló étrend kiegészítő táplálékként szolgálhat (8); Klerks, 1994., személyes közlés. A táplálási aránynak lehetővé kell tennie a férgek kielégítő növekedését és szaporodását, illetve minimális szinten kell tartania az ammónia felhalmozódását és gombák növekedését a tenyészetben. A táplálék hetente kétszer adható (pl. 0,6–0,8 mg/cm² üledékfelszín). A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy az ioncserélt vízben szuszpendált és homogenizált táplálék alkalmazása megkönnyítheti a táplálék homogén eloszlását a tenyésztőtartályokban lévő üledék felszínén.

Az ammónia felhalmozódásának elkerülése érdekében a fedővizet cserélni kell, vagy átfolyásos rendszer használatával, vagy – legalább hetente egyszer – manuálisan. A törzstenyészetekben az üledéket háromhavonta kell cserélni.

A tenyészetből történő féregminta vétele céljából a tenyésztőüledéket 1 mm-es szitán kell átszítani, ha csak felnőtt egyedekre van szükség. A bábok visszatartására 0,5 mm-es szita, a fiatal férgek visszatartására pedig 0,25 mm-es szita alkalmas. A szitákat az üledék áthaladása után mesterséges vízbe lehet helyezni. A férgek elhagyják a hálót, és a vízből lágyacél csipesszel vagy tűzzel polírozott élű pipettával lehet összeszedgetni őket.

Kizárólag a *Tubifex tubifex* ép és egyértelműen azonosított példányait (pl. (64)) lehet egy vizsgálat vagy új tenyészet elindításához használni. A beteg vagy sérült férgeket, valamint a gombafonalakkal fertőzött bábokat meg kell semmisíteni.

A szinkron tenyészet megfelelő időközönként meghatározott korú férgeket biztosíthat. Választott időközönként (pl. kéthetente) új tenyésztőedényeket állítunk be, amelyeket meghatározott korú állatokkal indítunk el (pl. bábokkal). Az itt leírt tenyésztési körülmények mellett a férgek 8–10 hét után elérik a felnőtt kort. A tenyészetből az állatokat akkor lehet begyűjteni, amikor a férgek már új bábokat raktak, pl. tíz hét után. A mintázott felnőttek vizsgálatokhoz használhatók, míg a bábokkal új tenyészetek indíthatók.

***Lumbriculus variegatus* (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta**

A *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) szintén az édesvízi üledékek lakója világszerte, és széles körben használják ökotoxikológiai vizsgálatokhoz. A faj biológiájára, tenyésztési körülményeire és érzékenységre vonatkozó információk az (1) (6) (9) (36) szakirodalmi hivatkozásban találhatók. Bizonyos korlátozásokkal a *Lumbriculus variegatus* is tenyészthető a *T. tubifex* esetében ajánlott, a (8) szakirodalmi hivatkozás szerinti mesterséges üledékben. Mivel a természetben a *L. variegatus* a *T. tubifex*-hez képest a durvább üledékeket kedveli (59), a *T. tubifex* esetében használt mesterséges üledékkel készített laboratóriumi tenyészetek 4–6 hónap után megszűnhetnek. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a *L. variegatus* fajt a szubsztrátum megújítása nélkül több éven át lehet tartani homokos szubsztrátumban (pl. kvarchomok, apró szemcséjű kavics), átfolyós rendszerben, táplálékforrásként haleledelt használva. A *L. variegatus* legnagyobb előnye az egyéb kevésertéjű-fajokkal szemben a gyors szaporodás, amely gyorsan növekvő biomasszát eredményez a laboratóriumban tenyésztett populációkban (1) (6) (9) (10).

Tenyésztési módszerek

A *Lumbriculus variegatus* tenyésztési feltételeit Phipps és mtsai (1993) (10), Brunson és mtsai (1998) (28), ASTM (2000) (1), US EPA (2000) (6) ismerteti részletesen. Az alábbiakban röviden ismertetjük ezeket a feltételeket.

A férgeket nagy akváriumokban (57–80 l) lehet tenyészteni, 23 °C-on, 16 óra világos és 8 óra sötét megvilágítási időszakkal (100–1 000 lux), naponta megújított természetes víz felhasználásával (45–50 l/akvárium). A szubsztrátumot úgy állítjuk elő, hogy fehérítetlen barna papírtörölköt csíkokra vágunk, majd ezeket néhány másodpercig összeturmixoljuk tenyésztővízzel, ami kis papírszubsztrátum-darabokat eredményez. Ez a szubsztrátum közvetlenül használható a *Lumbriculus* tenyésztőakváriumokban a tartály alsó területének lefedésére, vagy a későbbi felhasználásig ioncserélt vízben lefagyaszta tárolható. Az új szubsztrátum a tartályban általában körülbelül két hónapig tart.

A féregtenyészeteket 500–1 000 féreggel indítjuk el és a férgeket megújítási vagy átfolyós feltételek mellett heti 3 alkalommal megetetjük 6 g pisztráng starter tápot tartalmazó 10 ml szuszpenzióval. A statikus vagy félstatikus tenyészetekben a baktériumok és gombák szaporodásának megelőzése érdekében alacsonyabb táplálási arányt kell alkalmazni. A táplálékot és a papírszubsztrátumot analizálni kell a biológiai felhalmozódási vizsgálatokban használt anyagokra.

Ilyen körülmények között az egyedek száma a tenyészetben körülbelül 10–14 naponta megduplázódik.

A *Lumbriculus variegatus* faj egyedeit pl. a szubsztrátum finom háló segítségével történő áthelyezésével, vagy az organizmusok tűzzel polírozott széles szájú (kb. 5 mm átmérőjű) üvegpipettával külön főzőpohárba történő áthelyezésével lehet eltávolítani a tenyészetből. Ha a szubsztrátumot is átrakjuk a főzőpohárba, a férgeket és szubsztrátumot egyaránt tartalmazó főzőpoharat egy éjszakán át átfolyós körülmények között hagyjuk, ami eltávolítja a szubsztrátumot a főzőpohárból, miközben a férgek az edény alján maradnak. Ezeket a férgeket azután újonnan előállított tenyésztőtartályokban lehet elhelyezni, vagy az (1) és (6) szakirodalomban vázoltak szerint feldolgozni a vizsgálat céljára. A férgek sérülését vagy autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzzel polírozott élő pipettát vagy rozsdamentes acél palcikát használva.

A *L. variegatus* üledék biológiai felhalmozódási vizsgálatokban való használata során kritikusan kezelendő kérdés a faj szaporodásának módja (architomia, amelyet morphallaxis követ). Ez az ivartalan szaporodás két fragmentumot eredményez, amelyek egy ideig nem táplálkoznak, amíg a fej- vagy farokrész nem regenerálódik (pl. (36) (37)). Ez azt jelenti, hogy a *L. variegatus* fajban az üledék és a szennyeződés elfogyasztás útján történő felvétele nem folyamatosan zajlik, mint a *tubifex*ekben, amelyek nem fragmentálódás útján szaporodnak.

Ezért az ellenőrizetlen reprodukció és regeneráció, illetve az azt követő nagyon változó vizsgálati eredmények minimalizálása érdekében szinkronizálást kell végezni. Ilyen eltérések akkor fordulhatnak elő, ha egyes példányok – amelyek fragmentálódtak és ezért egy bizonyos időszakban nem táplálkoznak – kevésbé vannak kitéve a vizsgált anyagnak, mint azok a példányok, amelyek a vizsgálat alatt nem fragmentálódtak (9) (10) (38). Az expozíció megkezdése előtt 10–14 nappal a férgeket mesterségesen fragmentálni kell (szinkronizálás). Nagy férgeket kell használni, amelyek lehetőleg nem mutatják közelmúltban történt fragmentálódás jeleit. A férgeket egy csepp tenyésztővízben egy tárgylemezre helyezzzük, és a középső testrégióban szikével kettévágjuk. Ügyelni kell arra, hogy a hátsó

végek hasonló méretűek legyenek. Ezután a hátsó végeket az expozíció kezdetéig hagyni kell új fejeket növesztetni egy olyan tenyésztőedényben, amely ugyanolyan szubsztrátumot tartalmaz, mint amelyet a tenyésztés során használtunk, valamint mesterséges vizet. Az új fejek regenerációját az jelzi, ha a szinkron férgek beássák magukat a szubsztrátumba (a regenerált fejek jelenléte úgy is megerősíthető, binokuláris mikroszkóp alatt ellenőrizzük a férgek egy reprezentatív részmintáját). A vizsgált organizmusok ezután várhatóan hasonló fiziológiai állapotban lesznek. Ez azt jelenti, hogy ha morphallaxis útján történő regeneráció következik be a szinkronizált férgekben a vizsgálat alatt, gyakorlatilag az összes állat várhatóan ugyanolyan mértékben lesz kitéve a szennyezett üledéknek. A szinkron férgeseket akkor kell megetetni, amikor a férgek elkezdik beásni magukat a szubsztrátumba, vagy 7 nappal a kettémetszés után. Az etetési rendnek összehasonlíthatónak kell lennie a normál tenyészetekével, de tanácsos lehet a szinkron férgeseket azzal a táplálékforrással etetni, amelyet a vizsgálathoz is használni kell. A férgeseket vizsgálati hőmérsékleten, azaz 20 ± 2 °C-on kell tartani. A regeneráció után azokat a hasonló méretű, ép, teljes férgeseket kell használni a vizsgálathoz, amelyek óvatos mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutatnak. A férgek sérülését vagy autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzzel polírozott élű pipettát vagy rozsdamentes acél palcikát használva.

Ha a *Lumbriculus variegatus* fajt használjuk a vizsgálatban, megfelelő körülmények esetén a férgek számának – a faj speciális szaporodási módja miatt – növekednie kell a vizsgálat során (6). A *L. variegatus* fajjal végzett biológiai felhalmozódási vizsgálatokban a reprodukció elmaradását fel kell jegyezni, és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (körvizsgálatban nem validált)**

A *Branchiura sowerbyi* különböző típusú üledékkel rendelkező tározókban, tavakban és folyókban él, eredetileg a trópusi területeken. Az északi félteke meleg víztestjeiben is megtalálható. Sokkal nagyobb abundanciával fordul azonban elő nagy szervesanyag-tartalmú sáros-agyagos üledékekben. A férgek az üledékrétegben élnek. Általában még a férgek hátsó vége is be van ásva az üledékbe. A faj könnyen beazonosítható a hátsó részén található kopolyúszálak alapján. A felnőtt egyedek hossza elérheti a 9–11 cm-t, a nedves tömegük pedig a 40–50 mg-ot. A férgek magas szaporodási arányt mutatnak, a populáció az alábbiakban leírt hőmérsékleti és táplálási feltételek (Aston és mtsai, 1982., (65)) mellett kevesebb, mint 2 hét alatt megduplázódik. A *B. sowerbyi* fajt mind toxicitási, mind biológiai felhalmozódási vizsgálatokban használják (Marchese & Brinkhurst, 1996. (31), illetve Roghair és mtsai, 1996. (67)).

Tenyésztési módszerek

A *Branchiura sowerbyi* tenyésztési feltételeinek összefoglalója az alábbiakban található (Mercedes R. Marchese, INALI, Argentína és Carla J. Roghair, RIVM, Hollandia).

A vizsgálati organizmusok tenyésztéséhez különleges technikára nincs szükség. Az organizmusok nem szennyezett természetes üledék alkalmazásával tenyészthetők (31). A gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy a természetes üledékből és homokból álló közeg – a tiszta természetes üledékkel összehasonlítva – javítja a férgek állapotát (32) (67). A tenyésztéshez 3 literes főzőpohár használható, amely 1 500 ml üledék/víz kezeget tartalmaz; a közeg 375 ml természetes szennyeztelen üledékből (körülbelül 10 % összes szerves szén; a részecskék körülbelül 17 %-a ≤ 63 μm), 375 ml tiszta homokból (M32), és 750 ml mesterséges vízből vagy klórtalanított csapvízből áll (31) (32) (67). Papírtörölköt is lehet használni tenyésztő szubsztrátumként, de abban a populáció növekedése alacsonyabb lesz, mint a természetes üledékben. Félstatikus rendszerekben az edényben lévő vízréteget lassan levegőztetni kell, a fedővizet pedig hetente meg kell újítani.

A kezdéskor minden főzőpohár 25 fiatal férget tartalmaz. Két hónap után csipesszel kiszedjük a nagy férgeseket az üledékből és egy új főzőpohárba helyezük át, amely frissen készült üledék/víz kezeget tartalmaz. A régi főzőpohár bábokat és fiatal férgeseket is tartalmaz. Ilyen módon főzőpoharanként akár 400 fiatal férget is lehet nyerni. A felnőtt férgeseket legalább egy évig lehet szaporításra használni.

A tenyészeteiket $21\text{--}25$ °C hőmérsékleten kell tartani. A hőmérséklet ± 2 °C tartományon belül változhat. A pete lerakásától a báb fiatal férgek általi elhagyásáig tartó embrionális fejlődéshez 25 °C-on körülbelül három hét szükséges. A peterakás mértékét túlélő *B. sowerbyi* férgenként 6,36 (31) és 11,2 (30) között találták sárban és 25 °C-on. A peték bábonkénti száma 1,8–2,8 (66) (69), de akár 8 (68) is lehet.

Az oldott oxigént, a vízkeménységet, a hőmérsékletet és a pH-t hetente kell mérni. Hetente két vagy három alkalommal haleledel (pl. TetraMin®) adható szuszpenzióban, *ad libitum*. A férgeket *ad libitum* adott felolvasztott salátával is lehet etetni.

A faj legnagyobb előnye a magas egyedenkénti élőanyag-tömeg (akár 40–50 mg nedves tömeg példányonként). Ezért ez a faj radioaktív izotóppal nem jelölt vizsgált anyagok biológiai felhalmozódásának vizsgálatára is használható. Az expozíciót a *T. tubifex* vagy a *L. variegatus* esetében használt rendszerekben lehet elvégezni, ismétlésenként egyetlen példánnyal (11). Az ismétlések számát azonban meg kell emelni, kivéve, ha nagyobb vizsgálati kamrákat használunk (11). Az üledékbe ásó magatartással kapcsolatos érvényességi kritériumot is hozzá kell igazítani a fajhoz.

SZAKIRODALOM

- (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) Európai Bizottság (EB) (2003). Az új bejelentett anyagok jelentette kockázatok értékeléséről szóló 93/67/EGK bizottsági irányelv, a létező anyagok jelentette kockázatok becsléséről szóló 1488/94/EK bizottsági rendelet és a biocid termékek forgalomba hozataláról szóló 98/8/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv alkalmazását segítő, kockázateértékelésről szóló technikai útmutató; I–IV. rész Az Európai Közösségek Kiadóhivatala, 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) E melléklet C.13. fejezete: Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat.
- (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) E melléklet C.27. fejezete: Üledékvizek árvaszűnyog életciklus toxicitási vizsgálata szennyezett üledék használatával.
- (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 *Oligochaeta 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) E melléklet következő fejezetei:
 - A.4. fejezet: Gőznyomás
 - A.5. fejezet: Felületi feszültség
 - A.6. fejezet: Vízoldékonyság
 - A.8. fejezet: Megoszlási hányados, lombikrázásos módszer
 - A.24. fejezet: Megoszlási hányados, HPLC-módszer
 - C.7. fejezet: Lebomlás – Abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében
 - C.4. fejezet, A-F: A gyors biológiai lebonthatóság meghatározása
 - C.19. fejezet: Adszorpció együttható (K_{oc}) becslése talajon és szennyvíziszapon nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).
 - C.29. fejezet: Gyors biológiai lebonthatóság, CO₂ légmentesen zárt edényekben
- (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) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.
- (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) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.
- (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., Görge, 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 1977-0731 (elektronikus kiadás)
ISSN 1725-5090 (nyomtatott kiadás)



Az Európai Unió Kiadóhivatala
2985 Luxembourg
LUXEMBURG

HU