I

(Atti adottati skont it-Trattati tal-KE/Euratom li l-pubblikazzjoni tagħhom hija obbligatorja)

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 761/2009

tat-23 ta' Lulju 2009

li jemenda, bil-għan li jkun adatt għall-progress tekniku, ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

(Test b'relevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jistabbilixxi l-Komunità Ewropea,

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 793/93 u r-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 kif ukoll id-Direttiva tal-Kunsill 76/769/KEE u d-Direttivi tal-Kummissjoni 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE [1], u b'mod partikolari l-Artikolu 13(3) tiegħu,

Billi:

(1) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 [2] isemmi l-metodi ta' ttestjar li jintużaw biex jiġu ddeterminati l-proprjetajiet fiżikokimiċi, it-tossiċità u l-ekotossiċità ta' sustanzi li għandhom jiġu applikati għall-finijiet tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006.

(2) Ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 jeħtieġ li jiġi aġġornat biex jinkludi tibdil li sar f'ċerti metodi ta' ttestjar u biex jinkludi diversi metodi ġodda ta' ttestjar li ġew adottati mill-OECD. Il-partijiet interessati ġew ikkonsultati dwar din il-proposta. L-emendi msemmija jadattaw il-metodi in kwistjoni għall-progress xjentifiku u tekniku.

(3) Id-dispożizzjonijiet relatati mal-pressjoni tal-fwar għandhom jiġu riveduti biex jinkludu l-metodu ġdid ta' effużjoni.

(4) Jeħtieġ li jiżdied metodu ġdid ta' kif jitkejjel id-dijametru medju ġeometriku tal-fibri peżat skont it-tul tagħhom.

(5) Huwa xieraq li r-Regolament (KE) Nru 440/2008 jiġi aġġornat biex jinkludi, bi prijorità, metodu ġdid ta' ttestjar *in vitro* għall-irritazzjoni tal-ġilda, biex jitnaqqas l-għadd ta' annimali li jintużaw għal għanijiet sperimentali, f'konformità mad-Direttiva tal-Kunsill Nru 86/609/KEE tal-24 ta' Novembru 1986 dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, regolamenti u dispożizzjonijiet amministrattivi tal-Istati Membri dwar il-protezzjoni tal-annimali użati għal għanijiet sperimentali u għanijiet oħra xjentifiċi [3]. Minkejja li fl-ambitu tal-OECD għadha qed issir diskussjoni dwar abbozz ta' metodu ta' ttestjar *in vitro*, għal dan il-każ eċċezzjonali jixraq li f'dan ir-Regolament jiddaħħal il-metodu B46. Il-Metodu B 46 għandu jiġi aġġornat mill-aktar fis possibbli hekk kif jintlaħaq ftehim fi ħdan l-OECD jew f'każ li ssir disponibbli aktar informazzjoni li tiġġustifika tali reviżjoni.

(6) Id-dispożizzjonijiet relatati mat-test tal-inibizzjoni tat-tkabbir ta' algi jeħtieġ li jiġu riveduti biex jinkludu speċijiet addizzjonali u biex jissodisfaw ir-rekwiżiti għall-evalwazzjoni tal-perikli u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi.

(7) Jeħtieġ li jiżdied metodu ġdid ta' kif titkejjel il-mineralizzazzjoni aerobika f'ilmijiet superfiċjali, permezz ta' test ta' simulazzjoni tal-bijodegradazzjoni u metodu ġdid ta' evalwazzjoni tat-tossiċità għall-ġeneru *Lemna*, permezz ta' test tal-inibizzjoni tat-tkabbir.

[1] ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.
[2] ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1.
[3] ĠU L 358, 18.12.1986, p. 1.

(8) Ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 għandu għalhekk jiġi emendat skont dan.

(9) Il-miżuri stipulati f'dan ir-Regolament huma skont l-opinjoni tal-Kumitat stabbilit skont l-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

L-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008 jiġi emendat kif ġej:

(1) Il-Parti A tiġi emendata kif ġej:

(a) il-Kapitolu A.4 jinbidel bil-Kapitolu A.4 kif stabbilit fl-Anness I għal dan ir-Regolament;

(b) Jiżdied il-Kapitolu A.22 kif stabbilit fl-Anness II għal dan ir-Regolament.

(2) Il-Parti B tiġi emendata kif ġej:

Jiżdied il-Kapitolu B.46, kif stipulat fl-Anness III għal dan ir-Regolament..

(3) Il-Parti C tiġi emendata kif ġej:

(a) Il-Kapitolu C.3 jinbidel bil-Kapitolu C.3 kif stabbilit fl-Anness IV għal dan ir-Regolament.

(b) Jiżdiedu l-Kapitoli C.25 u C.26 kif stabbiliti fl-Annessi V u VI għal dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Dan ir-Regolament għandu jidħol fis-seħħ fit-tielet jum mill-pubblikazzjoni tiegħu f'*Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea*.

Dan ir-Regolament għandu jorbot fl-intier tiegħu u japplika direttament fl-Istati Membri kollha.

Magħmul fi Brussell, it-23 ta' Lulju 2009.

Għall-Kummissjoni
Stavros DIMAS
Membru tal-Kummissjoni

ANNESS I

A.4. **PRESSJONI TA' FWAR**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 104 (2004).

1.1. INTORDUZZJONI

Din il-verżjoni riveduta ta' metodu A 4 (1) tinkludi metodu addizzjonali, Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali, maħsuba għal sustanzi kimiċi bi pressjonijiet baxxi ħafna (sa 10^{-10} Pa). Fid-dawl ta' bżonnijiet għal proċeduri, speċjalment relati mal-kisba ta' pressjoni ta' fwar għal sustanzi bi pressjoni baxxa ta' fwar, proċeduri oħra ta' dan il-metodu huma vvalutati mill-ġdid b'konnessjoni ma' sensiliet oħra ta' applikabilità.

Fl-ekwilibriju termodinamiku l-pressjoni ta' fwar ta' sustanza pura hija l-funzjoni ta' temperatura biss. Il-prinċipji fundamentali huma deskritti x'imkien ieħor (2)(3).

L-ebda proċedura ta' kejl waħidha hija applikabbli għas-sensiela sħiħa ta' pressjonijiet ta' fwar minn inqas minn 10^{-10} għal 10^{5} Pa. Tmien metodi biex titkejjel il-pressjoni ta' fwar huma inklużi f'dan il-metodu li jista' jiġi applikat f'sensiliet differenti ta' pressjoni ta' fwar. Il-metodi varji huma paragunati rigward l-applikazzjoni u s-sensiela ta' kejl f' Tabella 1. Il-metodi jistgħu jiġu applikati biss għal komposti li ma jinħallux fil-kundizzjonijiet tat-test. F'każijiet fejn il-metodi esperimentali ma jistgħux jiġu applikati minħabba raġunijiet tekniċi, il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi stmata, u metodu ta' stima rrikmandat huwa spjegat fl-Appendiċi.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Il-pressjoni ta' fwar ta' sustanza hija definita bħala l-pressjoni ta' saturazzjoni fuq sustanza solida jew likwida.

L-unità SI ta' pressjoni, li hija l-pascal (Pa), għandha tiġi użata. Unità oħrajn li ġew użati storikament se jingħataw hawn taħt, flimkien mal-fatturi ta' konverżjoni tagħhom:

1 Torr = 1 mm Hg = $1{,}333 \times 10^{2}$ Pa

1 atmosphere = $1{,}013 \times 10^{5}$ Pa

1 bar = 10^{5} Pa

L-unità SI ta' temperatura hija l-kelvin (K). Il-konverżjoni ta' gradi Celsius għal kelvin hija skont il-formula:

$$T = t + 273{,}15$$

fejn, T hija l-Kelvin jew temperatura termodinamika u t hija t-temperatura Celsius

Tabella 1

Metodu ta' kejl	Sustanzi		Ripetibbiltà stmata	Riproduċibbilità stmata	Sensiela rakkomandata
	Solid	Liquid			
Metodu dinamiku	Jinħall malajr	Iva	sa 25 % 1 sa 5 %	sa 25 % 1 sa 5 %	10^{3} Pa sa $2*10^{3}$ Pa $2*10^{3}$ Pa sa 10^{5} Pa
Metodu statiku	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10 Pa sa 10^{5} Pa 10^{-2} Pa sa 10^{5} Pa (1)
Metodu iżoteniskopju	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10^{2} Pa sa 10^{5} Pa

Metodu ta' kejl	Sustanzi		Ripetibbiltà stmata	Riproduċibbilità stmata	Sensiela rakkomandata
	Solid	Liquid			
Metodu ta' effużjoni: bilanċ ta' pressjoni ta' fwar	Iva	Iva	5 sa 20 %	sa 50 %	10^{-3} sa 1 Pa
Metodu ta' effużjoni: Ċellula Knudsen	Iva	Iva	10 sa 30 %	—	10^{-10} sa 1 P
Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali	Iva	Iva	5 sa 30 %	sa 50 %	10^{-10} sa 1 Pa
Metodu ta' saturazzjoni ta' gass	Iva	Iva	10 sa 30 %	sa 50 %	10^{-10} sa 10^3 Pa
Metodu ta' dawwâr jdur fuqu nnifsu	Iva	Iva	10 sa 20 %	—	10^{-4} sa 0.5 Pa

([1]) Meta tu¿a capacitance manometer

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

Ġeneralment, il-pressjoni ta' fwar hija determinata f'temperaturi varji. F'sensiela ta' temperatura limitata, il-logaritmu tal-pressjoni ta' fwar ta' sustanza pura hija funzjoni lineari tal-invers tat-temperatura termodinamika skont l-ekwazzjoni Clapeyron-Clausius simplifikata.

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constant$$

fejn:

p = huwa l-pressjoni ta' fwar f'pascals

ΔHv = is-sħana ta' vaporizzazzjoni f'J mol^{-1}

R = il-kostanti universali ta' gass, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = it-temperatura f'K

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza ma għandhomx għalfejn jiġu użati. Huma utli primarjament biex jiġi ċċekjat ir-rendiment ta' metodu minn żmien għall-ieħor u kif ukoll biex jippermetti paragun bejn riżultati ta' metodi differenti.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.5.1. **Metodu dinamiku (Metodu ta' Cottrell)**

1.5.1.1. *Prinċipju*

Il-pressjoni ta' fwar hija determinata billi titkejjel it-temperatura ta' togħlija tas-sustanzi f'pressjonijiet varji speċifikati bejn wieħed u ieħor 10^3 u 10^5 Pa. Dan il-metodu huwa wkoll irrikmandat għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' togħlija. Għal dak l-għan huwa utli sa 600K. It-temperaturi ta' togħlija ta' likwidi huma ċirka 0,1 °C ogħla f'fond ta' 3 sa 4 ċm milli fil-wiċċ minħabba pressjoni idrostatika tal-kolonna ta' likwidu. Fil-metodu Cottrell (4) it-termometru huwa mqiegħed fil-fwar fuq il-wiċċ tal-likwidu u l-likwidu jagħli jiġi mġiegħel jippompja lilu nnifsu kontinwament fuq il-bozza tat-termometru. Saff irqiq ta' likwidu li hu f'ekwilibrju mal-fwar fi pressjoni atmosferika jgħatti l-bozza. It-termometru għalhekk jaqra l-punt ta' togħlija veru, mingħajr żbalji kkaġunati minn pressjoni ta' sħana eċċessiva u pressjoni idrostatika. Il-pompa li oriġinarjament kienet użata minn Cottrell hija murija fil-figura 1. Tubu A jkun fih il-likwidu jagħli. Fil ta' platinu B issiġillat fil-qiegħ jgħin togħlija uniformi. It-tubu tal-ġenb C jagħti għal kondensatur, u l-għant D jipprevjeni l-kondensat kiesaħ milli jilħaq it-termometru E. Meta l-likwidu f'A jkun jagħli, bżieżaq u likwidu maqbuda mil-lenbut jiġu mferra' miż-żewġ idejn tal-pompa F fuq il-bozza tat-termometru.

Figura 1

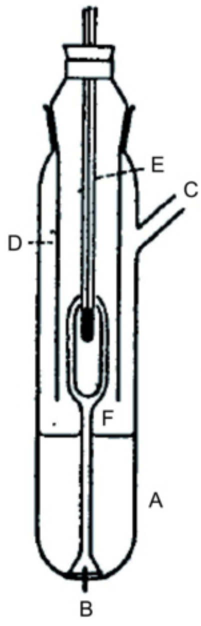
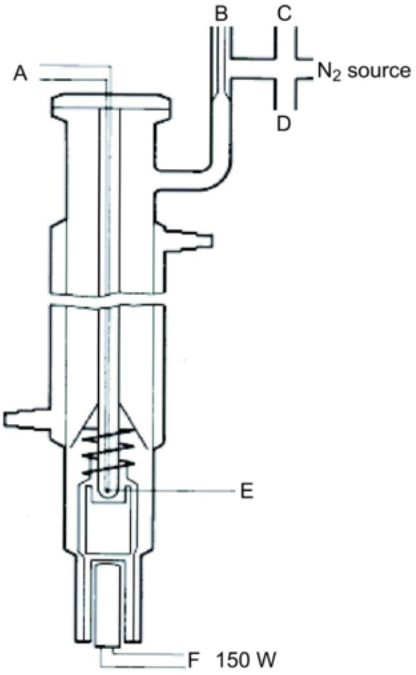


Figura 2



Pompa ta' Cottrell (4)

A: Akkopjament termiku

B: Volum ta' buffer ta' vojt

C: Arloġġ ta' pressjoni

D: Vojt

E: Punt ta' kejl

F: Element li jsaħħan ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparat*

Apparat magħmul b'reqqa kbira, li juża l-prinċipju Cottrell, huwa muri fil-figura 2. Jikkonsisti f'tubu b'sezzjoni ta' togħlija fil-parti l-iktar baxxa, apparat li jkessaħ fil-parti tan-nofs, u ftuħ u xifer fil-parti iktar 'il fuq. Il-pompa Cottrell hija mqiegħda fis-sezzjoni ta' togħlija li hija msaħħna permezz ta' cartridge elettriku. It-temperatura hija mkejla b'akkopjament termiku mgħotti b'materjal li jifred, jew termometru ta' reżistenza li jidħol minn max-xifer ta' fuq. Il-ftuħ huwa mwaħħal mas-sistema ta' regolazzjoni ta' pressjoni. Dan tal-aħħar jikkonsisti f'pompa ta' vojt, volum ta' buffer, manostat biex jerħi n-nitroġenu jidħol sabiex tiġi regolata l-pressjoni u manometru.

1.5.1.3. *Proċedura*

Is-sustanza hija mqiegħda fis-sezzjoni ta' togħlija. Jistgħu jinħolqu problemi rigward solidi li mhumiex trab iżda dawn jistgħu xi kultant jissolvew billi jissaħħan il-materjal ta' kesħa li jgħatti. L-apparat huwa issiġillat fix-xifer u jitneħħa l-gass mis-sustanza. Sustanzi li jipproduċu ragħwa ma jistgħux jiġu mkejla b'dan il-metodu.

L-iktar pressjoni baxxa mixtieqa hija mbagħad issettjata u s-sistema ta' sħana hija mixgħula. Fl-istess ħin, is-sensur tat-temperatura huwa mwaħħal ma' reġistratur.

Ekwilibriju jintlaħaq meta temperatura kostanti ta' togħlija hija rreġistrata waqt pressjoni kostanti. Irid ikun hemm attenzjoni partikolari biex jiġu evitati skossi waqt it-togħlija. Barra minn hekk, kondensazzjoni sħiħa trid isseħħ fuq l-element li jkessaħ. Meta tkun qed tiġi ddeterminata l-pressjoni ta' fwar ta' solidi li jinħallu b'mod baxx, għandha tingħata attenzjoni biex il-kondensatur ma' jitħalliex jeħel.

Wara li jiġi rreġistrat dan il-punt ta' ekwilibrju, pressjoni ogħla tiġi ssettjata. Il-proċess ikompli b'dan il-mod sakemm tintlaħaq 10^5 Pa (ċirka 5 sa 10 punti ta' kejl b'kollox). Bħala kontroll, punti ta' ekwilibriju għandhom jiġu ripetuti bi pressjonijiet inqas.

1.5.2. **Metodu statiku**

1.5.2.1. *Prinċipju*

Fil-metodu statiku (5), il-pressjoni ta' fwar f'ekwilibriju termodinamiku hija determinata f'temperatura speċifika. Dan il-metodu huwa xieraq għal sustanzi u likwidi u solidi multikomponenti fis-sensiela minn 10^{-1} sa 10^{5} u, jekk ikun hemm attenzjoni, anki fis-sensiela 1 sa 10 Pa.

1.5.2.2. *Apparat*

It-tagħmir jikkonsisti f'banju b'temperatura kostanti (preċiżjoni ta' ± 0,2 K), kontenitur għall-kampjun imwaħħal ma' fil ta' vojt, manometru u sistema li tirregola l-pressjoni. Il-kamra tal-kampjun (figura 3a) hija mwaħħla mal-fil ta' vojt permezz ta' valvola u manometru differenzjali (Tubu U li fih likwidu xieraq tal-manometru) li jservi bħala indikatur ta' zero. Merkurju, silikoni u ftalati huma tajbin għal użu fil-manometru differenzjali, iżda dan jiddependi fuq is-sensiela ta' pressjoni u l-mġiba kimika tas-sustanza tat-test. Madankollu, minħabba beżgħat ta' natura ambjentali, l-użu ta' merkurju għandu jiġi evitat, jekk possibbli. Is-sustanza tat-test ma għandiex tinħall notevolment ġol-likwidu tat-tubu U, jew tagħmel reazzjoni miegħu. Arloġġ ta' pressjoni jista' jintuża minflok tubu U (figura 3b). Għall-manometru, jista' jintuża l-merkurju fis-sensiela minn pressjoni normali 'l isfel sa 102 Pa, waqt li likwidi u ftalati ta' silikon huma tajbin għal użu taħt 10^{2} Pa 'l isfel sa 10 Pa. Hemm arloġġi ta' pressjoni oħrajn li jistgħu jintużaw taħt 102 Pa u manometri ta' kapaċità ta' membrana li tissaħħan jistgħu anki jiġu użati taħt 10^{-1} Pa. It-temperatura hija mkejla fuq il-ħajt ta' barra tal-kontenitur li jkun fih il-kampjun jew fil-kontenitur innifsu.

1.5.2.3. *Proċedura*

Billi tuża l-apparat kif deskritt fil-figura 3a, imla t-tubu U bil-likwidu magħżul, li minnu jrid jitneħħa l-gass f'temperatura għolja qabel ma jittieħdu l-valuri. Is-sustanza tat-test titqiegħed fit-tagħmir u minnha jitneħħa l-gass f'temperatura mnaqqsa. F'każ ta' kampjun b'komponent multiplu, it-temperatura trid tkun baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-kompożizzjoni tal-materjal ma tinbidilx. L-ekwilibriju jista' jintlaħaq iktar malajr billi tħawwad il-kampjun. Il-kampjun jista' jiġi mkessaħ b'nitroġenu likwidu jew silġ niexef, iżda għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-kondensazzjoni tal-arja jew tal-likwidu tal-pompa. Bil-valvola fuq il-kontenitur kampjun miftuħa, għandha tiġi applikata aspirazzjoni għal ftit minuti sabiex titneħħa l-arja. Jekk ikun neċessarju, l-operazzjoni ta' tneħħija ta' gass tiġi ripetuta għal diversi drabi.

Figura 3a

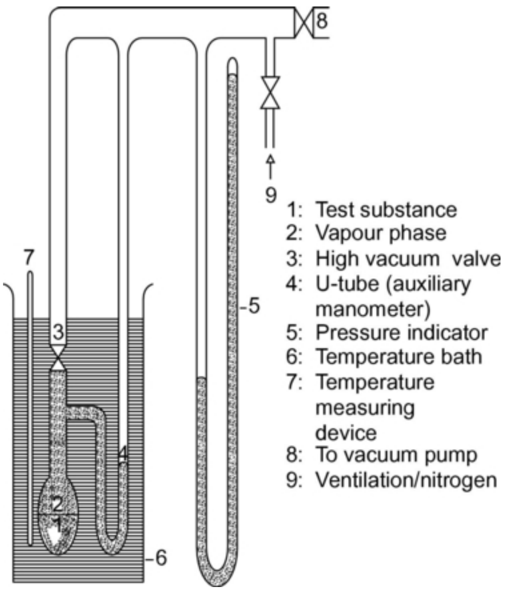
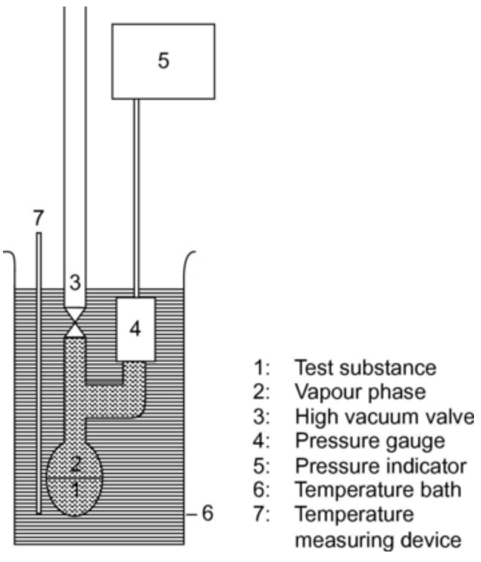


Figura 3b



Meta l-kampjun jiġi msaħħan bil-valvola magħluqa, il-pressjoni tal-fwar tiżdied. Dan jibdel l-ekwilibriju tal-likwidu fit-tubu U. Sabiex jagħmel tajjeb għal dan, nitroġenu jew arja jiddaħħal/tiddaħħal fit-tagħmir sakemm l-indikatur ta' pressjoni differenzjali jerġa' jiġi żero. Il-pressjoni meħtieġa għal dan tista' tinqara mill-manometru jew minn għodda ta' preċiżjoni ikbar. Din il-pressjoni taqbel mal-pressjoni ta' fwar tas-sustanza fit-temperatura tal-kejl. Billi tuża l-apparat deskritt fil-figura 3 b, il-pressjoni ta' fwar tinqara direttament.

Il-pressjoni ta' fwar hija determinata f'intervalli ta' temperaturi konvenjentement żgħar (ċirka 5 sa 10 punti ta' kejl b'kollox) sal-massimu tat-temperatura mixtieqa.

Indikazzjonijiet f'temperatura baxxa għandhom jiġu ripetuti bħala kontroll. Jekk il-valuri miġjuba mill-indikazzjonijiet ripetuti ma jaqblux mal-kurva li tindika temperatura għola, dan jista' jkun minħabba waħda minn dawn is-sitwazzjonijiet li ġejjin:

i) il-kampjun għad fih l-arja (eż fil-każ ta' materjali viskużi ħafna) jew sustanzi b'togħlija baxxa li joħorġu waqt li jkun qed jiġi msaħħan;

ii) is-sustanza tkun suġġetta għal reazzjoni kimika fis-sensiela ta' temperaturi mistħarrġa (eż dekompożizzjoni, polimerizzazzjoni).

1.5.3. **Metodu ta' Iżoteniskopju**

1.5.3.1. *Prinċipju*

L-iżoteniskopju (6) hu bbażat fuq il-prinċipju tal-metodu statiku. Il-metodu jinvolvi li tpoġġi kampjun f'bozza miż-muma f'temperatura kostanti u mwaħħla ma' manometru u pompa ta' vojt. Impuritajiet iktar volatili mis-sustanza huma mneħħija billi jitneħħa l-gass fi pressjoni imnaqqsa. Il-pressjoni ta' fwar tal-kampjun f'temperaturi magħżula hija bilanċjata bi pressjoni magħrufa ta' gass li ma jagħmilx reazzjoni. L-iżoteniskopju kien żviluppat biex ikejjel il-pressjoni ta' fwar ta' ċerti idrokarboni likwidi iżda hija adegwata għall-investigazzjoni ta' solidi wkoll. Il-metodu ma huwiex ġeneralment xieraq għal sistemi b'iktar minn komponent wieħed. Ir-riżultati huma suġġetti biss għal żbalji żgħar f'każ ta' kampjuni ta' impuritajiet mhux volatili. Is-sensiela rrikmandata hija 10^2 sa 10^5 Pa.

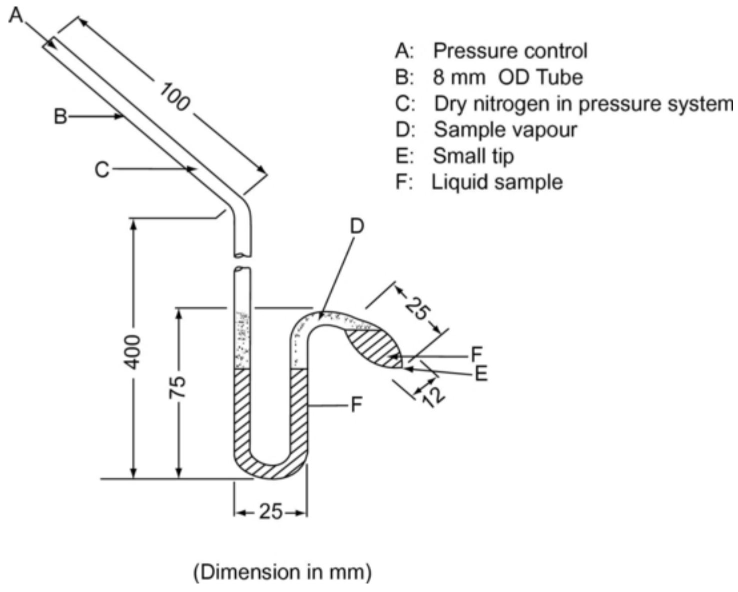
1.5.3.2. *Apparat*

Eżempju ta' tagħmir ta' kejl huwa muri fil-figura 4. Deskrizzjoni sħiħa tinsab f'ASTM D 2879-86 (6).

1.5.3.3. *Proċedura*

Fil-każ ta' likwidi, is-sustanza nnifisha sservi bħala l-likwidu fil-manometru differenzjali. Kwantità tal-likwidu, biż-żejjed biex timla l-bozza u l-iqsar sieq tal-manometru, hija mqiegħda fuq l-iżoteniskopju. L-iżoteniskopju huwa mwaħħal ma' sistema ta' vojt u mbattal, imbagħad mimli bin-nitroġenu. It-tbattil u t-tisfija tas-sistema huma ripetuti darbtjen biex jitneħħa l-ossiġnu li jifdal. L-iżoteniskopju mimli huwa mqiegħed f'pożizzjoni orizzontali sabiex il-kampjun jinxtered u jifforma saff irqieq fil-bozza tal-kampjun u manometru. Il-pressjoni tas-sistema titnaqqas għal 133 Pa u l-kampjun huwa msaħħan bil-mod sakemm jagħli (tneħħija ta' gassijiet maħlula). L-iżoteniskpju huwa mbagħad imqiegħed b'ċertu mod li l-kampjun jirritorna lejn il-bozza u jimla s-sieq il-qasira tal-manometru. Il-pressjoni tinżamm 133 Pa. Il-qarnuna maħruġa 'l barra tal-bozza tal-kampjun hija msaħħna bi fjamma żgħira sakemm il-fwar tal-kampjun li joħroġ jespandi biżżejjed b'mod li jħarrek parti mill-kampjun mill-parti l-iktar 'l fuq tal-bozza u id tal-manometru u jqiegħda fil-manometru, waqt li joħloq spazzju mimli bil-fwar u ħieles minn nitroġenu. L-iżoteniskopju huwa mbagħad imqiegħed f'banju b'temperatura kostanti, u l-pressjoni tan-nitroġenu hija aġġustata sakemm tiġi daqs dik tal-kampjun. Fl-ekwilibriju, il-pressjoni tan-nitroġenu tiġi daqs dik tal-fwar tas-sustanza.

Figura 4



F'każ ta' solidi, u jiddependi fuq is-sensiliet ta' pressjoni u temperatura, likwidi tal-manometru bħal likwidi u ftalati ta' silikon huma użati. Il-likwidu ta' manometru bla gass huwa mqiegħed ġol-biċċa maħruġa l-barra fuq l-id it-twila tal-iżoteniskopju. Imbagħad is-solidu li se jiġi mistħarreġ jitqiegħed fil-bozza ta' kampjun u minnu jitneħħa l-gass f'temperatura għolja. Wara dak, l-iżoteniskopju jiġi mmejjel sabiex il-likwidu ta' manometru jkun jista' jidħol fit-tubu U.

1.5.4. **Metodu ta' effużjoni: bilanċ ta' pressjoni ta' fwar** (7)

1.5.4.1. *Prinċipju*

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi msaħħan f'forn żgħir u mqiegħed f'vażett forma ta' qampiena (bell jar) mbattal. Il-forn huwa mgħotti b'għatu li fih toqob zgħar ta' dijametri magħrufa. Il-fwar tas-sustanza, li joħroġ minn waħda mit-toqob, huwa mmexxi għal fuq plattina ta' miżien sensittiv ħafna li huwa wkoll magħluq fil-vażett forma ta' qampiena. F'xi diżinni l-plattina tal-miżien hija mdawwra b'kaxxa li tkessaħ li tipprovdi ħruġ ta' sħana 'l barra permezz ta' konduzzjoni termika, u hija mkessħa b'radjazzjoni sabiex il-fwar li joħroġ jikkondensa fuqha. Il-momentum tal-merżuq ta' fwar jaħdem bħala forza fuq il-miżien. Il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi b'żewġ modi: direttament mill-forza fuq il-plattina tal-miżien u wkoll mir-rata ta' evaporazzjoni li tuża l-ekwazzjoni Hertz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

fejn:

G = rata ta' evaporazzjoni ($kg\ s^{-1}\ m^{-2}$)

M = massa molari ($g\ mol^{-1}$)

T = temperatura (K)

R = kostanti universali ta' gass ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$)

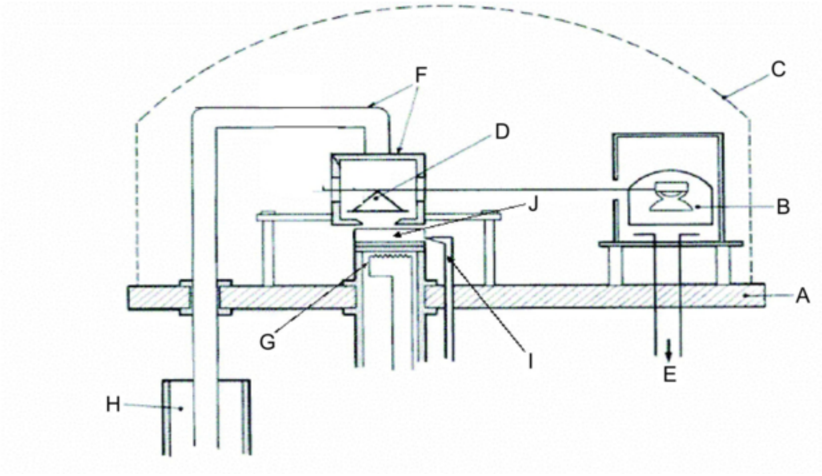
P = pressjoni ta' fwar (Pa)

Is-sensiela rrikmandata hija minn 10^{-3} sa 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tal-apparat huwa muri fil-figura 5.

Figura 5



A:	Sett ta' bażi	F:	Kaxxa li tkessaħ u lasta li tkessaħ
B:	Għodda bi spirall jimxi	G:	Forn evaporatur
C:	Vażett forma ta' qampiena	H:	Kunjett Dewar b'nitroġenu likwidu
D:	Miżien bi plattina	I:	Kejl ta' temperatura ta' kampjun
E:	Dispożittiv li jkejjel il-vojt	J:	Sustanza tat-test

1.5.5. **Metodu ta' effużjoni: Ċellula Knudsen**

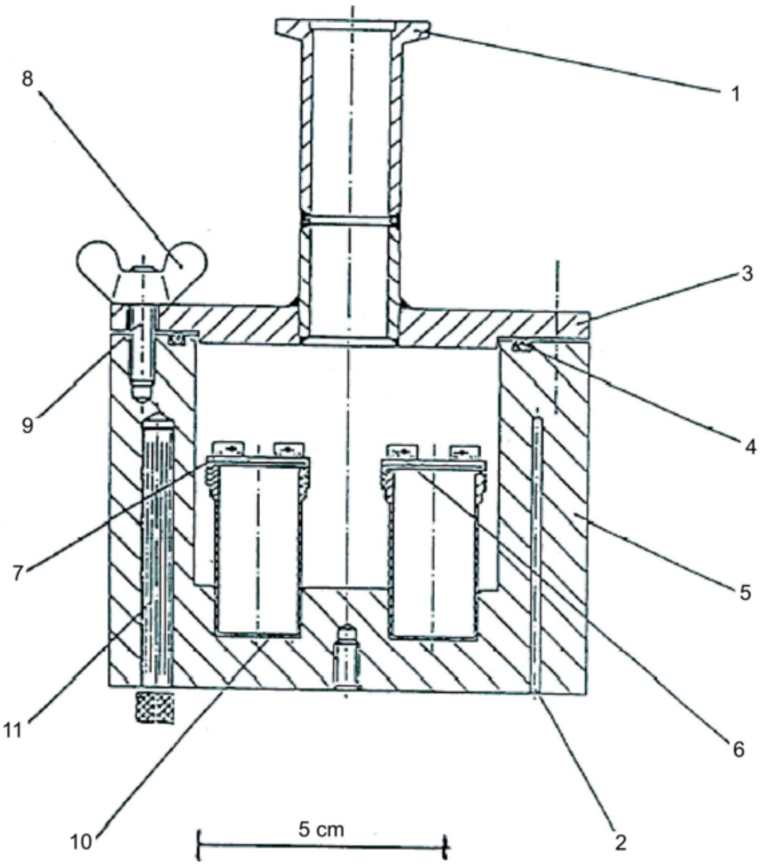
1.5.5.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu huwa bbażat fuq stima tal-massa tas-sustanza tat-test ħierġa 'l barra għal kull unità ta' ħin ta' ċellula Knudsen (8) f'forma ta' fwar, minn toqba żgħira ħafna f'kundizzjonijiet estremi ta' vojt. Il-massa ta' fwar li ħareġ tista' tinstab jew billi jiġi ddeterminat it-telf tal-massa taċ-ċellula jew billi jiġi kkondensat il-fwar f'temperatura baxxa u jiġi ddeterminat l-ammont ta' sustanza volatilizzata permezz ta' kromatografija. Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata billi tiġi applikata r-relazzjoni ta' Hertz-Knudsen (ara t-taqsima 1.5.4.1) ma' fatturi korrettivi li jiddependu fuq il-parametri tal-apparat (9). Is-sensiela rrikmandata hija 10^{-10} to 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tal-apparat huwa muri fil-figura 6.

Figura 6



1: Konnessjoni mal-vojt	7: Għatu meħjut
2: Bjar minn termometru ta' reżistenza tal-platinu jew kejl ta' temperature u kontroll	8: Skorfini farfett
3: Għatu għat-tank tal-vojt	9: Viti
4: Ċirku-O	10: Ċelluli ta' effużjoni b'ħadid li ma jissaddadx
5: Tank tal-vojt tal-aluminju	11: Cartridge li ssaħħan
6: Dispożittiv biex tinstalla u tneħħi ċ-ċelloli ta' effużjoni	

1.5.6. **Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali**

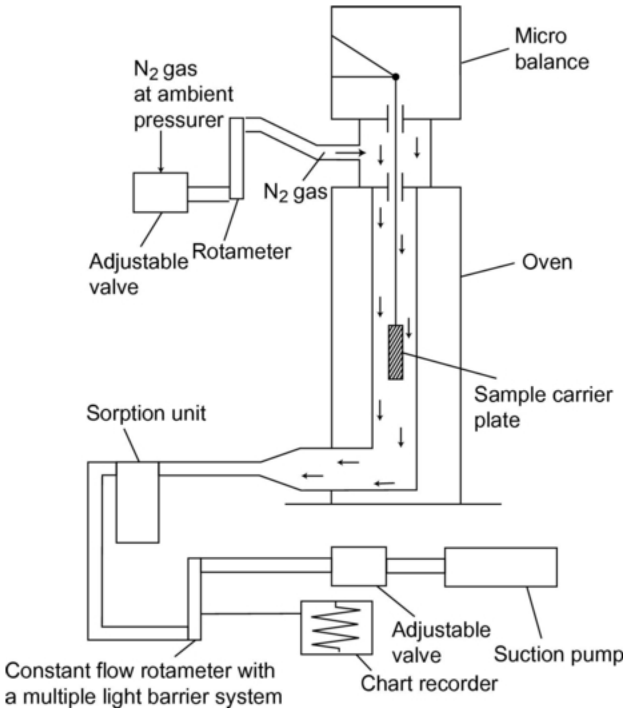
1.5.6.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu huwa bbażat fuq id-determinazzjoni ta' rati aċċelerati ta' evaporazzjoni għas-sustanza tat-test f'temperaturi għolja u pressjoni ambjentali bl-użu ta' termogravimetrija (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Ir-rati ta' evaporazzjoni v_T jirriżultaw billi jiġi espost il-kompost magħżul għal atmosfera ta' gass, li ma jagħmilx reazzjoni, għaddej bil-mod, u jiġi kkontrollat it-telf ta'piż f'temperaturi iżotermali definiti T f'Kelvin fuq perjodi xierqa ta' żmien. Il-pressjonijiet ta' fwar p_T huma kkalkulati mill-valuri v_T billi tuża r-relazzjoni lineari bejn il-logaritmu tal-pressjoni ta' fwar u l-logaritmu tar-rata ta' evaporazzjoni. Jekk neċessarju, estrapolazzjoni lil temperaturi ta' 20 u 25 °C tista' ssir b'analiżi ta' regressjoni ta' log p_T vs. 1/T. Dan il-metodu huwa tajjeb għal sustanzi bi pressjonijiet ta' fwar baxxi sa 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) u b'purità qrib kemm jista' jkun ta' 100 % sabiex tiġi evitata l-miżinterpretazzjoni ta' telf ta' piż imkejjel.

1.5.6.2. *Apparat*

Il-prinċipju ġenerali tat-tagħmir esperimentali huwa muri fil-figura 7.

Figura 7



Il-keffa li ġġorr il-kampjun, imdendel fuq miżien micro f'kamra b'temperatura kkontrollata, huwa miġbud permezz ta' nixxiegħa ta' gass nitroġenu niexef li jġorr il-molekuli vaporizzati tas-sustanza tat-test lil hinn. Wara li tħalli l-kamra, in-nixxiegħa ta' gass hija ppurifikata b'unità ta' assorbiment.

1.5.6.3. *Proċedura*

Is-sustanza ta' test hija applikata fuq il-wiċċ ta' platt aħrax tal-ħġieġ bħala saff omoġeneju. Fil-każ ta' solidi, il-keffa tixxarrab b'mod uniformi b'soluzzjoni tas-sustanza f'solvent xieraq u mnixxef f'atmosfera inerta. Għall-kejl, il-keffa miksija tiġi mdendla għal ġol-analizzatur termogravimetriku u sussegwentement it-telf tal-piż tiegħu jiġi mkejjel kontinwament bħala funzjoni ta' ħin.

Ir-rata ta' evaporazzjoni v_T f'temperatura definita hija ikkalkulata mit-telf ta' piż m tal-platt tal-kampjun permezz ta'

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}\left(gcm^{-2}h^{-1}\right)$$

fejn F hija l-erja tal-wiċċ tas-sustanzi ta' test miksija, normalment l-erja tal-wiċċ tal-platt tal-kampjun, u t huwa l-ħin għat telf ta' piż Δm.

Il-pressjoni ta' fwar p_T hija kkalkulata fuq il-bażi tal-funżjoni tagħha ta' rata ta' evaporazzjoni v_T:

$$\text{Log } p_T = C + D \log v_T$$

fejn C u D huma kostanti speċifiċi għall-arranġament sperimentali użat, jiddependi fuq id-dijametru tal-kamra ta' kejl u fuq ir-rata ta' fluss ta' gass. Dawn il-kostanti għandhom jiġu ddeterminati darba billi jitkejjel sett ta' komposti bi pressjoni ta' fwar magħrufa u log p_T vs. log v_T li jmur lura (11)(21)(22).

Ir-relazzjoni bejn il-pressjoni ta' fwar p_T u t-temperatura T f'Kelvin tingħata permezz ta'

$$\text{Log } p_T = A + B\ 1/T$$

fejn A u B huma kostanti miġjuba permezz ta' log p_T vs. 1/T li jmur lura. B'din l-ekwazzjoni, il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi kkalkulata għal kull temperatura oħra b'estrapolazzjoni.

1.5.7. **Metodu ta' saturazzjoni ta' gass** (23)

1.5.7.1. *Prinċipju*

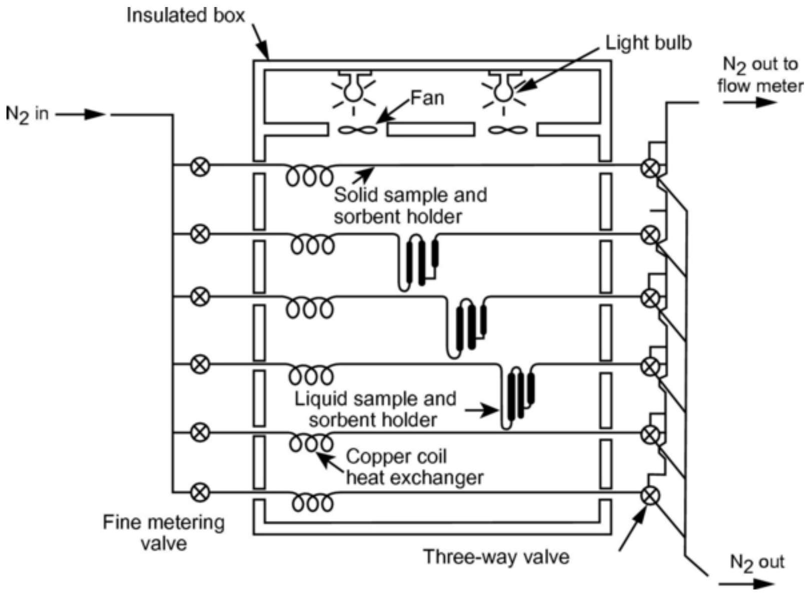
Gass inert huwa mgħoddi, f'temperatura ambjentali u b'rata magħrufa ta' fluss, minn u fuq kampjun tas-sustanza tat-test, bil-mod biżżejjed biex jiżgura saturazzjoni. Li tintlaħaq saturazzjoni fil-fażi ta' gass hija ta' importanza kritika. Is-sustanza trasportata hija maqbuda, ġeneralment billi jintuża assorbent, u l-ammont tagħha jiġi ddeterminat. Bħala alternattiva għal qbid ta' fwar u analiżi sussegwenti, tekniki analitiċi in-train, bħal kromatografija ta' gass, jistgħu jiġu użati biex jiġi ddeterminat kwantitattivament l-ammont tal-materjal trasportat. Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata fuq l-assunzjoni li l-prinċipju ideali ta' gass huwa obdut u li l-pressjoni totali ta' taħlita ta' gassijiet hija daqs s-somma ta' pressjonijiet tal-gassijiet komponenti. Il-pressjoni parzjali tas-sustanza tat-test, i.e. il-pressjoni ta' fwar, hija kkalkulata mill-volum totali ta' gass magħruf u mill-piż tal-materjal trasportat.

Il-proċedura ta' saturazzjoni ta' gass hija applikabbli għal sustanzi kimiċi solidi jew likwidi. Tista' tiġi użata għal pressjonijiet ta' fwar sa 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Dan il-metodu huwa l-iktar ta' min joqgħod fuqu għal pressjonijiet ta' fwar taħt 10^3 Pa. Fuq 103 Pa, il-pressjonijiet ta' fwar huma ġeneralment stmati żżejjed, probabbilment minħabba tiswir ta' aerosol. Minħabba li l-kejl ta' pressjoni ta' fwar isir f'temperatura ambjentali, m'hemmx bżonn li toħroġ dejta minn temperaturi għolja u ħruġ ta' dejta f'temperaturi għolja, li ta' spiss jikkawżaw żbalji serji, huma evitati.

1.5.7.2. *Apparat*

Din il-proċedura tirrikjedi l-użu ta' kaxxa b'temperatura kostanti. L-iskizz fil-Figura 8 juri kaxxa li fiha tlett kontenituri ta' kampjuni solidi u tlieta oħra għal kampjuni likwidi, li jippermetti analiżi triplikata ta' kampjun solidu jew likwidu. It-temperatura hija kontrollata għal ± 0,5 °C jew aħjar.

Figura 8



Ġeneralment, nitroġenu huwa użat bħala gass inerti li jġorr iżda, xi drabi, gass ieħor jista' jkun bżonnjuż (24). Il-gass li jġorr għandu jkun niexef. In-nixxiegħa ta' gass tinqasam f'6 nixxigħat, kontrollati minn valvoli labar (b'toqba ta' ċirka 0.79 mm), u jidħol fil-kaxxa minn tubu tar-ram ta' 3.8 mm i.d. Wara ekwilibrazzjoni ta' temperatura, il-gass jgħaddi minn ġol-kampjun u t-trappola assorbenti u joħroġ minn ġol-kaxxa.

Kampjuni solidi jiddaħħlu f'tubu tal-ħġieġ 5 mm i.d. bejn tappijiet ta' suf tal-ħġieġ (ara Figura 9). Figura 10 turi kontenitur ta' kampjun likwidu u sistema ta' assorbiment. L-eħfef metodu ta' kif titkejjel il-pressjoni ta' fwar ta' likwidi huwa li jinksew żibeġ tal-ħġieġ bil-likwidu jew inkella jinkesa assorbent inert bħal silika, u jimtela l-kontenitur b'dawn iż-żibeġ. Bħala alternattiva, il-gass li jġorr jista' jiġi mġiegħel jgħaddi minn ħġieġ aħrax bil-pori u jbaqbaq minn ġo kolonna tas-sustanza likwida tat-test.

Figura 9

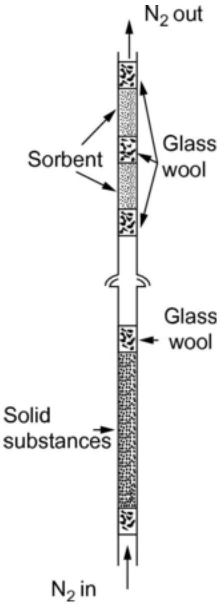
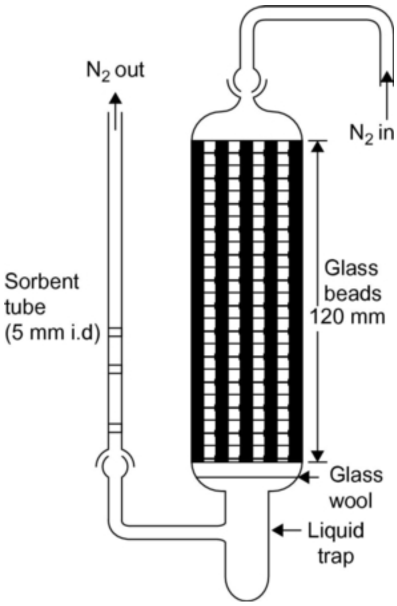


Figura 10



Is-sistema ta' assorbent fiha sezzjoni assorbenti fuq quddiem u oħra ta' sostenn. Fi pressjonijiet ta' fwar baxxi ħafna, ammonti żgħar biss jinżammu mill-assorbent u l-assorbiment fuq is-suf tal-ħġieġ u t-tubu tal-ħġieġ bejn il-kampjun u l-assorbent tista' tkun problema serja.

Trappoli mkessħa b'CO_2 solidu huwa metodu effiċjenti ieħor kif jinġabar il-materjal vaporizzat. Huma ma jikkawżaw l-ebda pressjoni b'lura fuq il-kolonna tas-saturatur u huwa ħafif ħafna li kwantitattivament jitneħħa l-materjal maqbud.

1.5.7.3. *Proċedura*

Ir-rata ta' fluss tal-gass ħiereġ li jġorr hija mkejla f'temperatura ambjentali. Ir-rata ta' fluss hija ċċekjata frekwentament matul l-esperiment biex tiżgura li hemm valur eżatt għall-volum totali ta' gass li jġorr. Kontroll kontinwu b'apparat li jkejjel il-fluss tal-massa huwa preferut. Saturazzjoni tal-fażi ta' gass tista' tirrikjedi ħin ta' kuntatt konsiderevoli u għalhekk rati ta' fluss aktarx baxxi (25).

Fit-tmiem tal-esperiment, kemm is-sezzjoni ta' quddiem u kemm dik ta' sostenn tal-assorbent huma analizzati separatament. Il-kompost fuq kull sezzjoni huwa desorbit billi jiżdied solvent. Is-soluzzjonijiet li jirriżultaw huma analizzati kwantitattivament biex jiġi ddeterminat il-piż desorbit minn kull sezzjoni. L-għażla tal-metodu analitiku (u anki l-għażla ta' sorbent u solvent desorbenti) hija dettata min-natura tal-materjal tat-test. L-effiċjenza ta' desorbiment hija determinata billi jiġi injettat ammont magħruf ta' kampjun fuq is-sorbent, tiddesorbjah u tanalizza l-ammont irkuprat. Huwa importanti li tiġi ċċekjata l-effiċjenza ta' desorbiment fejn jew qrib il-konċentrazzjoni tal-kampjun fil-kundizzjonijiet tat-test.

Biex tiżgura li l-gass li jġorr huwa saturat bis-sustanza tat-test, tliet rati differenti ta' fluss ta' gass huma użati. Jekk il-pressjoni ta' fwar ikkalkulata ma turi l-ebda dipendenza fuq ir-rata tal-fluss, il-gass huwa kkunsidrat bħala saturat.

Il-pressjoni tal-fwar hija kkalukulata permezz tal-ekwazzjoni:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

fejn:

p = pressjoni ta' fwar (Pa)

W = massa ta' sustanza ta' test evaporata (g)

V = volum ta' gass saturat (m^3)

R = kostanti universali ta' gass 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = massa molari tas-sustanza tat-test (g mol^{-1})

Volumi mkejla għandhom jiġu rranġati għal differenzi ta' pressjoni u temperatura bejn id-dispożittiv li jikkalkula l-fluss u s-saturatur.

1.5.8. **Dawwar li jdur fuqu nnifsu**

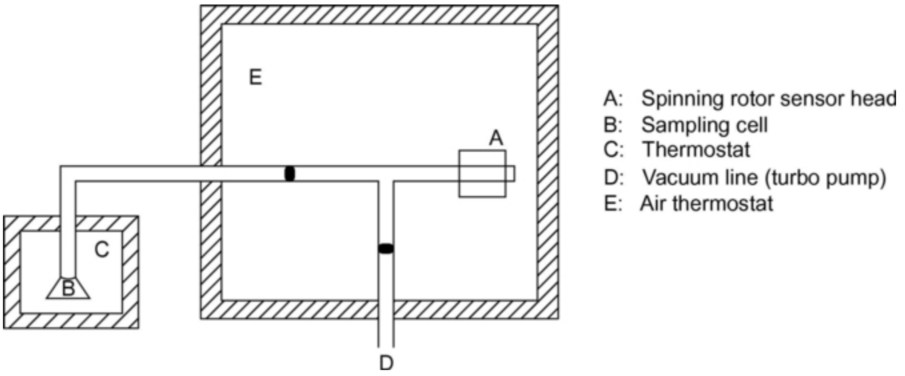
1.5.8.1. *Prinċipju*

Dan il-metodu juża arloġġ ta' viskożità b'dawwâr li jdur fuqu nnifsu, li l-element ta' kejl tiegħu huwa ballun żgħir tal-ħadid li, meta jkun imdendel f'kamp manjetiku, jibda jdur fuqu nnifsu minħabba kampi manjetiċi li jduru (26)(27)(28). Fonorivelaturi jippermettu li r-rata ta' dawrien tiegħu tiġi mkejla. Meta l-ballun ikun laħaq veloċità ta' dawrien stabbilita, normalment ċirka 400 dawra fis-sekonda, l-enerġija titwaqqaf u deċelerazzjoni, minħabba frizzjoni ta' gass, isseħħ. It-tnaqqis fil-veloċità ta' dawrien hija mkejla bħala funzjoni ta' żmien. Il-pressjoni ta' fwar hija mnaqqsa mit-tnaqqis ta' veloċità tal-ballun tal-ħadid ikkawżat mill-pressjoni. Is-sensiela rrikmandata hija minn 10^{-4} sa 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparat*

Diżinn skematiku tat-tagħmir sperimentali huwa muri fil-figura 11. Ir-ras ta' kejl hija mqiegħda f'għeluq ta' temperatura kostanti, irregolat b'0,1 °C. Il-kontenitur tal-kampjun hu mqiegħed f'għeluq separat, irregolat ukoll b'0,1 °C. Il-partijiet l-oħra kollha tat-tagħmir huma miżmuma f'temperatura ogħla biex tipprevjeni l-kondensazzjoni. L-apparat kollu huwa mwaħħal ma' sistema elevata ta' vojt.

Figura 11



2. **DEJTA U RAPPURTAR**

2.1. DEJTA

Il-pressjoni ta' fwar minn xi wieħed mill-metodi t'hawn fuq għandha tiġi ddeterminata għal mill-inqas żewġ temperaturi. Tlieta jew iktar huma preferuti fis-sensiela minn 0 sa 50°, sabiex tiġi ċċekjata l-linearità tal-kurva ta' pressjoni ta' fwar. Fil-każ ta' metodu ta' Effużjoni (Ċellula Knudsen u termogravimetrija iżotermali) u metodu ta' saturazzjoni ta' Gass, 120 sa 150 °C hija rrikmandata għas-sensiela ta' kejl ta' temperatura minflok minn 0 sa 50 °C.

2.2. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— metodu użat,

— speċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u pass preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm,

— mill-inqas żewġ valuri ta' pressjoni ta' fwar u temperatura — u preferibbilment tlieta jew iktar — rikjesti fis-sensiela minn 0 sa 50 °C (jew 120 sa 150 °C),

— mill-inqas waħda mit-temperaturi għandha tkun 25 °C jew inqas, jekk teknikament possibli skont il-metodu magħżul,

— id-dejta kollha oriġinali,

— kurva ta' log p versus 1/T,

— stima tal-pressjoni ta' fwar f'20 jew 25 °C.

Jekk tranżizzjoni (bidla ta' stat, dekompożizzjoni) hija osservata, l-informazzjoni li ġejja għandha tiġi nnutata:

— natura tal-bidla,

— temperatura li fiha l-bidla sseħħ fi pressjoni atmosferika,

— pressjoni ta' fwar f'10 u 20 °C inqas mit-temperatura ta' tranżizzjoni u 10 u 20 °C iktar minn din it-temperatura (sakemm it-tranżizzjoni hija minn solidu għal gass).

Kull informazzjoni u rimarki rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom jiġi rrapurtati, speċjalment f'dak li għandu x'jaqsam ma' impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

3. LETTERATURA

(1) *Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej* L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use –Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000)

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002)

(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

Appendiċi

Metodu ta' stima

INTORDUZZJONI

Valuri stmati ta' pressjoni ta' fwar jistgħu jintuzaw:

— biex jiġi deċiż liema metodu sperimentali huwa xieraq;

— biex jipprovdu stima jew valur ta' limitu f'każijiet fejn il-metodu sperimentali ma jistax jiġi applikat minħabba raġunijiet tekniċi.

METODU TA' STIMA

Il-pressjoni ta' fwar ta' likwidi u solidi tista' tiġi stmata bl-użu tal-korrelazzjoni Watson modifikata (a). L-unika dejta sperimentali meħtieġa huwa l-punt normali ta' togħlija. Il-metodu huwa applikabbli għas-sensiela ta' pressjoni minn 10^5 Pa sa 10^{-5} Pa.

Informazzjoni dettaljata fuq il-metodu hija mogħtija fil-"Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b). Ara wkoll OECD "Environmental Monograph" Nru.67 (c)

PROĊEDURA TA' KALKOLAZZJONI

Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_b}\right]$$

fejn:

T	=	temperatura ta' interess
T_b	=	punt ta' togħlija normali
P_{VP}	=	pressjoni ta' fwar f'temperatura T
ΔH_{Vb}	=	sħana ta' vaporizzazzjoni
ΔZ_b	=	fattur ta' kompressibilità (stmat f' 0,97)
m	=	fattur empiriku li jiddependi fuq l-istat fiżiku fit-temperatura ta' interess

Flimkien ma',

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8,75 + R \ln T_b)$$

fejn, K_F hija fattur empiriku li jikkunsidra l-polarità tas-sustanza. Għal xi tipi ta' komposti, fatturi K_F huma elenkati f'riferenza (b).

Ħafna drabi, teżisti dejta fejn jingħata l-punt ta' togħlija f'pressjoni mnaqqsa. F'każ bħal dan, il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

fejn, T_1 hija l-punt ta' togħlija fil-pressjoni mnaqqsa P1.

RAPPORT

Meta jintuża l-metodu ta' stima, ir-rapport għandu jinkludi dokumentazzjoni komprensiva tal-kalkulazzjoni.

LETTERATURA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph Nru.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

ANNESS II

A.22. **ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGĦHOM**

1. **IL-METODU**

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jiddeskrivi proċedura li tkejjel id-Dijametru Medju Ġeometriku Peżat Skont it-Tul [Length Weighted Geometric Mean Diameter] (LWGMD) ta' massa ta' Fibri Minerali Magħmula mill-Bniedem [Man Made Minerla Fibres] (MMMF). Minħabba li l-LWGMD tal-popolazzjoni se jkollha probabbiltà ta' 95 % li tkun bejn il-livelli ta' kunfidenza ta' 95 % (LWGMD ± żewġ devjazzjonijiet standard) tal-kampjun, il-valur irrapportat (il-valur tat-test) se jkun l-inqas limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-kampjun (iġifieri LWGMD — 2 devjazzjonijiet standard). Il-metodu huwa bbażat fuq aġġornament (Ġunju 1994) ta' abbozz ta' proċedura industrijali HSE maqbula fil-laqgħa bejn l-ECFIA u l-HSE f'Chester fis-26/9/93 u żviluppat għal u permezz ta' tieni prova interlaboratorja (1, 2). Dan il-metodu ta' kejl jista' jintuża sabiex jikkaratterizza d-dijametru tal-fibra ta' sustanzi tal-massa jew prodotti li fihom l-MMMFs u jinkludu fibri ta' ċeramika refrattarja (RCF), fibri tal-ħġieġ magħmula mill-bniedem (MMVF), u fibri tal-kristallina u l-polikristallina.

L-ippeżar tat-tul huwa mod ta' kumpens għall-effett fuq id-distribuzzjoni tad-dijametru kkawżata bit-tkissir ta' fibri twal meta jkunu qed isiru l-kampjuni jew jitmiss il-materjal. Tintuża statistika ġeometrika (medja ġeometrika) sabiex tkejjel id-distribuzzjoni tad-daqs tad-dijametri tal-MMMF għaliex ġeneralment dawn id-dijametri jkollhom distribuzzjonijiet tad-daqs li jqarbu n-norma logaritmika.

Il-kejl tat-tul kif ukoll tad-dijametru huwa tedjanti u jieħu ħafna ħin imma, jekk jitkejlu biss dawk il-fibri li jmissu linja infinitament irqieqa fuq il-firxa viżiva ta' SEM, imbagħad il-probabbiltà li tingħażel waħda mill-fibri tkun proporzjonali għat-tul tagħha. Minħabba li b'hekk jitqies it-tul fil-kalkoli tal-ippeżar tat-tul, l-uniku kejl meħtieġ huwa d-dijametru u l-LWGMD-2SE jista' jkun ikkalkulat kif deskritt.

1.2. TIFSIRIET

Il-partikula: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' ta' inqas minn 3:1.

Il-fibra: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' (aspect ratio) mill-inqas 3:1.

1.3. AMBITU U LIMITAZZJONIJIET

Il-metodu huwa ddisinjat sabiex janalizza d-distribuzzjoni ta' dijametri li jkollhom valur medja bejn 0,5 μm u 6 μm. Dijametri ikbar jistgħu jitkejlu bl-użu ta' ingrandimenti minn SEM iktar baxxi iżda l-metodu se jkun dejjem iktar limitat fid-distribuzzjonijiet tal-fibra iktar fini u jekk id-dijametru medjan ikun inqas minn 0,5 μm, huwa rrakkomandat kejl permezz ta' TEM (transmission electron microscope).

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

Numru ta' kampjuni rappreżentattivi tal-qalba jittieħdu mill-kutra tal-fibra jew jiġu mislutin mill-massa tal-fibra. Il-fibri tal-massa jitqassru bl-użu ta' proċedura tat-tifrik u sottokampjun rappreżentattiv mxerred fl-ilma. Il-biċċiet jiġu estratti u ffiltrati minn filtru tal-polikarbonat b'pori tad-daqs 0,2 μm u jiġu ppreparati għal analiżi bl-użu ta' tekniki tal-iscanning electron microscope (SEM). Id-dijametri tal-fibri jitkejlu taħt ingrandiment tal-iskrin ta' × 10 000 jew ikbar ([1]) bl-użu ta' metodu ta' interċetazzjoni tal-linja sabiex tittieħed stima imparzjali tad-dijametru medjan. L-inqas intervall tal-kunfidenza ta' 95 % (ibbażat fuq test unilaterali) jiġi kkalkulat sabiex issir stima tal-iżjed valur baxx tal-medju ġeometriku tad-dijametru tal-fibra tal-materjal.

([1]) Dan il-valur ta' ingrandiment huwa indikat għall-fibri tad-daqs 3 μm, għall-fibri tad-daqs 6 μm ingrandiment ta' × 5 000 jaf ikun aħjar.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

1.5.1. **Il-prekawzjonijiet / is-sikurezza**

L-espożizzjoni tal-persuni għall-fibri fl-arja għandha tkun imminimizzata u għandha tintuża vetrina li tkun mgħammra b'ventilatur għall-estrazzjoni jew kaxxa mgħammra bl-ingwanti sabiex isir kuntatt mal-fibri niexfa. Għandu jitwettaq monitoraġġ prejodiku tal-espożizzjoni tal-persuna sabiex tiġi determinata l-effikaċja tal-metodi ta' kontroll. Meta jisir kuntatt mal-MMMFs għandhom jintlibsu l-ingwanti li jintremew sabiex tonqos l-irritazzjoni tal-ġilda u tkun evitata l-kontaminazzjoni min-naħa għall-oħra.

1.5.2. **L-apparat / it-tagħmir**

— Pressa u dadi tal-mastri (b'kapaċità li jipproduċu 10 MPa).

— filtri kapillari tal-polikarbonat bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm (dijametru ta' 25 mm).

— filtru ta' membrana tal-ester taċ-ċelluloża bid-daqs tal-pori ta' 5 μm sabiex jintuża bħala filtru tal-appoġġ.

— Apparat tal-ħġieġ għall-filtrazzjoni (jew sistemi tal-filtrazzjoni li jintremew) li jieħu filtri li għandhom dijametru ta' 25 mm (eż. Millipore glass microanalysis kit, tat-tip nru XX10 025 00).

— Ilma li jkun għadu kemm ġie ddistallat, iffiltrat minn filtru bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm sabiex jitneħħew il-mikro-organiżmi.

— Pulverizzatur li jkopri d-deheb jew deheb u palladju.

— Scanning electron microscope li kapaċi jirrisolvi sa' 10 nm u jkabbar b'10 000.

— Mixxellanji: spatuli, xafra tal-iskarpell tat-tip 24, pinzetta, tubi tas-SEM, kolla tal-karbonju jew tejp adeżiv tal-karbonju, irbaba tal-fidda.

— Sonda ultrasonika jew banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank

— Core sampler jew cork borer, sabiex jieħu l-kampjuni tal-qalba mill-kutra tal-MMMF

1.5.3. **Il-Proċedura tat-test**

1.5.3.1. *It-teħid tal-kampjuni*

Jintuża core sampler ta' 25 mm jew cork borer sabiex jittieħdu kampjuni tal-profil trasversali. Dawn għandhom ikunu spazjati b'mod ekwu matul il-wisa' ta' tul qasir tal-kutra jew meħuda minn partijiet sporadiċi jekk ikun hemm biċċiet twal tal-kutra disponibbli. L-istess tagħmir jista' jintuża sabiex jiġu estratti kampjuni sporadiċi minn fibri maħlula. Meta huwa possibli għandhom jittieħdu sitt kampjuni, sabiex jirriflettu l-varjazzjonijiet tal-ispazju fil-materjal tal-massa.

Is-sitt kampjuni tal-qalba għandhom jitfarku b'dada li jkollha dijametru ta' 50 mm b'10 Mpa. Il-materjal jitħallat bi spatula u jerġa jiġi ppressat b'10 Mpa. Il-materjal imbagħad jitneħħa mid-dada u jinħażen fi flixkun tal-ħġieġ issiġillat.

1.5.3.2. *Il-Preparazzjoni tal-Kampjun*

Fejn jeħtieġ, tista' titneħħa il-kopertura organika li taqqad billi l-fibra titqiegħed ġo forn b'temperatura ta' 450 grad C għal madwar siegħa.

Sabiex ikun sottodiviż il-kampjun għandu jinqasam f'kon u fi kwarti (dan għandu jsir ġewwa vetrina tat-trab).

Bl-użu ta' spatula, żid ammont żgħir (< 0,5 g) tal-kampjun ma' 100 ml ilma li jkun għadu kemm ġie ddistillat u ffiltrat minn ġo filtru b'membrana ta' 0,2 μm (sorsi alternattivi ta' ilma purissimu jistgħu jintużaw, jekk jirriżulta li huma xierqa). Ħallat sew bl-użu ta' sonda ultrasonika li topera b'saħħa ta' 100 W u intunata sabiex tifforma ħofra fl-istruttura. (Jekk ma tkunx disponibbli sonda uża l-metodu li ġej: ċaqlaq l'hemm u l'hawn u dawwar repetittivament għal madwar 30 sekonda; qiegħdu f'banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank għal madwar ħames minuti; imbagħad ċaqalqu l'hemm u l'hawn u dawwru repetittivament għal madwar 30 sekonda oħra).

Eżatt wara t-tixrid tal-fibra, neħħi numru ta' alikwoto (eż. tliet alikwoti ta' 3, 6 u 10 ml) bl-użu ta' pipetta bl-għonq wiesa (li tesa' 2-5 ml).

Iffiltra f'vakum kull alikwota b'filtru tal-polikarbonat ta' 0,2 µm appoġġjat b'filtru tal-appoġġ li għandu pora MEC ta' 5 µm, bl-użu ta' lenbut tal-filtrazzjoni tal-ħġieġ ta' 25 mm li jkollu depożitu tal-likwidu ċilindriku. Fil-lenbut għandhom jitqegħdu madwar 5 ml ta' ilma distillat iffiltrat u l-alikwot titqiegħed bil-mod fl-ilma bl-użu tal-pipetta fejn il-ponta tagħha tinżamm taħt il-menisku. Il-pipetta u d-depożitu tal-likwidu iridu jiġu mlaħalħa sew wara dan il-proċess bil-pipetta, għaliex il-fibri irqaq għandhom tendenza li jkunu iżjed fil-wiċċ.

B'attenzjoni neħħi l-filtru u sseparah mill-filtru tal-appoġġ qabel ma' tqiegħdu f'kontenitur biex jinxef.

Aqta sezzjoni daqs ta' kwart jew nofs tad-depożitu ffiltrat b'xafra tal-iskarpell tat-tip 24 b'moviment 'l hinn u 'l hawn tal-id. B'attenzjoni waħħal is-sezzjoni maqtuha ma' trej tas-SEM permezz ta' tejp tal-karbonju jew kolla tal-karbonju. Għandhom jiġu applikati l-irbaba tal-fidda f'tal-inqas tliet pożizzjonijiet sabiex jittejjeb il-kuntatt eletriku fit-truf tal-filtru u tat-trej. Meta l-kolla / l-irbaba tal-fidda tinxef/jinxfu, bil-pulverizzatur agħmel kopertura ta' madwar 50 nm ta' deheb jew deheb u palladju fuq il-wiċċ tad-depożitu.

1.5.3.3. *Il-kalibrar tas-SEM u l-operat*

1.5.3.3.1. Il-kalibrar

Il-kalibrar tas-SEM għandu jkun ikkontrollat tal-inqas darba fil-ġimgħa (idealment darba kuljum) bl-użu ta' xibka tal-kalibrazzjoni ċċertifikata. Il-kalibrar għandu jkun ikkontrollat skont standard iċċertifikat u jekk il-valur mkejjel (SEM) ma jkunx f'medda ta' ± 2 % tal-valur iċċertifikat, il-kalibrar tas-SEM irid ikun aġġustat u jerġa jkun ikkontrollat.

Is-SEM irid ikun kapaċi jirrisolvi tal-inqas dijametru b'viżibbiltà minima ta' 0,2 µm, bl-użu ta' matriċi ta' kampjun reali, b'ingrandiment ta' x 2 000.

1.5.3.3.2. L-operat

Is-SEM għandu jkun operat fuq ingrandiment ta' 10 000 ([1]) bl-użu ta' kundizzjonijiet li jagħtu reżoluzzjoni tajba b'immaġini aċċetabbli b'rati baxxi ta' skan bħal, per eżempju, 5 sekondi għal kull ritratt. Għalkemm il-ħtiġijiet tal-operat ta' SEMs differenti jistgħu ivarjaw, ġeneralment sabiex tinkiseb l-aħjar viżibbiltà u reżoluzzjoni, b'materjali li relattivament għandhom daqs atomiku żgħir, għandhom jintużaw vultaġġi t'aċċelerazzjoni ta' bejn 5-10 keV issetjati fuq tikka ta' daqs żgħir u distanza tax-xogħol qasira. Meta jkun qiegħed isir it-travers lineari, għandha tintuża inklinazzjoni ta' 0° sabiex ikun minimizzat il-bżonn li terġa tiffoka jew, jekk is-SEM għandu stage ewċentrika, għandha tintuża l-istage ewċentrika Jista' jintuża ingrandiment iktar baxx jekk il-materjal m'għandux fibri (b'dijametru) żgħar u d-dijametri tal-fibri huma kbar (> 5 µm)

1.5.3.4. *Il-kejl tad-daqs*

1.5.3.4.1. Eżami taħt ingrandiment baxx sabiex ikun ivvalutat l-kampjun

Fil-bidu l-kampjun għandu jiġi eżaminat taħt ingrandiment baxx sabiex isir tfittix għal evidenza ta' tagħqid ta' fibri kbar u sabiex issir valutazzjoni tad-densità tal-fibri. Fil-każ ta' wisq għoqod huwa rrakomandat li jiġi ppreparat kampjun ġdid.

Huwa meħtieġ li jitkejjel numru minimu ta' fibri għall-korettezza fl-istatistika u d-densità għolja tal-fibri taf tkun mixtieqa għaliex l-eżaminazzjoni tal-partijiet vojta tieħu ħafna ħin u ma tagħtix kontribut għall-analiżi. Madankollu, jekk il-filtru ikun mimli wisq, isir diffiċli biex jitkejlu l-fibri kollha li jistgħu jiġu mkejla u, peress li li l-fibri ż-żgħar jistgħu jinħbew wara oħrajn li huma ikbar, tista' ma tindunax bihom.

Il-parzjalità lejn stima eċċessiva tal-LWGMD tista' tirriżulta minn fibri li għandhom densità ta' iktar minn 150 fibra f'kull millimetru tal-linja traversa. Minn naħa l-oħra, il-konċentrazzjonijiet tal-fibra baxxi jżidu l-ħin tal-analiżi u, spiss, finanzjarjament ikun jaqbel li jiġi ppreparat kampjun b'densità tal-fibra iżjed viċin l-ottimu milli tkompli bl-għadd ta' filtri li għandhom konċentrazzjoni baxxa. L-aħjar densità tal-fibra għandha tagħti medju ta' madwar fibra waħda jew tnejn f'kull firxa viżiva taħt ingrandiment ta' x 5 000. Minkejja dan, l-aħjar densità tiddependi fuq id-daqs (dijametru) tal-fibri, għalhekk jeħtieġ li l-operatur juża xi ġudizzju espert sabiex jiddeċidi jekk id-densità tal-fibra hijiex ottima jew le.

([1]) Għall-fibri tad-daqs 3 µm, ara n-nota ta' qabel.

1.5.3.4.2. L-ippeżar skont it-tul tad-dijametri tal-fibri

Jingħaddu biss dawk il-fibri li jmissu (jew jaqsmu) linja (infinitament) rqiqa mpinġija fuq l-iskrin tas-SEM. Għal din ir-raġuni titpinġa linja orizzontali (jew vertikali) fiċ-ċentru tal-iskrin.

Alternattivament jitqiegħed punt uniku fiċ-ċentru tal-iskrin u jiġi inizjat skan kontinwu f'direzzjoni waħda matul il-filtru. Kull fibra li għandha aspect ratio ikbar minn 3:1 li tmiss jew taqsam dan il-punt ikollha d-dijametru mkejjel u rreġistrat.

1.5.3.4.3. Il-kejl tad-daqs tal-fibra

Huwa rrakkomandat li jiġu mkejla minimu ta' 300 fibra. Kull fibra tiġi mkejla darba biss fil-punt tal-intersezzjoni mal-linja jew il-punt impinġi fuq l-immaġini (jew viċin tal-punt tal-intersezzjoni jekk it-truf tal-fibri huma moħbija). Jekk tiltaqa' ma' fibri li għandhom profil sezzjonali mhux uniformi, għandu jintuża kejl li jirrappreżenta l-medju tad-dijametru tal-fibra. Għandha tingħata attenzjoni għal kif jiġi definit it-tarf u kif tiġi mkejla l-iqsar distanza bejn it-truf tal-fibra. Il-kejl tad-daqs jista' jsir on-line, jew off-line fuq immaġini jew ritratti maħżuna. Huma rrakkomandati sistemi semi awtomatiċi li jkejlu l-immaġini li jniżżlu d-dejta direttament fuq spreadsheet, għaliex inaqqsu t-telf ta' ħin, jeliminaw l-iżbalji tat-traskrizzjoni u l-kalkoli jistgħu jiġu awtomatizzati.

It-truf tal-fibri twal għadhom ikunu kkontrollati taħt ingrandiment baxx sabiex tiżgura li mhux qed jinbarmu lura ġol-firxa viżiva u qed jiġu mkejla darba biss.

2. ID-DEJTA

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Normalment, iddijametri tal-fibri ma jkollhomx distribuzzjoni normali. Madankollu, permezz ta' trasformazzjoni logaritmika jkun possibbli li tikseb distribuzzjoni li toqrob aktarlejn in-normal.

Ikkalkula l-medju aritmetiku (medju lnD) u d-devjazzjoni standard (SD_{lnD}) tal-logaritmu ta' valuri tal-bażi e (lnD) tad-dijameteri (D) ta' n fibri..

$$\text{mean lnD} = \frac{\Sigma \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{lnD} - \text{mean lnD})^2}{n-1}} \qquad (2)$$

Iddividi d-devjazzjoni standard bir-radiċi kwadrata tan-numru (n) ta' kejl differenti sabiex tikseb id-devjazzjoni standard (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \qquad (3)$$

Naqqas għal darbtejn il-valur tad-devjazzjoni standard mill-medju u kkalkula l-esponenzjali ta' dan il-valur (il-medju bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard) sabiex toħroġ il-medju ġeometriku bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard ġeometriċi.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean lnD} - 2SE_{lnd})} \qquad (4)$$

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas it-tagħrif li ġej:

— Il-valur tal-LWGMD-2SE.

— Kwalunkwe devjazzjoni u b'mod partikolari dawk li jista' jkollhom effett fuq il-preċiżjoni jew il-korettezza tar-riżultati bil-ġustifikazzjonijiet xierqa.

4. **IR-REFERENZI**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

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

L-ANNESS III

B.46. **IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: TEST FUQ IL- MUDELL TAL-EPIDERMIDE UMANA KKOSTRUWITA MILL-ĠDID**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

L-irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-ħsara riversibbli li ssir lill-ġilda wara li tiġi applikata sustanza tat-test għal mhux iktar minn 4 sigħat [skont id-definizzjoni tas-Sistema Armonizzata Globali tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikkettar tal-Kimiki (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU)] (1). Dan il-Metodu ta' Ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* li, skont ir-rekwiżiti għat-tagħrif, tista' tiddetermina r-riskju ta' irritazzjoni tal-ġilda b'sustanzi bħala test uniku li jsir minflok testijiet oħra bħala parti minn strateġija ta' ttestjar, permezz ta' approċċ li jibbaża fuq l-evidenza (2).

L-evalwazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda involviet tipikament l-użu tal-annimali tal-laboratorju (Ara l-Metodu B.4)(3). F'dak li għandu x'jaqsam mal-benesseri tal-annimali, il-metodu B.4 jippermetti d-determinazzjoni ta' korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda billi japplika strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, bl-użu ta' metodi *in vitro* u *ex vivo* vvalidati, u b'hekk jevita l-annimali mill-uġigħ u mit-tbatija. Tliet Metodi ta' Ttestjar jew Linji Gwida ta' Ttestjar *in vitro* vvalidati, B.40, B.40bis u TG 435 (4, 5, 6), huma bżonnjużi biex tiġi ddeterminata l-korrużjoni permezz tal-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali tal-metodu B.4.

Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa msejjes fuq mudelli tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid, li fid-disinn ġenerali tagħhom (l-użu tal-keratinoċiti mnissla mill-epidermide umana bħala sors taċ-ċelluli, it-tessuti rappreżentattivi u ċ-ċitoarkitettura) jixxiebhu sew mal-karatteristiċi bijokimiki u fiżjoloġiċi tas-saffi tal-wiċċ tal-ġilda umana, jiġifieri l-epidermide. Il-proċedura deskritta f'dan il-Metodu ta' Ttestjar tippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi perikolużi li jikkawżaw irritazzjoni skont il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludi wkoll sett ta' standards ta' prestazzjoni għall-evalwazzjoni ta' metodi simili jew immodifikati ta' testijiet imsejsa fuq l-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid (7).

Saru studji fuq validazzjoni minn qabel, ottimizzazzjoni u validazzjoni għal żewġ metodi ta' ttestjar *in vitro* (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), liema studji huma disponibbli fuq livell kummerċjali bħall-EpiSkin™ u l-EpiDerm™, bl-użu ta' mudelli tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid. Dawn ir-referenzi kienu msejsa fuq l-R 38. Ċerti aspetti ta' kalkulazzjoni mill-ġdid għall-għanijiet tal-GHS huma indirizzati fir-referenza 25. Il-metodi bi prestazzjoni li hija ekwivalenti għall-EpiSkin™ (metodu ta' referenza vvalidat 1), huma rakkomandati bħala metodu ta' ttestjar uniku li jsir minflok it-test *in vivo* tal-fniek li jikklassifika s-sustanzi li jikkawżaw irritazzjoni u li jinsabu fil-kategorija 2 tal-GHS. Il-metodi bi prestazzjoni li hija ekwivalenti għall-EpiDerm™ (metodu ta' referenza vvalidat 2), huma rakkomandati biss bħala metodu ta' ttestjar analitiku, jew bħala parti minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali permezz ta' approċċ li jibbaża fuq l-evidenza, li jikklassifika s-sustanzi li jikkawżaw irritazzjoni u li jinsabu fil-kategorija 2 tal-GHS. Qabel ma jkun jista' jintuża mudell propost għall-ittestjar tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid għall-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'għanijiet regolatorji, għandhom ikunu ddeterminati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (l-eżattezza) tat-test, u l-limitazzjonijiet għall-użu tal-mudell propost sabiex ikun żgurat li t-test jista' jitqabbel ma' dak tal-metodu ta' referenza vvalidat 1, skont l-istandards ta' prestazzjoni stipulati f'dan il-Metodu ta' Ttestjar (Appendiċi).

Żewġ metodi oħra ta' ttestjar dwar l-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid, ġew ivvalidati skont ir-rekwiżiti fl-ambitu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, u juru l-istess riżultati bħall-metodu ta' referenza vvalidat 1. Dawn huma l-metodu ta' ttestjar EpiDerm™ immodifikat (il-metodu ta' referenza mmodifikat 2) u l-metodu ta' ttestjar SkinEthic RHE™ (simili għall-metodu 1).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-definizzjonijiet li ġejjin japplikaw għal dan il-Metodu ta' Ttestjar:

Eżattezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza għall-kontroll tal-lott: Sustanza bażika li fit-tessut tipproduċi rispons medju ta' vijabbiltà ċellulari.

Vijabbiltà ċellulari: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari eż. il-kapaċità tad-deidroġenażi mitokondrijali ċellulari sabiex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-il)-2,5-difeniltetrażolju bromur, Tijażolil blu;), li, skont l-effett imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrespondi mal-għadd totali u/jew mal-vitalità taċ-ċelluli ħajjin.

ET_{50}: Il-ħin ta' espożizzjoni li hu meħtieġ biex titnaqqas il-vijabbiltà taċ-ċelluli b'50 % meta tkun applikata s-sutanza li timmarka b'konċentrazzjoni speċifika u fissa, ara wkoll IC_{50}.

Rata ta' riżultati negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' riżultati pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha (mhux attivi) identifikati b'mod falz bħala pożittivi. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Doża infinita: L-ammont ta' sustanza applikata matul it-test fuq il-ġilda, li jaqbeż l-ammont meħtieġ sabiex il-wiċċ tal-ġilda titgħatta kompletament u b'mod uniformi.

GHS (Sistema Armonizzata Globali tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikkettar tal-Kimiki): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi u t-taħlitiet skont it-tipi u l-livelli standard ta' perikoli fiżiċi, sanitarji u l-ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, indikazzjonijiet ta' perikolu, avviżi ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti ħżiena bl-iskop li tipproteġi lin-nies (inkluż lil min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (1) u implimentata fl-UE bir-Regolament (KE) Nru 1272/2008.

IC_{50}: Il-konċentrazzjoni li biha s-sustanza li timmarka tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara l-ħin fiss ta' espożizzjoni, ara wkoll ET_{50}.

Standards ta' prestazzjoni: Standards, imsejsa fuq metodu ta' referenza vvalidat, li jipprovdu sisien għall-evalwazzjoni tat-tqabbil ma' metodu ta' ttestjar propost li għandu l-istess mekkaniżmi u l-istess funzjonijiet. Ikopru I) il-komponenti meħtieġa tal-metodu ta' ttestjar; II) lista minima ta' sustanzi ta' referenza magħżula minn fost is-sustanzi wżati sabiex juru l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' referenza vvalidat; u III) abbażi tar-riżultati miksuba għall-metodu ta' referenza vvalidat, il-livelli mqabbla ta' eżattezza u affidabbiltà għandhom jinkisbu għall-metodu ta' ttestjar propost bl-użu tal-lista minima tas-sustanzi ta' referenza.

Affidabbiltà: Miżuri li bihom metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, li jużaw l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkulata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorarji.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kollha attivi/pożittivi li huma kklassifikati tajjeb permezz tat-test. Din hija miżura ta' eżattezza għall-metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hija importanti li titqies fl-evalwazzjoni tar-rilevanza tal-metodu ta' ttestjar.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kollha mhux attivi/negattivi li huma kklassifikati tajjeb permezz tat-test. Din hija miżura ta' eżattezza għall-metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi u hija importanti li titqies fl-evalwazzjoni tar-rilevanza tal-metodu ta' ttestjar.

Irritazzjoni tal-ġilda: Il-produzzjoni ta' ħsara reparabbli fuq il-ġilda wara li tiġi applikata sustanza tat-test sa 4 sigħat. Irritazzjoni tal-ġilda hija reazzjoni mhux immunoġenika f'parti tal-ġisem, li titfaċċa wara ftit żmien mill-istimulazzjoni (24). Hija kkaratterizzata prinċiparjament minn proċess riversibbli li jinvolvi reazzjonijiet infjammatorji u ħafna mis-sinjali karatteristiċi kliniċi tal-irritazzjoni (eritema (ħmura), edema (nefħa), ħakk u uġigħ) relatati mal-proċess ta' infjammazzjoni.

1.3. L-AMBITU U L-LIMITAZZJONIJIET

Waħda mil-limitazzjoni tat-testijiet fuq il-mudelli ta' epidermide umana kkostruwita mill-ġdid li jaqgħu fl-ambitu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar hija l-fatt li huma jikklassifikaw biss sustanzi bħal dawk li jikkawżaw irritazzjoni tal-ġilda skont il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU. Minħabba li ma jippermettux klassifikazzjoni ta' sustanzi fil-kategorija mhux obbligatorja 3 kif definita fil-GHS tan-NU, il-bqija tas-sustanzi ma jiġux ikklassifikati (mingħajr kategorija). Minħabba l-bżonnijiet regolatorji u l-inklużjoni possibbli, fil-ġejjieni, ta' kriterji ġodda, titjib jew żvilupp ta' testijiet analogi ġodda, jista' jkun li dan il-Metodu ta' Ttestjar ikollu jiġi rivedut.

Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi mono-kostiwenti li jikkawżaw irritazzjoni (19), imma ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda. Ma jistgħux isiru testijiet fuq gassijiet u sprej, filwaqt li għadhom ma ġewx ivvalutati taħlitiet fi studju ta' validazzjoni.

1.4. PRINĊIPJU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi applikata topikament fuq mudell tridimensjonali tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid, magħmul minn keratinoċiti normali u mnissla mill-epidermide umana, li huma kkultivati sabiex jiffurmaw mudell differenzjat sew b'saffi multipli tal-epidermide umana. Huwa magħmul minn saffi bażali, spinużi u granulari organizzati, u minn stratum corneum b'saffi multipli fosthom saffi lipidi lamellari interċellulari rranġati f'suriet li jixbhu lil dawk *in vivo*.

Il-prinċipju ta' ttestjar fuq il-mudell tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid huwa msejjes fuq il-premessa li s-sutanzi li jikkawżaw irritazzjoni jistgħu jinfdu l-istratum corneum permezz tad-diffużjoni u huma ċijotossiċi għaċ-ċelluli li jinsabu fis-saffi ta' taħt. Il-vijabbiltà titkejjel billi ssir konverżjoni tas-sustanza koloranti vitali MTT [3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-yl)-2,5-difeniltetrażolju bromuri, Tijażolil blu;) permezz tad-deidroġenażi; in-numru tal-EINECS, in-numru CAS 298-93-1)], f'melħ formażan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (20). Is-sustanzi li jikkawżaw irritazzjoni jiġu identifikati mill-kapaċità tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà ċellulari għal livelli aktar baxxi mil-livelli tal-limitu (*jiġifieri* ≤ 50 %, għall-kategorija 2 ta' irritanti skont il-GHS tan-NU). Is-sustanzi li jipproduċu vijabbiltajiet ċellulari ogħla mil-livell tal-limitu, ma jiġux ikklassifikati (jiġifieri > 50 %, mingħajr kategorija).

Is-sistemi ta' ttestjar fuq il-mudell tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid jistgħu jintużaw sabiex ikunu ttestjati solidi, likwidi, semi-solidi u kwalunkwe xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux jinħallu fl-ilma. Fejn huwa possibbli, is-solidi għandhom ikunu ttestjati f'għamla ta' trab fin. Minħabba li 58 sustanza magħżula bir-reqqa, li jirrappreżentaw firxa wiesgħa ta' klassijiet ta' kimiki, kienu inklużi fil-validazzjoni tas-sistemi ta' ittestjar fuq il-mudelli tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid, il-metodi huma mistennija li jkunu applikabbli b'mod ġenerali għall-klassijiet tal-kimiki kollha (16). Il-validazzjoni tinkludi 13-il irritant tat-Kat. 2 tal-GHS. Għandu jiġi nnutat li aċidi mhux korrużivi, bażijiet, imluħa u sustanzi oħra li mhumiex organiċi ma kinux inklużi fil-validazzjoni u f'xi klassijiet magħrufa tal-irritanti organiċi bħalma huma l-idroperossidu, il-fenols u s-surfrattanti ma kinux inklużi sa ċertu punt.

1.5. WIRI TA' PROFIĊJENZA

Qabel ma jużaw b'mod sistematiku xi metodu vvalidat li jkun konformi ma' dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-laboratorji jistgħu juru x-xewqa li juru l-profiċjenza teknika tagħhom, billi jużaw l-għaxar sustanzi rrakkomandati fit-Tabella 1. Fl-ambitu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-kategorija mhux obbligatorja 3 tal-GHS tan-NU titqies daqs li kieku mhijiex kategorija. Għal metodi ta' ttestjar ġodda simili (analogi) żviluppati fl-ambitu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar li għandhom l-istess strutturi u funzjonijiet bħall-metodi ta' referenza vvalidati jew għal modifikazzjonijiet ta' metodi vvalidati, l-istandards tal-prestazzjoni deskritti fl-Appendiċi ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar għandhom jintużaw sabiex, qabel ma jibda jintuża fl-ittestjar regolatorju, jintwera li l-affidabbiltà u l-eżattezza tal-metodu ta' ttestjar ġdid jinsabu f'livelli li jistgħu jitqabblu.

Tabella 1

Sustanzi ta' profiċjenza li jinsabu f'sottogrupp tas-Sustanzi ta' Referenza elenkati fl-Appendiċi

Sustanza	Numru CAS	Riżultat *in vivo*	Stat fiżiku	Kategorija tal-GHS
aċidu aċetiku tan-naftalina	86-87-3	0	S	L-ebda kat.
iżopropanol	67-63-0	0.3	L	L-ebda kat.
stereat tal-metil	112-61-8	1	S	L-ebda kat.
butirat tal-eptil	5870-93-9	1.7	L	Kat. mhix obbligatorja 3
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	2	L	Kat. mhix obbligatorja 3
aldeide ċiklamenika	103-95-7	2.3	L	Kat. 2
1-bromożean	111-25-1	2.7	L	Kat. 2
metakrilat tal-butil	97-88-1	3	L	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	3.3	S	Kat. 2
Eptanal	111-71-7	4	L	Kat. 2

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ta' ttestjar fuq il-mudell tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid li tevalwa l-irritazzjoni tal-ġilda. Mudell tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid jista' jinbena, jitħejja jew jinkiseb fuq livell kummerċjali (*eż.*, EpiSkin™, EpiDerm™ u SkinEthic RHE™). Protokolli standard għall-metodi ta' ttestjar għall-EpiSkin™, l-EpiDerm™ u l-IskinEthic RHE™ jistgħu jinkisbu mis-sit [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu](21, 22, 23). L-ittestjar għandu jsir skont dan li ġej:

1.6.1. **Il-Komponenti tal-Mudell tal-Epidermide Umana Kkostruwita mill-Ġdid**

1.6.1.1. *Kundizzjonijiet ġenerali tal-mudell*

Għandhom jintużaw keratinoċiti normali umani sabiex ikun iffurmat l-epitelju. Taħt stratum corneum funzjonali għandu jkun hemm saffi multipli ta' ċelluli epiteljali vijabbli (saff bażali, stratum spinosum, stratum granulosum). L-istratum corneum għandu jkun fih saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu meħtieġ sabiex jipproduċi barriera funzjonali b'saħħitha sabiex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi ċitotossiċi li jimmarkaw, *eż.*, sulfat dodeċil tas-sodju (SDS) jew it-Triton X-100. Il-funzjoni tal-barriera tista' tkun evalwata jew billi tiġi determinata l-konċentrazzjoni li biha s-sustanza li timmarka tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin fiss ta' espożizzjoni, jew billi jiġi determinat il-ħin fiss meħtieġ ta' espożizzjoni sabiex titnaqqas il-vijabbiltà ċellulari b'50 % (ET_{50}) minn meta tiġi applikata s-ssutanza li timmarka b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-mudell għandu jkollu karatteristiċi għat-trażżin li jevitaw li l-materjal jgħaddi madwar l-istratum corneum lejn it-tessuti vijabbli, li jista' jwassal għall-mudell ta' kwalità ħażina tal-espożizzjoni tal-ġilda. Il-mudell tal-ġilda ma għandux ikun ikkontaminat b'batterji, vajrus, mikoplażma, jew fungi.

1.6.1.2. *Kundizzjonijiet funzjonali tal-mudell*

1.6.1.2.1. Vijabbiltà

L-analiżi preferita sabiex tkun iddeterminata l-importanza tal-vijabbiltà hija l-MTT (20). Id-densità ottika (OD) tas-sustanza koloranti li toħroġ (imdewba) mit-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv (NC) għandha tkun għallinqas 20 darba ikbar mill-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħdu. Għandu jkun dokumentat il-fatt li t-tessuti ttrattati permezz tal-NC huma stabbli meta jiġu kkultivati (ipprovdi kejl simili ta' vijabbiltà) għall-perjodu ta' espożizzjoni għat-test.

1.6.1.2.2. Il-funzjoni ta' barriera

L-istratum corneum u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed sabiex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi li jimmarkaw ċitotossiċi, *eż.*, is-SDS jew it-Triton X-100, kif stmata permezz tal-IC_{50} jew l-ET_{50}.

1.6.1.2.3. Morfoloġija

Għandha ssir eżaminazzjoni istoloġika tal-ġilda/epidermide kkostruwita mill-ġdid minn persunal bi kwalifiki xierqa li juri l-istruttura tal-ġilda/li tixbah lill-epidermide umana (inkluż l-istratum corneum li fih saffi multipli).

1.6.1.2.4. Riproduċibbiltà

Ir-riproduċibbiltà fir-riżultati tal-metodu li juża mudell speċifiku għandha tintwera għal tul ta' żmien, preferibbilment permezz ta' sustanza xierqa għall-kontroll tal-lott (punt ta' referenza) (ara l-Appendiċi).

1.6.1.2.5. Kontrolli tal-Kwalità (QC) tal-mudell

Kull lott ta' mudell epidermali użat għandu jilħaq kriterji definiti għar-rilaxx tal-produzzjoni, fosthom għall-vijabbiltà (il-paragrafu 1.6.1.2.1) u għall-funzjoni tal-barriera (il-paragrafu 1.6.1.2.2) huma l-iktar rilevanti. Firxa aċċettabbli ta' valuri (il-limitu ta' fuq u ta' taħt) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandha tiġi stabbilita mill-fornitur tal-mudell tal-ġilda (jew mill-investigatur li juża mudell "tal-post"). Il-karatteristiċi li jservu ta' barriera tat-tessuti għandhom ikunu vverifikati mil-laboratorju wara li jaslulu t-tessuti. Ir-riżultati prodotti minn testijiet tat-tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati sabiex jitbassru b'mod affidabbli l-effetti li jikkawżaw irritazzjoni. Bħala eżempju, il-firxiet ta' valuri aċċettabbli għall-metodi ta' referenza vvalidati huma mogħtija hawn taħt.

Tabella 2

Eżempji ta' kriterji tal-QC għar-rilaxx tal-lottijiet

	Il-limitu baxx ta' aċċettazzjoni	Il-firxa medja tal-valuri aċċettabbli	Il-limitu għoli ta' aċċettazzjoni
Metodu ta' referenza vvalidat 1 (18-il siegħa ta' trattament permezz tas-SDS)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Metodu ta' referenza vvalidat 2 (1 % tat-Triton X100)	ET_{50} = 4,8 hr	ET_{50} = 6,7 hr	ET_{50} = 8,7 hr

1.6.1.3. *Applikazzjoni tas-Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll*

Għal kull trattament kif ukoll għall-kontrolli għandu jintuża għadd biżżejjed ta' repliki ta' tessuti (għall-anqas tliet repliki kull darba). Għal likwidi kif ukoll għal sustanzi solidi, għandha tiġi applikata kwantità biżżejjed ta' sustanza tat-test sabiex jitgħatta l-wiċċ tal-ġilda b'mod uniformi mingħajr ma tintuża doża infinita (ara d-Definizzjonijiet taħt il-punt 1.2), jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 25 μL/cm^2 jew 25 mg/cm^2. Għal sustanzi solidi, il-wiċċ tal-epidermide għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel ma jiġu applikati s-sustanzi, sabiex ikun żgurat kuntatt tajjeb mal-ġilda. Fejn huwa possibbli, is-solidi għandhom ikunu ttestjati f'għamla ta' trab fin. Fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni, il-wiċċ tal-ġilda għandu jitnaddaf sew u b'reqqa permezz ta' li jinħall f'soluzzjoni ta' ilma jew b'0.9 % NaCl. Skont il-mudell użat tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid, il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jvarja minn kwarta sa siegħa, u t-temperatura tal-inkubatur minn 20 sa 37 °C. Għal aktar dettalji, ara l-Proċeduri Standard għall-Operat għat-tliet metodi (21, 22, 23).

F'kull studju għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pożittivi (PC) simultanjament sabiex jintwera li l-vijabbiltà (NC), il-funzjoni ta' barriera u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (PC) jinsabu f'firxa ta' aċċettazzjoni ddefinita minn qabel. Is-sustanza PC ssuġġerita hija taħlita milwiema b'5 % SDS bil-5 %. Is-sustanzi NC suġġeriti huma l-ilma jew taħlita likwida salina ta' fosfat (PBS).

1.6.1.4. *Kejl tal-Vitalità Ċellularii*

L-iktar element importanti tal-proċedura tat-test hija li l-vijabbiltà ma titkejjilx minnufih wara l-esponiment għassustanzi tal-ittestjar, imma wara perjodu ta' inkubazzjoni tat-tessuti mlaħalħin f'sustanza friska għal perjodu biżżejjed ta' ħin wara li jsir it-trattament. Dan il-perjodu jagħti lok għal irkupru minn effetti irritanti dgħajfa u biex jitfaċċaw effetti ċitotossiċi ċari. Waqt il-fażi ta' ottimizzazzjoni tat-test (9, 10, 11, 12, 13), deher li l-aħjar perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament kien ta' 42 siegħa u għalhekk intuża għall-validazzjoni tal-metodi ta' ttestjar ta' referenza.

L-analiżi ta' konverżjoni tal-MTT hija metodu kwantitattiv ivvalidat li għandu jintuża sabiex titkejjel il-vijabbiltà ċellulari. Hija kompatibbli mal-użu ta' mudell ta' tessuti tridimensjonali. Il-kampjun tal-ġilda jitpoġġa f'taħlita ta' MTT ta' konċentrazzjoni xierqa (*eż.*, 0.3-1 mg/mL) għal 3 sigħat. Il-prodott preċipitat formażan blu huwa estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (*e.g.*, iżopropanol, iżopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażon titkejjel billi jiġi ddeterminat l-OD f'570 nm permezz ta' filter (bandpass) sa massimu ta' ± 30 nm.

Il-karatteristiċi ottiċi tas-sustanza tat-test jew kif taġixxi l-kimika ta' din is-sustanza fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-analiżi li tirriżulta fi stima ħażina tal-vijabbiltà (minħabba li s-sustanza tat-test tista' timpedixxi jew tinverti l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll tikkawżaha). Dan jista' jseħħ meta l-ġilda ma tkunx tlaħalħet u tnaddfet sew missustanza speċifika tat-test jew f'każ li s-sustanza tkun ippenetrat l-epidermide. F'każ li s-sustanza tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT, ikollha kulur naturali, jew tieħu kulur waqt it-trattament tat-tessuti, għandhom jintużaw kontrolli oħra sabiex jidentifikaw u jikkoreġu l-interferenza tas-sustanza tat-test mat-teknika użata biex titkejjel il-vijabbiltà. Għal deskrizzjoni dettaljata ta' kif it-tnaqqis dirett tal-MTT jiġi ttestjat, jekk jogħġbok ikkonsulta l-protokoll tal-metodu ta' ttestjar għall-metodi ta' referenza vvalidati (21, 22, 23). Il-kulur mhux speċifikat (NSC) dovut għal dawn l-interferenzi ma għandux ikun ogħla minn 30 % tal-NC (għall-korrezzjonijiet). F'każ li l-NSC ikun > 30 %, is-sustanza tat-test titqies bħala inkompatibbli mat-test.

1.6.1.5. *Kriterji ta' Valuri Aċċettabbli tal-Analiżi*

Għal kull analiżi li tuża lottijiet validi (ara l-paragrafi 1.6.1.2.5), it-tessuti li jiġu ttrattati bl-NC għandhom juru OD li jirrifletti l-kwalità tat-tessuti li jkunu segwew l-istadji kollha tat-trasport u l-waslien u l-proċess kollu talprotokoll tal-irritazjoni. Il-valuri tal-kontroll OD ma għandhomx ikunu inqas mil-livelli baxxi rreġistrati f'testijiet preċedenti. Bl-istess mod, it-tessuti ttrattati bil-PC, jiġifieri, taħlita milwiema b'5 % SDS, għandhom jirriflettu s-sensittività li jżommu dawn it-tessuti u l-ħila tagħhom li jirreaġixxu għal sustanza li tikkawża irritazzjoni filkundizzjonijiet ta' kull analiżi individwali (eż., vijabbiltà ta' ≤ 40 % għall-metodu vvalidat ta' referenza 1, u ≤ 20 % għall-metodu ta' referenza vvalidat 2). Għandhom ikunu definiti miżuri assoċjati u xierqa ta' vijabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti (eż. jekk jintużaw id-devjazzjonijiet standard għandhom ikunu 18 %).

2. DEJTA

2.1. DEJTA

Għal kull trattament, id-dejta li tinġabar minn kampjuni ta' testijiet individwali replikati (*eż.*, valuri OD u dejta miġbura dwar il-vijabbiltà ċellulari kkalkulata bil-perċentwal għal kull sustanza ttestjata, li tinkludi l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rreġistrata f'forma ta' tabella, li tinkludi dejta miġbura minn esperimenti ripetuti kif xieraq. Fi kliem ieħor għandha tkun rrappurtata devjazzjoni mill-medja ± standard għal kull darba li jsir it-test. Għandhom jiġu rrappurtati l-interazzjonijiet mar-reaġent MTT u s-sustanzi kkuluriti tat-test li jkunu ġew osservati għall kull sustanza li tiġi ttestjata.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-valuri tal-OD miksuba għal kull kampjun tat-test jistgħu jintużaw sabiex jiġi kkalkulat il-perċentwal tal-vijabbiltà mqabbel mal-NC, li huwa ssettjat 100 %. Il-valur limitat (cut-off value) tal-perċentwal tal-vijabbiltà ċellulari li jiddistingwi irritanti minn sustanzi ta' testijiet li mhumiex ikklassifikati u l-proċedura(i) statistika użati sabiex ikunu evalwati r-riżultati u jkunu identifikati sustanzi li jikkawżaw irritazzjoni, għandhom ikunu definiti b'mod ċar u ddokumentati, u ppruvati b'mod xieraq. Il-valuri limitati li jintużaw għat-tbassir tal-irritazzjoni assoċjata mal-metodi ta' referenza vvalidati huma mogħtija hawn taħt:

Is-sustanza tat-test titqies irritanti għall-ġilda skont il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU:

i) jekk il-vijabbiltà tat-tessuti wara l-espożizzjoni u l-inkubazzjoni li ssir wara t-trattament tkun inqas jew daqs 50 %.

Is-sustanza tat-test titqies li ma taqa' taħt l-ebda kategorija:

i) jekk il-vijabbiltà tat-tessuti wara l-espożizzjoni u t-trattament li jsir wara fl-inkubatur hija iktar minn (>) 50 %.

3. **RAPPURTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanzi użati għall-Ittestjar u għall-Ikkontrollar

— l-isem(ismijiet) tal-kimika(i) bħall-IUPAC jew l-isem u n-numru tal-CAS, jekk ikun magħruf;

— il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza (f'perċentwal(i) skont il-piż);

— il-karatteristiċi fiżiċi tal-kimika li huma rilevanti ma' kif isir l-istudju (eż. l-istat fiżiku, l-istabbiltà u l-volatilità, il-pH, is-solubbiltà fl-ilma jekk ikunu magħrufa);

— it-trattamenti tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel ma jkunu ttestjati, jekk applikabbli (*eż.*, it-tisħin, it-tħin);

— kundizzjonijiet tal-ħżin.

Ġustifikazzjoni tal-mudell tal-ġilda u l-protokoll użati.

Kundizzjonijiet tat-Test:

— l-użu tas-sistema taċ-ċelluli;

— l-informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-istrument tal-kejl, u l-filter (bandpass) użati biex titkejjel il-vijabbiltà ċellulari (*eż.*, l-ispektrofotometru);

— l-informazzjoni sħiħa ta' sostenn għall-mudell speċifiku tal-ġilda użata inkluż il-prestazzjoni tiegħu. Din għandha tinkludi, iżda mhijiex limitata għal:

    i) Vijabbiltà;

    ii) Funzjoni ta' barriera;

    iii) Morfoloġija;

    iv) Riproduċibbiltà u tbassir;

    v) Kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;

— dettalji dwar il-proċedura tat-test użata;

— id-dożi użati għat-test, kemm jieħdu ħin l-espożizzjoni u l-perjodu tal-inkubazzjoni li ssir wara t-trattament;

— deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifikazzjoni tal-proċedura tat-test;

— referenza għad-dejta tal-passat tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda mhijiex limitata għal:

i) aċċettazzjoni tad-dejta dwar il-QC b'referenza għad-dejta tal-passat tal-lott;

ii) aċċettazzjoni tal-valuri ta' kontrolli pożittivi u negattivi b'referenza għall-mezzi ta' kontrolli u firxiet pożittivi u negattivi;

— deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati li jinkludu l-ġustifikazzjoni tal-għażla tal-punt(i) limitati għall-mudell li jintuża għat-tbassir.

Riżultati:

— tabella bid-dejta mill-kampjuni tat-testijiet individwali;

— deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

4. REFERENZI

1. United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Disponibbli fuq is-sit: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.

2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Disponibbli fuq: http://reach.jrc.it/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1229429018.

3. Il-Metodu tat-Test B0.4. TOSSIĊITÀ AKUTA; IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

4. Il-Metodu tat-Test B.40. KORRUŻJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: TEST TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANEA (TER — Transcutaneous Electrical Resistance).

5. Il-Metodu tat-Test B.40 BIS. KORRUŻJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: TEST FUQ IL-MUDELL TAL-ĠILDA UMANA

6. OECD (2006). Linja Gwida 435.. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Adottat fid-19 ta' Lulju 2006. Disponibbli fuq is-sit: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.

7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Disponibbli fid-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 15, 57-93.

9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology *in Vitro* 16, 765-770.

10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. ALTEX 21, 107-114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests — An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351-367.

12. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329-249.

13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation.. ATLA 30,109-129.

14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. 135 pp. + annexes. Disponibbli fid-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy -Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.

18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays tal-5 ta' Novembru 2008.

19. EC (2006). Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Reġistrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni *Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea* L396/1 tat-30.12.2006. OPOCE, Luxembourg.

20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test — 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Disponibbli fid-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Disponibbli fid-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

23. SkinEthic RHE™ SOP. Għandu jkun disponibbli taħt id-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

24. Harvell, J.D., Lamminstausta, K, Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, pp 7-18

25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, it-13 ta' Novembru, 2008.

Appendiċi

Valutazzjoni tal-karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-mudelli proposti tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid għall-irritazzjoni tal-ġilda in vitro

DAĦLA

Il-proċeduri li huma proposti għall-użu taħt dan il-Metodu ta' Ttestjar għandhom ikunu evalwati sabiex jiddeterminaw kemm huma affidabbli u eżatti meta jintużaw sustanzi li jirrappreżentaw il-firxa tar-riżultati kollha li ħarġu mit-testijiet dwar l-irritazzjoni li saru minn Draize. Meta dawn jiġu evalwati permezz tal-użu tal-20 sustanza ta' referenza rrakkomandati (it-Tabella 2), il-proċeduri proposti ta' ttestjar għandhom ikollhom valuri ta' affidabbiltà u eżattezza li jkunu jistgħu jitqabblu ma' dawk tal-metodu ta' referenza vvalidat 1 (it-Tabella 3) (1). L-istandards tal-eżattezza u l-affidabbiltà li għandhom jinkisbu huma pprovduti taħt il-punti II u III hawn taħt. Sustanzi li huma u li mhumiex ikklassifikati (il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU), li jirrappreżentaw klassijiet rilevanti tal-kimiki huma inklużi, sabiex il-valuri tal-affidabbiltà u l-valuri tal-prestazzjoni (is-sensittività, l-ispeċifiċità, ir-rati negattivi foloz, u r-rati pożittivi foloz u l-eżattezza) tal-metodu propost ta' ttestjar ikunu jistgħu jitqabblu ma' dawk il-valuri attribwiti lill-metodu ta' referenza vvalidat 1. L-affidabbiltà tal-metodu ta' ttestjar, kif ukoll il-kapaċità tat-test li jidentifika b'mod tajjeb is-sustanzi li jikkawżaw irritazzjoni li jinsabu fil-kategorija 2 tal-GHS tan-NU, għandhom ikunu ddeterminati qabel ma l-metodu jibda jintuża għall-ittestjar ta' sustanzi ġodda.

STANDARDS TA' PRESTAZZJONI

L-Istandards tal-Prestazzjoni jkopru t-tliet elementi li ġejjin I) Il-Komponenti Meħtieġa għall-Metodu ta' Ttestjar, II) Is-Sustanzi ta' Referenza u III) Il-Valuri Definiti tal-Eżattezza u tal-Affidabbiltà (2). Dawn l-Istandards ta' Prestazzjoni huma msejsa fuq l-Istandards ta' Prestazzjoni definiti wara t-tlestija tal-istudju tal-validazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda mill-ECVAM (3).

1) **Komponenti Meħtieġa għall-Metodu ta' Ttestjar**

Kundizzjonijiet ġenerali tal-mudell

Għandhom jintużaw keratinoċiti normali umani sabiex ikun iffurmat l-epitelju. Taħt stratum corneum funzjonali għandu jkun hemm saffi multipli ta' ċelluli epiteljali vijabbli (saff bażali, stratum spinosum, stratum granulosum). L-Istratum corneum għandu jkun fih ħafna saffi li jkun fihom profil lipidu li huwa bżonnjuż sabiex jipproduċi barriera li tiffunzjona b'saħħitha sabiex tirreżisti penetrazzjoni li ssir malajr tas-sustanzi ċitotossiċi li jimmarkaw, *eż.*, l-SDS jew it-Triton X-100. Il-funzjoni tal-barriera tista' tkun evalwata jew billi tiġi determinata l-konċentrazzjoni li biha s-sustanza li timmarka tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin fiss ta' espożizzjoni, jew billi jiġi determinat il-ħin fiss ta' espożizzjoni meħtieġ sabiex titnaqqas il-vijabbiltà ċellulari b'50 % (ET_{50}) minn meta tiġi applikata s-sustanza li timmarka b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-mudell għandu jkollu karatteristiċi għat-trażżin li jevitaw li l-materjal jgħaddi madwar l-istratum corneum lejn it-tessuti vijabbli, li jista' jwassal għall-mudell ta' kwalità ħażina tal-espożizzjoni tal-ġilda. Il-mudell tal-ġilda ma għandux ikun ikkontaminat b'batterji, vajrus, mikoplażma, jew fungi.

Kundizzjonijiet funzjonali tal-mudell

Vijabbiltà

L-analiżi preferita sabiex tkun iddeterminata l-importanza tal-vijabbiltà hija l-MTT (4). L-OD taż-żebgħa (imdewba) li toħroġ mit-tessuti trattati bl-NC għandu jkun għall-anqas 20 darba ikbar mill-OD tal-estrazzjoni li ddub waħidha. Għandu jkun dokumentat il-fatt li t-tessuti ttrattati permezz tal-NC huma stabbli meta jiġu kkultivati (ipprovdi kejl simili ta' vijabbiltà) għall-perjodu ta' espożizzjoni għat-test.

Il-funzjoni ta' barriera

L-istratum corneum u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed sabiex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi li jimmarkaw ċitotossiċi, *eż.*, is-SDS jew it-Triton X-100, kif stmata permezz tal-IC_{50} jew l-ET_{50}.

Morfoloġija

Għandha ssir eżaminazzjoni istoloġika tal-ġilda/epidermide kkostruwita mill-ġdid minn persunal bi kwalifiki xierqa li juri l-istruttura tal-ġilda/li tixbah lill-epidermide umana (inkluż l-istratum corneum li fih saffi multipli).

Riproduċibbiltà

Ir-riproduċibbiltà fir-riżultati tal-metodu li juża mudell speċifiku għandha tintwera għal tul ta' żmien, preferibbilment permezz ta' sustanza xierqa għall-kontroll tal-lott (punt ta' referenza) (ara d-definizzjonijiet fil-punt 1.2).

Kontrolli tal-Kwalità (QC) tal-mudell

Kull lott ta' mudell epidermali użat għandu jilħaq kriterji definiti għar-rilaxx tal-produzzjoni, fosthom għall-vijabbiltà (il-paragrafu 1.6.1.2.1) u għall-funzjoni tal-barriera (il-paragrafu 1.6.1.2.2) huma l-iktar rilevanti. Firxa aċċettabbli ta' valuri (il-limitu ta' fuq u ta' taħt) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandha tiġi stabbilita mill-fornitur tal-mudell tal-ġilda (jew mill-investigatur li juża mudell "tal-post"). Il-karatteristiċi li jservu ta' barriera tat-tessuti għandhom ikunu vverifikati mill-laboratorju wara li jaslulu t-tessuti. Ir-riżultati prodotti minn testijiet tat-tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati sabiex jitbassru b'mod affidabbli l-effetti li jikkawżaw irritazzjoni. Bħala eżempju, il-firxiet ta' valuri aċċettabbli għall-metodi ta' referenza vvalidati huma mogħtija hawn taħt.

Tabella 1

Eżempji ta' kriterji tal-QC għar-rilaxx tal-lottijiet

	Il-limitu baxx ta' aċċettazzjoni	Il-firxa medja ta' aċċettazzjoni	limitu għoli ta' aċċettazzjoni
Metodu ta' referenza vvalidat 1 (18-il siegħa ta' trattament permezz tas-SDS)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Metodu ta' referenza vvalidat 2 (1 % tat-Triton X100)	ET_{50} = 4,8 hr	ET_{50} = 6,7 hr	ET_{50} = 8,7 hr

II) **Sustanzi ta' Referenza**

Is-sustanzi ta' referenza jintużaw sabiex ikun iddeterminat jekk l-affidabbiltà u l-eżattezza tal-mudell ġdid propost tal-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid *in vitro*, li huwa ppruvat li għandu struttura u funzjoni simili biżżejjed għal dawk li nsibu fil-metodi ta' referenza vvalidati, jew li jirrappreżenta modifikazzjoni żgħira fil-metodu ta' referenza vvalidat, jindika prestazzjoni li tista' titqabbel ma' dik li jagħti l-metodu ta' referenza vvalidat 1 (1). L-20 sustanza ta' referenza elenkati fit-Tabella 2 jinkludu sustanzi li jirrappreżentaw klassijiet ta' kimiki differenti ta' interess, kif ukoll sustanzi fil-kategorija 2 tal-GHS tan-NU. Is-sustanzi inklużi f'din il-lista jkopru 10 sustanzi minn fost il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU, 3 sustanzi mill-kategorija 3 mhux obbligatorja tal-GHS tan-NU u 7 sustanzi li ma għandhomx kategorija. Skont dan il-Metodu ta' Testtjar, il-kategorija 3 mhux obbligatorja tal-GHS tan-NU ma titqiesx bħala kategorija. Dawn is-sustanzi ta' referenza jirrappreżentaw l-għadd minimu ta' sustanzi li għandhom jintużaw sabiex ikunu evalwati l-eżattezza u l-affidabbiltà tal-metodu ta' ttesjtar propost fuq l-epidermide umana kkostruwita mill-ġdid għall-irritazzjoni tal-ġilda. F'sitwazzjonijiet fejn sustanza elenkata ma tkunx disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi oħra li dwarhom hemm dejta ta' referenza *in vivo* xierqa u disponibbli. Jekk ikun mixtieq, sustanzi oħrajn jistgħu jiġu miżjuda mal-lista minima ta' sustanzi ta' referenza li jirrappreżentaw klassijiet ta' sustanzi oħra li dwarhom hemm dejta ta' referenza *in vivo* xierqa u disponibbli sabiex tiġi evalwata l-eżattezza tal-metodu tat-test propost.

Tabella 2

Sustanzi ta' Referenza li Jiddeterminaw il-Valuri tal-Eżattezza u l-Affidabbiltà ta' Mudelli tal-Epidermide Umana Kkostruwita mill-Ġdid għall-Irritazzjoni tal-Ġilda

Sustanza (*)	Nru tal-CAS	Nru tal-INECS	Stat fiżiku	Riżultat *in vivo*	GHS Kat. tal-GHS *in vitro*	GHS Kat. tal-GHS *in vitro*
1-bromur-4-klorobutanu	6940-78-9	230-089-3	L	0	Kat. 2	L-ebda kat.
dijetil ftalat	84-66-2	201-550-6	L	0	L-ebda kat.	L-ebda kat.
aċidu aċetiku tan-naftalina	86-87-3	201-705-8	S	0	L-ebda kat.	L-ebda kat.
fenossiaċetat tal-allil	7493-74-5	231-335-2	L	0,3	L-ebda kat.	L-ebda kat.
Isopropanol	67-63-0	200-661-7	L	0,3	L-ebda kat.	L-ebda kat.
4-metil-tio-benżaldeide	3446-89-7	222-365-7	L	1	Kat. 2	L-ebda kat.
stereat tal-metil	112-61-8	203-990-4	S	1	L-ebda kat.	L-ebda kat.

Sustanza (*)	Nru tal-CAS	Nru tal-INECS	Stat fiżiku	Riżultat *in vivo*	GHS Kat. tal-GHS *in vitro*	GHS Kat. tal-GHS *in vitro*
butirat tal-eptil	5870-93-9	227-526-5	L	1,7	L-ebda kat.	Kat. 3 — mhux obblig. Kat. 3
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	228-408-6	L	2	L-ebda kat.	Kat. mhix obbligatorja 3
fosfat tat-tri-iżobutil	126-71-6	204-798-3	L	2	Kat. 2	Kat. mhix obbligatorja 3
1-dekanol	112-30-1	203-956-9	L	2,3	Kat. 2	Kat. 2
aldeide ċiklamenika	103-95-7	203-161-7	L	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromożean	111-25-1	203-850-2	L	2,7	Kat. 2	Kat. 2
idroklorur ta' 2-klorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina	86604-75-3	434-680-9	S	2,7	Kat. 2	Kat. 2
a-terpineol	98-55-5	202-680-6	L	2,7	Kat. 2	Kat. 2
disulfid tad-di-n-propil	629-19-6	211-079-8	L	3	L-ebda kat.	Kat. 2
metakrilat tal-butil	97-88-1	202-615-1	L	3	Kat. 2	Kat. 2
benżintiol, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metil	7340-90-1	438-520-9	L	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	431-180-2	S	3,3	Kat. 2	Kat. 2
Eptanal	111-71-7	203-898-4	L	4	Kat. 2	Kat. 2

(*) L-20 sustanza ta' referenza jinkludu għażla rappreżentattiva minn 58 sustanza li kienu użati oriġinarjament sabiex jiġi vvalidat il-metodu ta' referenza 1 (EpiSkin™). Lista sħiħa ta' sustanzi ttestjati u l-kriterji ta' kif jintagħżlu dawn is-sustanzi huma disponibbli (5).

Is-sustanzi elenkati fit-Tabella 2 jipprovdu tqassim rappreżentattiv tat-58 sustanza użata fl-istudju internazzjonali ta' validazzjoni dwar l-irritazzjoni tal-ġilda li sar mill-ECVAM (1). L-għażla tagħhom hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

— Is-sustanzi huma disponibbli fuq livell kummerċjali

— jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tal-gradazzjoni tal-irritazzjoni Draize (minn sitwazzjoni mhux irritanti sa sitwazzjoni li tikkawża irritazzjoni qawwija))

— għandhom struttura kimika definita sew

— jirrappreżentaw ir-riproduzzjoni tal-metodu vvalidat u l-kapaċità mbassra kif determinati fl-istudju ta' validazzjoni li sar mill-ECVAM

— jirrappreżentaw il-funzjoni tal-kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni

— mhumiex assoċjati ma' xi profil estremament tossiku (eż. karċinoġenu jew tossiku għas-sistema riproduttiva) u l-ispejjeż għar-rimi tagħhom mhumiex kontra l-liġi.

III) **Valuri li Jiddefinixxu l-Eżattezza u l-Affidabbiltà**

Il-prestazzjoni (is-sensittività, l-ispeċifità, ir-rata negattiva falza, ir-rata pożittiva falza u l-eżattezza) tal-metodu ta' ttestjar propost għandhom ikunu jistgħu jitqabblu mal-valuri tal-metodu ta' referenza vvalidat 1 (it-Tabella 3), jiġifieri is-sensittività għandha tkun daqs jew iktar (≥) minn 80 %, l-ispeċifità għandha tkun daqs jew iktar (≥) minn 70 %, u l-eżattezza għandha tkun daqs jew iktar (≥) minn 75 %. Il-valuri tal-prestazzjoni għandhom jiġi kkalkulati billi jintużaw il-klassifikazzjonijiet kollha miksuba għall-20 sustanza fid-diversi laboratorji li jipparteċipaw. Il-klassifikazzjoni għal kull sustanza f'kull laboratorju għandha tinkiseb billi jintuża l-valur medju ta' vijabbiltà li jirriżulta minn sensiela ta' testijiet differenti li jsiru (minimu ta' tliet sensiela ta' testijiet).

Tabella 3

Il- prestazzjoni tal-Metodu ta' Referenza Vvalidat 1 ([1])

Metodu ta' ttestjar	Nru. ta' Sustanzi	Sensittività	Speċifiċità	Rata Negattiva Falza	Rata Pożittiva Falza	Eżattezza
Metodu ta' Referenza Vvalidat 1 ([1])	58	87,2 % ([2])	71,1 % ([3])	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Metodu ta' Referenza Vvalidat 1 ([1])	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

([1]) EpiSkin™
([2]) Imsejjes fuq 13-il irritant tal-kategorija 2 tal-GHS.
([3]) Imsejjes fuq 45 irritant tal-kategorija 3 tal-GHS jew tal-GHS li ma fihiex kategoriji tal-kimiki.

L-affidabbiltà tal-metodu ta' ttestjar propost għandha tkun tista' titqabbel ma' dik tal-metodi ta' referenza vvalidati.

Riproduċibbilità fil-laboratorju

Il-valutazzjoni tal-varjabbiltà fil-laboratorju għandha turi konkordanza ta' daqs jew iktar (≥) minn 90 % fost il-klassifikazzjonijiet (il-kategorija 2/mingħajr kategorija) miksuba minn diversi sensieli ta' testijiet tal-20 Sustanza ta' Referenza li jsiru b'mod indipendenti f'laboratorju wieħed..

Riproduċibilità bejn il-laboratorji

Il-valutazzjoni tar-riproduċibilità bejn il-laboratorji mhijiex meħtieġa jekk il-metodu propost ta' ttestjar se jintuża f'laboratorju wieħed biss. Għall-metodi li għandhom jiġu ttrasferiti bejn il-laboratorji, il-konkordanza bejn il-klassifikazzjonijiet (il-kategorija 2/mingħajr kategorija) miksuba f'testijiet differenti tal-20 Sustanza ta' Referenza li jsiru b'mod indipendenti għandha issir minn preferibbilment għall-inqas tliet laboratorji u għandha tkun daqs jew iktar (≥) minn 80 %.

REFERENZI

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.

2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.

3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Disponibbli fid-Dokumenti ta' Studju li Jitniżżlu mis-sit:http://ecvam.jrc.ec.europa.eu. B'aċċess mis-27.10.2008.

4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

([1]) It-Tabella 3 tipprovdi l-prestazzjoni tal-metodu ta' referenza vvalidat 1, b'ħarsa lejn il-kapaċità tiegħu li jidentifika sew is-sustanzi irritanti (il-kategorija 2 tal-GHS tan-NU) u s-sustanzi li mhumiex ikklassifikati (mingħajr kategorija, inkluż il-kategorija 3 li mhix obbligatorja) għat-58 u l-20 Sustanza ta' Referenza (it-Tabella 2), rispettivament.

ANNESS IV

C.3. **ALKA TAL-ILMA ĦELU U ĊANOBATTERJI, TEST TA' INIBIZZJONI TAT-TKABBIR**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

Il-Metodi ta' Ttestjar jiġu perjodikament riveduti u aġġornati fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-Metodu ta' Ttestjar C.2 kellu bżonn jiġi rivedut sabiex jinkludi speċijiet addizzjonali u sabiex jilħaq ir-rekwiżiti tal-valutazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni tal-kimiki. Ir-reviżjoni tlestiet fuq il-bażi ta' esperjenza prattika estensiva, progress xjentifiku fil-qasam ta' studji tat-tossiċità tal-alka, u użu regolatorju estensiv, li seħħew minn żmien l-adozzjoni oriġinali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-definizzjonijiet u t-taqsiriet li ġejjin huma użati għall-għanijiet ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar:

Bijomassa: hija l-piż niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni espress f'termini ta' volum partikolari; eż. mg alka/litru soluzzjoni tat-test. Is-soltu l-"bijomassa" hija mfissra bħala massa, iżda f'dan it-test, din il-kelma hija użata sabiex tirreferi għall-massa skont il-volum. Ukoll f'dan it-test, sostituti għall-bijomassa, bħall-għadd ta' ċelloli, fluworexxenza, eċċ. huma imkejla tipikament u l-użu tat-terminu "bijomassa" għalhekk jirreferi għal dan il-kejl ta' sostituzzjoni ukoll.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: huwa kejl bla dimensjoni tal-varjabbiltà ta' parametru, imfisser bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni fissa għall-medja. Dan jista' wkoll jiġi espressa bħala valur perċentwali. Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni tar-rata speċifika medja ta' tkabbir f'koltivazzjonijiet ta' kontroll replikati għandha tiġi kkalkulata kif ġej:

1. Ikkalkula % CV tar-rata medja speċifika ta' tkabbir mir-rati tat-tkabbir ta' kuljum/sezzjoni b'sezzjoni għar-replika rispettiva.

2. Ikkalkula l-valur medju tal-valuri kollha kkalkulati fil-punt 1 sabiex tikseb il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni tar-rata speċifika ta' tkabbir ta' kuljum/sezzjoni b'sezzjoni f'koltivazzjonijiet ta' kontroll replikati. ECx:

hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test li tiġi tinħall fil-midjum tat-test li tirriżulta f'x % (eż. 50 %) tnaqqis fit-tkabbir tal-organiżmu tat-test fi żmien ċertu perjodu ta' esponiment (li għandu jissemma espliċitament jekk ivarja mit-tul massimu jew normali tat-test). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew mill-prodott, is-simboli "E_rC" u "E_yC" jiġu użati rispettivament.

Midjum ta' tkabbir: huwa l-midjum sħiħ sintetiku ta' koltivazzjoni li fih jikbru l-alka tat-test meta jiġu esposti għas-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test tiġi normalment maħlula fil-midjum tat-test.

Rata ta' tkabbir (rata medja speċifika ta' tkabbir): hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' esponiment.

L-Anqas Effett ta' Konċentrazzjoni Osservat (LOEC): hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata fejn is-sustanza hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis fuq it-tkabbir li huwa statistikament sinifikanti (f'p, 0.05) meta mqabbla mal-kontroll, matul ċertu perjodu ta' esponiment. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test li jkunu 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett li jagħmel il-ħsara daqs jew akbar minn dawk osservati f'LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu sodisfatti, trid tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif l-LOEC (u għalhekk l-NOEC) ġie magħżul.

L-Ebda Effett ta' Konċentrazzjoni Osservat (NOEC): huwa l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC.

Varjabbli ta' rispons: hija varjabbli ta' stima ta' tossiċità li ġejja minn parametri mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa b'metodi ta' kalkolu differenti. Għal dan il-metodu, rati ta' tkabbir u prodott huma varjabbli ta' rispons li ġejjin mill-kejl dirett tal-bijomassa jew wieħed mis-sostituti msemmija.

Rata speċifika ta' tkabbir: hija varjazzjoni ta' rispons mfissra bħala l-kwozjent tad-differenza tal-logaritmi naturali ta' parametru ta' osservazzjoni (f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-bijomassa) u l-perjodu ta' ħin rispettivi.

Prodott: huwa l-valur ta' kejl li jvarja fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment bi tnaqqis tal-valur tal-kejl li jvarja fil-bidu tal-perjodu tal-esponiment sabiex jesprimi ż-żieda fil-bijomassa matul it-test.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa applikat l-aktar faċilment għal sustanzi li jinħallu fl-ilma li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, x'aktarx jibqgħu fl-ilma. Għall-ittestjar ta' sustanzi li ma jibqgħux fl-ilma, li jixterdu ħafna, kuluriti, li għandhom livell baxx ta' solubilità fl-ilma jew sustanzi li jistgħu jaffettwaw d-disponibbilità tan-nutrijenti jew minerali fil-midjum tat-test, ċertu modifikazzjonijiet tal-proċedura deskritta jistgħu jkunu rikjesti (eż. sistema magħluqa, kundizzjonar tar-reċipjenti tat-test). Gwida dwar modifikazzjonijiet approprjati hija mogħtija f'(2), (3) u (4).

1.4. PRINĊIPJU TAT-TEST.

L-għan ta' dan it-test huwa li jiġi determinat l-effett ta' sustanza fuq it-tkabbir ta' alka mikroskopika tal-ilma ħelu u/jew ċanobatterji. Organiżmi tat-test li jikbru esponenzjalment huma esposti għas-sustanza tat-test fi grupp ta' koltivazzjonijiet għal perjodu normalment ta' 72 siegħa. Minkejja ż-żmien relattivament qasir għat-twettiq tat-test, jistgħu jiġu vvalutati effetti fuq diversi ġenerazzjonijiet.

Ir-rispons tas-sistema huwa n-nuqqas ta' tkabbir f'serje ta' koltivazzjonijiet ta' alka (unitajiet tat-test) esposti għall-konċentrazzjonijiet varji ta' sustanza tat-test. Ir-rispons huwa vvalutat bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tal-esponiment mqabbla mat-tkabbir medju tar-replika, koltivazzjonijiet kontrollati li ma humiex esposti. Għal espressjoni sħiħa tar-rispons tas-sistema għal effetti tossiċi (sensittività ottima), il-koltivazzjonijiet jitħallew jikbru b'mod li ma huwiex esponenzjalment ristrett taħt kundizzjonijiet ta' nutrizzjoni suffiċjenti u dawl kontinwu għal perjodu ta' żmien suffiċjenti sabiex jitkejjel it-tnaqqis tar-rata speċifika ta' tkabbir.

It-tkabbir u l-inibizzjoni ta' tkabbir huma kkwantifikati minn kejl tal-bijomassa tal-alka bħala funzjoni tal-ħin. Il-bijomassa tal-alka hija mfissra bħala l-piż niexef skont il-volum, eż. mg alka/litru tas-soluzzjoni tat-test. Huwa madankollu diffiċli li jitkejjel il-piż niexef u għalhekk jintużaw parametri ta' sostituzzjoni. Minn dawn is-sostituti, kwantitajiet ta' ċelloli jintużaw l-aktar ta' spiss. Parametri oħra ta' sostituzzjoni jinkludu volum ta' ċellola, fluworexxenza, densità ottika, eċċ. Fattur ta' konverżjoni bejn il-kejl tal-parametru ta' surrogazzjoni u l-bijomassa għandu jkun magħruf.

Il-konklużjoni tat-test hija l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa (rata medja ta' tkabbir speċifika) matul il-perjodu ta' esponiment. Mir-rata medja ta' tkabbir speċifika reġistrata f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' tkabbir (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

Għall-applikazzjoni ta' dan il-metodu fi ħdan il-qafas regolatorju tal-UE, il-kalkolu tar-riżultati għandu jkun ibbażat fuq medja ta' rata ta' tkabbir speċifika għar-raġunijiet deskritti fit-taqsima 2.2 hawn taħt. Rispons varjabbli addizzjonali użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa prodott, li jista' jkun meħtieġ sabiex jintlaħqu rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'ċertu pajjiżi. Hija mfissra bħala bijomassa fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment li minnha tnaqqas il-bijomassa fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. Mill-prodott reġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

Minbarra dan, l-anqas effett ta' konċentrazzjoni użat (LOEC) u l-ebda effett ta' konċentrazzjoni osservat (NOEC) jista' jiġi ddeterminat statistikament.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Informazjoni fuq is-sustanza tat-test, li tista' tkun meħtieġa sabiex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test, tinkludi l-formula strutturali, purità, stabbiltà fid-dawl, stabbiltà taħt il-kundizzjonijiet tat-test, proprjetajiet ta' assorbiment ta' dawl, pKa, u riżultati ta' studji ta' trasformazzjoni li jinkludu bijodegradabilità fl-ilma.

Is-solubilità fl-ilma, il-koeffiċjent ta'qsim tal-ilma tal-octanol (P_{ow}) u l-pressa tal-fwar tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa, u metodu li ġie validat għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test b'reġistrazzjoni tal-effiċjenza ta' rkupru u l-limitu tal-kixfa għandhom ikunu disponibbli.

1.6. IS-SUSTANZA TA' REFERENZA

Is-sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-dichlorophenol użata fit-test internazzjonali taċ-ċirku (4), tista tiġi ittestjata bħala midjum ta' iċċekkjar tal-proċedura tat-test. Il-potassju tad-dichromate jista' jiġi wkoll użat bħala sustanza ta' referenza għal alka ħadra. Huwa desiderabbli li sustanza ta' referenza tiġi ttestjata minn tal-inqas darbtejn f'sena.

1.7. VALIDITÀ TAT-TEST.

Sabiex it-test ikun validu, għandu jkun hemm konformità mal-kriterji ta' eżekuzzjoni li ġejjin:

— Il-bijomassa fil-koltivazzjonijiet taħt kontroll għandha tkun żdiedet esponenzjalment b'fattur ta' mill-anqas 16 matul il-perjodu tat-test ta' 72 siegħa. Din tikkorrispondi għal rata ta' tkabbir speċifika ta' 0.92 ġurnata^{-1}. Għall-ispeċi użata l-aktar ta' spiss, ir-rata ta' tkabbir is-soltu hija sostanzjalment ogħla (ara l-Appendiċi 1). Dan il-kriterju ma jistax jintlaħaq meta jiġu użati l-ispeċi li jikbru aktar bil-mod minn dawk imniżżla fl-Appendiċi 1. F'dan il-każ, il-perjodu tat-test għandu jiġi estiż sabiex jinkiseb tkabbir tal-inqas ta' 16-il darba f'koltivazzjonijiet taħt kontroll, fil-waqt li t-tkabbir għandu jkun esponenzjali matul il-perjodu tat-test. Il-perjodu tat-test jista' jiġi mnaqqas tal-inqas għall-48 siegħa sabiex jinżamm tkabbir esponenzjali illimitat matul it-test, sakemm il-fattur ta' multiplikazzjoni minimu ta' 16 jintlaħaq.

— Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni għall-rati ta' tkabbir speċifiċi sezzjoni b'sezzjoni (ġurnata 0-1, 1-2 u 2-3, għal testijiet ta' 72 siegħa) f'koltivazzjonijiet taħt kontroll (ara t-taqsima 1.2 taħt "koeffiċjent ta' varjazzjoni") ma jistgħux jeċċedu 35 %. Ara it-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1 għall-kalkulazzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika sezzjoni b'sezzjoni. Dan il-kriterju japplika għall-valur medju ta' koeffiċjenti ta' varjazzjoni kkalkulati għall-koltivazzjonijiet taħt kontroll li huma replikati.

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni ta' rati medji ta' tkabbir speċifiċi matul il-perjodu sħiħ tat-test f'koltivazzjonijiet taħt kontroll li huma replikati ma jridx jeċċedi 7 % f'testijiet bil-*Pseudokirchneriella subcapitata* u *Desmodesmus subspicatus*. Għal speċi ittestjati b'mod inqas ta' spiss, il-valur ma jistax jeċċedi l-10 %.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.8.1. **Apparat**

Reċipjenti tat-test u apparat ieħor, li ser jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula totalment minn ħġieġ jew materjal ieħor li huwa kimikament inattiv. L-apparat għandu jiġi maħsul sewwa sabiex jiġi żgurat li l-ebda kontaminanti organiċi jew inorganiċi jistgħu jindaħlu fit-tkabbir tal-alka jew fil-kompożizzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test.

Ir-reċipjenti tat-test normalment ikunu fliexken tal-ħġieġ ta' dimensjonijiet li jħallu volum suffiċjenti ta' koltivazzjoni għall-kejl matul it-test u trasferiment suffiċjenti ta' massa ta' CO_2 mill-atmosfera (ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 1.8.9). Ta' min jinnota li l-volum tal-likwidu jrid ikun suffiċjenti għal determinazzjonijiet analitiċi (ara l-ħames paragrafu fit-taqsima 1.8.11).

Barra minnn hekk, xi uħud jew kull wieħed mill-apparat hawn taħt imsemmi huma meħtieġa:

— Apparat ta' culturing: gabinett jew kamra hija rakkomandata, fejn it-temperatura ta' inkubazzjoni magħżula tista' tiġi miżmuma għal ± 2 °C.

— Strumenti ta' kejl ta' dawl: huwa importanti li jiġi nnotat li l-metodu ta' kejl tal-intensità tad-dawl, u b'mod partikolari t-tip ta' riċevitur (kollettur), ser jaffettwa l-valur imkejjel. Preferibbilment, il-kejl għandu jiġi magħmul permezz ta' riċevitur sferiku (4 π) (li jirrispondi għal dawl dirett u rifless mill-angoli kollha fuq u taħt il-pjan ta' kejl), jew riċevitur ta' 2 π (li jirrispondi għal dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl).

— Apparat sabiex jiddetermina l-bijomassa tal-alka. L-għadd ta' ċelloli, li huwa l-parametru ta' sostituzzjoni użat l-aktar ta' spiss għall-bijomassa tal-alka, jista' jiġi magħmul permezz tal-użu ta' magna li tgħodd il-partiċelli elettroniċi, mikroskopju b'kamra tal-għadd, jew cytometer ta' fluss. Sostituti oħra għall-bijomassa jistgħu jiġu mkejla permezz ta' cytometer ta' fluss, fluorimeter, spectrophotometer jew colorimeter. Fattur ta' konverżjoni li jaqleb l-għadd ta' ċelloli f'piż niexef huwa ta' għajnuna sabiex isiru l-kalkulazzjonijiet. Sabiex jiġi pprovdut kejl li jkun ta' użu f'kunċentrazzjonijiet baxxi ta' bijomassa meta jintuża spectrophotometer, jista' jkun neċessarju li jintużaw tubi trasparenti (cuvettes) b'passaġġ ta' dawl minn tal-inqas ta' 4 ċm.

1.8.2. **Organiżmi tat-test.**

X'uħud mill-ispeċi ta' alka mikroskopika u ċanobatterji li ma humiex imwaħħla jistgħu jiġu użati. Ġie ppruvat permezz tal-proċedura tat-test speċifikata f'dan il-Metodu ta' Ttestjar li r-razez imniżżla fl-Appendiċi 1 huma adattati..

Jekk speċi oħra jiġu użati, ir-razza u/jew l-oriġini għandhom jiġu rrappurtati. Għandu jiġi kkonfermat li t-tkabbir esponenzjali tal-alka magħżula għat-test jista' jinżamm matul il-perjodu tat-test taħt il-kundizzjonijiet prevalenti.

1.8.3. **Midjum ta' tkabbir**

Żewġ midja alternattivi ta' tkabbir, l-midja OECD u AAP, huma rakkomandati. Il-kompożizzjoni ta' dawn il-midja tidher fl-Appendiċi 2. Ta' min jinnota li l-valur tal-pH inizjali u l-kapaċita li tnaqqas l-impatt (tirregola ż-żieda ta' pH) taż-żewġ midja huma differenti. Għalhekk ir-riżultati tat-testijiet jistgħu jkunu differenti skont il-midjum użat, partikolarment meta sustanzi li jonizzaw jiġu ttestjati.

Modifikazzjonijiet tal-midja ta' tkabbir jistgħu jkunu meħtieġa għal ċertu għanijiet, eż. meta jiġu ttestjati metalli u chelating agents jew ittestjar għal valuri differenti ta' pH. Użu ta' midjum modifikat irid ikun deskritt f'dettal u ġustifikat (3)(4).

1.8.4. **Konċentrazzjoni ta' bijomassa inizjali**

Il-bijomassa inizjali f'koltivazzjonijiet tat-test għandha tkun l-istess fil-koltivazzjonijiet tat-test kollha u suffiċjentement baxxa sabiex jitħalla tkabbir esponenzjali matul il-perjodu ta' inkubazzjoni mingħajr riskju li jispiċċaw in-nutrijenti. Il-bijomassa oriġinali ma għandiex teċċedi 0.5 mg/l bħala piż niexef. Il-konċentrazzjonijiet ta' ċelloli li ġejjin huma rakkomandati:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3-10^4	ċelloli/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5×10^3	ċelloli/ml
Navicula pelliculosa	10^4	ċelloli/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	ċelloli/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	ċelloli/ml

1.8.5. **Konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test**

L-isfera ta' konċentrazzjoni fejn l-effetti x'aktarx jiġru tista' tiġi determinata fuq il-bażi ta' riżultati minn testijiet sabiex tinstab l-imsemmija sfera. Għat-test finali definittiv, mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet arranġati f'serje ġeometrika b'fattur li ma jeċċedix 3.2 għandu jingħażel. Għal sustanzi tat-test li juru kurva ċatta ta' rispons għal konċentrazzjoni, fattur ogħla jista' jkun ġustifikat. Is-serjiet ta' konċentrazzjoni għandhom preferibbilment jestendu fuq il-klassi li jikkawżaw rata ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka ta' 5-75 %.

1.8.6. **Repliki u kontrolli**

Id-disinn tat-test għandu jinkludi tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk id-determinazzjoni tan-NOEC ma huwiex meħtieġ, id-disinn tat-test jista' jiġi mibdul sabiex jiżdiedu l-għadd ta' konċentrazzjonijiet u jonqsu l-għadd ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. L-għadd ta' repliki ta' kontroll irid ikun minn tal-inqas tlieta, u idealment għandu jkun darbtejn l-għadd ta' repliki użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

Sett separat ta' soluzzjonijiet tat-test jista' jiġi ppreparat għal determinazzjonijiet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test (ara r-raba' u s-sitt paragrafi f'sezzjon 1.8.11).

Meta materjal li jħoll huwa użat sabiex iħoll is-sustanza tat-test, kontrolli addizzjonali li jikkontjenu l-materjal li jħoll fl-istess konċentrazzjoni bħal dik użata fil-koltivazzjonijiet tat-test trid tiġi inkluża fid-disinn tat-test.

1.8.7. **Preparazzjoni ta' koltivazzjoni mlaqqma**

Sabiex l-alka tat-test tiġi adattata għall-kundizzjonijiet tat-test u jiġi żgurat illi l-alke huma fil-fażi ta' tkabbir esponenzjali meta użati sabiex tinnokula s-soluzjonijiet tat-test, koltivazzjoni mlaqqma fil-midjum tat-test hija ippreparata 2-4 ijiem qabel il-bidu tat-test. Il-bijomassa tal-alka għandha tiġi irranġata sabiex tħalli t-tkabbir esponenzjali jipprevali fil-koltivazzjoni mlaqqma sakemm it-test jibda. Il-koltivazzjoni mlaqqma għandha tiġi inkubata taħt l-istess kundizzjonijiet tal-koltivazzjonijiet tat-test. Kejjel iż-żieda tal-bijomassa fil-koltivazzjoni mlaqqma sabiex tiżgura li t-tkabbir huwa ġewwa l-portata normali għar-razza tat-test taħt kundizzjonijiet ta' culturing. Eżempju tal-proċedura għal culturing tal-alka huwa deskritt fl-Appendiċi 3. Sabiex jiġu evitati diviżjonijiet ta' ċelloli sinkroniċi matul it-test, it-tieni pass ta' propagazzjoni tal-koltivazzjoni mlaqqma jista' jkun meħtieġ.

1.8.8. **Preparazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test**

Is-soluzzjonijiet tat-test kollha jridu jikkontjenu l-istess konċentrazzjonijiet ta' midjum ta' tkabbir u bijomassa inizjali tal-alke tat-test. Soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula solitament huma ppreparati billi tithawwad soluzzjoni ta' stock tas-sustanza tat-test mal-midjum ta' tkabbir u koltivazzjoni mlaqqma. Soluzzjonijiet ta' stock huma normalment ippreparati billi s-sustanza tiġi maħlula fil-midjum tat-test.

Materjali li jħollu, eż. acetone, alcohol t-butyl u dimethyl formamide, jistgħu jiġu użati bħala reffiegħa sabiex iżidu sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma mal-midjum tat-test (2)(3). Il-konċentrazzjoni ta' solventi ma għandhiex teċċedi 100 µl/l, u l-istess konċentrazzjoni ta' solventi għandha tiġi miżjuda mal-koltivazzjonijiet kollha (li jinkludi l-kontrolli) fis-serjiet tat-test.

1.8.9. **Inkubazzjoni**

Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew b'tap li tgħaddi minnu l-arja. Ir-reċipjenti jiġu mħawwda u mqiegħda f'apparat ta' culturing. Matul it-test huwa meħtieġ li l-alke jinżammu f'sospensjoni u sabiex tiffaċilita trasferiment ta' CO_2. Għal dan il-għan, għandu jintuża ċaqliq u taħwid kostanti. Il-koltivazzjonijiet għandhom jiġu miżmuma b'temperatura fl-isfera ta' 21 sa 24 °C, ikkontrollati b'± 2 °C. Għal speċi oħra minbarra dawk imniżżla fl-Appendiċi 1, eż. speċi tropikali, temperaturi ogħla jistgħu jkunu xierqa, jekk il-kriterju ta' validità jista' jkun milħuq. Huwa rakkomandat li l-fliexken jitpoġġew kif ġie ġie u li jerġgħu jitpoġġew ta' kuljum fl-inkubatur.

Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1.5 unità matul it-test. Għal metalli u komposti li jonizzaw parzjalment b'pH madwar il-pH tat-test, jista' jkun meħtieġ li d-differenza fil-pH tiġi limitata sabiex jinkisbu riżultati reproduċibbli u mfissra sew. Differenza ta' < 0.5 pH unità hija teknikament fattibbli u tista' tiġi miksuba billi tiġi żgurata rata ta' trasferiment ta' massa ta' CO_2 adegwata mill-arja tal-madwar tas-soluzzjoni tat-test, eż. billi tiżdied ir-rata taċ-ċaqlieq. Possibilità oħra hija li titnaqqas id-domanda għal CO_2 billi titnaqqas il-bijomassa tal-bidu jew it-tul tat-test.

Il-wiċċ fejn il-koltivazzjonijiet huma inkubati għandu jirċievi illuminazzjoni fluworexxenti kontinwa u uniformi eż. ta' dawl tat-tip "cool-white" jew "daylight". Razez ta' alke u ċanobatterji jvarjaw fir-rekwiżiti tagħhom ta' dawl. L-intensità tad-dawl għandha tintgħażel sabiex taqbel mal-organiżmu tat-test li jintuża. Għall-ispeċi rakkomandata ta' alka ħadra, l-intensità tad-dawl fil-livell tas-soluzzjonijiet tat-test għandha tintgħażel mill-isfera ta' 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$meta mkejla fl-isfera ta' frekwenza effettiva fotosintetikament ta' 400-700 nm meta jintuża riċevitur xieraq. Għadd ta' speċi, b'mod partikolari *Anabaena flos-aquae*, jikbru sewwa f'inqas intensitajiet ta' dawl u jistgħu jġarrbu ħsarat f'intensitajiet għolja. Għal dawn l-ispeċi għandha tintgħażel intensità ta' dawl medja fl-isfera ta' 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Għal għodod li jkejjlu d-dawl kalibrati f'lux, gamma ekwivalenti ta' 4 440-8 880 lux għal dawl cool white tikkorrispondi approssimattivament għall-intensità ta' dawl rakkomandata ta' 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). L-intensità ta' dawl ma għandiex tvarja aktar minn ± 15 % mill-intensità ta' dawl medja fuq l-arja ta' inkubazzjoni.

1.8.10. **Dewmien tat-test**

Id-dewmien tat-test normalment huwa ta' 72 siegħa. Però, żminijiet tat-test itwal jew iqsar jistgħu jiġu użati, dejjem jekk il-kriterji ta' validità fit-taqsima 1.7 jistgħu jintlaħqu.

1.8.11. **Kejl u determinazzjonijiet analitiċi**

Il-bijomassa tal-alka f'kull flixkun hija determinata tal-inqas ta' kuljum matul il-perjodu tat-test. Jekk il-kejl huwa magħmul fuq volumi żgħar imneħħija mis-soluzzjoni tat-test permezz tal-pipetta, dawn ma għandhomx jinbidlu.

Kejl tal-bijomassa huwa magħmul bil-għadd manwali taċ-ċelloli permezz ta' mikroskopju jew apparat elettroniku li jgħodd il-partiċelli (permezz ta' għadd ta' ċelloli/jew bijovolum). Teknikajiet alternattivi, eż. fluss ta' cytometry, fluworexxenza in vitro jew in vivo chlorophyll 6)(7), jew densità ottika jistgħu jintużaw jekk korrelazzjoni li tagħti sodisfazzjon mal-bijomassa tista' tiġi ppruvata fuq l-isfera tal-bijomassa li tiġri fit-test.

Il-pH tas-soluzzjonijiet għandu jiġi mkejjel fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

Jekk il-proċedura analitika għad-determinazzjoni tas-sustanza tat-test fl-isfera ta' konċentrazzjoni użata hija disponibbli, is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu analizzati sabiex il-konċentrazzjonijiet inizjali u ż-żamma tal-konċentrazzjonijiet esposti matul it-test jiġu vverifikati.

Analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test tat-test ta' konċentrazzjoni għolja u baxxa, u konċentrazzjoni madwar il-mistennija EC_{50} tista' tkun suffiċjenti fejn x'aktarx il-konċentrazzjonijiet esposti jvarjaw inqas minn 20 % mill-valuri nominali matul it-test. Analiżi tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test hija rakkomandata fejn konċentrazzjonijiet x'aktarx ma jibqgħux fil-80-120 % ta' nominali. Għal sustanzi tat-test li huma volatili, instabbli jew li jitferrxu ħafna, ikkampjunar addizzjonali għal analiżi b'intervalli ta' 24 siegħa matul il-perjodu ta' esponiment huwa rakkomandat sabiex jiġi mfisser aħjar it-telf tas-sustanza tat-test. Għal dawn is-sustanzi, repliki żejda jkunu meħtieġa. F'kull każ, determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hemm bżonnha biss fi flixkun replikat f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew fuq il-kontenut tal-fliexken miġjuba mir-replika).

Midja tat-test ippreparati speċifikatament għall-analiżi ta' konċentrazzjonijiet esposi matul it-test għandhom jiġu ittrattati b'mod identiku għal dawk użati sabiex isiru t-testijiet, i.e. għandhom jiġu mlaqqmin b'alke u inkubati taħt kundizzjonijiet identiċi. Jekk analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula hija meħtieġa, jista' jkun neċessarju li l-alke jiġu sseparati minn mal-midjum. Separazzjoni għandha preferibbilment tkun magħmula permezz ta' ċentrifugazzjoni b'g-force baxxa, suffiċjenti sabiex tissettja l-alke.

Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanzi li jkunu ittestjati ġiet miżmuma, b'mod sodisfaċenti, f'± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjalment, matul it-test, analiżi tar-riżultati tista' tkun bażata fuq valuri inizjali jew imkejla inizjalment. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjalment hija akbar minn ± 20 %, analiżi tar-riżultati għandha tkun bażata fuq medja ġeometrika matul l-esponiment jew fuq mudelli li jiddeskrivu n-nuqqas tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (3)(8).

It-test ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka hija sistema iktar dinamika ta' ttestjar minn ħafna testijiet ta' tossiċità talilma ta' żmien qasir. Bħala konsegwenza, il-konċentrazzjonijiet attwalment esposti jistgħu jkunu diffiċli sabiex jiġu mfissra, speċjalment għas-sustanzi li jinfirxu li jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. F'dawn il-każijiet, jekk is-sustanza ma tibqax tidher mis-soluzzjoni permezz ta' tifrix għal bijomassa tal-alka li dejjem tiżdied ma tfissirx li hija mitlufa mis-sistema tat-test. Meta r-riżultat tat-test jiġi analizzat, għandu jigi ċcekkjat jekk nuqqas filkonċentrazzjoni tas-sustanza tat-test matul it-test huwa akkumpanjat min-nuqqas f'inibizzjoni ta' tkabbir. Jekk dan huwa l-każ, applikazzjoni ta' mudell xieraq li jiddeskrivi n-nuqqas ta' konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (8) jista' jiġi kkunsidrat. Jekk le, jista' jkun xieraq li l-analiżi tar-riżultati tista' tiġi bbażata fuq il-konċentrazzjonijiet inizjali (nominali jew imkejla).

1.8.12. **Osservazzjonijiet oħra**

Osservazzjoni mikroskopika għandha tiġi magħmula sabiex tiġi vverifikata apparenza normali u f'saħħitha talkoltivazzjoni mlaqqma u sabiex tiġi osservata xi apparenza anormali tal-alke (kif tista' tiġi kkawżata permezz ta' esponiment għas-sustanza tat-test) fl-aħħar tat-test.

1.8.13. **Test tal-limitu**

Taħt ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza tat-test ma għandhiex effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 $mg \cdot l^{-1}$ jew sal-limitu li tinħall fil-midjum tat-test (liema wieħed huwa l-anqas), test ta' limitu li jinvolvi paragun ta' risposti fi grupp ta' kontroll u grupp wieħed ta' trattament (100 $mg \cdot l^{-1}$ jew konċentrazzjoni li taqbel mal-limitu ta' solubilità), jista' jsir. Huwa rakkomandat ħafna li dan għandu jkun imsaħħaħ b'analiżi tal-konċentrazzjoni ta' esponiment. Il-kundizzjonijiet tat-test kollha deskritti qabel u l-kriterji ta' validità japplikaw għal test ta' limitu, bl-eċċezzjoni li l-għadd ta' repliki ta' trattament irid ikun minn tal-inqas sitta. Ir-risposti varjabbli fil-grupp ta' kontroll u ta' trattament jiġu analizzati permezz tat-test statistiku sabiex jiġu pparagunati medji, eż. Student's t-test. Jekk varjazzjonijiet ta' żewġ gruppi ma humiex l-istess, għandu jsir it-test irranġat għal varjazzjonijiet li ma humiex egwali.

1.8.14. **Modifika għal sustanzi b'kulur qawwi**

L-irradjazzjoni (l-intensità tad-dawl) għandha tkun qrib l-ogħla limitu tal-firxa stabbilita f'dan il-Metodu ta' Ttestjar: 120μE m^{-2} $^{s-1}$ jew ogħla.

Il-linja tad-dawl għandha titqassar billi jitnaqqas il-volum tas-soluzzjonijiet tat-test (fil-firxa ta' 5-25 ml).

Għandu jitwettaq ċaqliq suffiċjenti (pereżempju billi wieħed iħawwad b'mod moderat) sabiex tintlaħaq frekwenza għolja ta' esponiment tal-alka għal irradjazzjoni għolja fis-superfiċje tal-kultura.

2. DEJTA

2.1. PLOTTJAR TA' KURVI TA' TKABBIR

Il-bijomassa fir-riċipjenti tat-test tista' tiġi espressa f'unità tal-parametru tas-sostituzzjoni użata għall-kejl (eż. L-għadd ta' ċelloli, il-fluworexxenza).

Qassam f'forma tabulari l-konċentrazzjoni stmata tal-bijomassa f'koltivazzjonijiet tat-test u kontroll flimkien mal-konċentrazzjonijiet tal-materjal tat-test u l-ħinijiet tal-kejl, reġistrati b'riżoluzzjoni minn tal-inqas siegħat sħaħ, sabiex tipproduċi plottijiet ta' kurvi ta' tkabbir. Kemm skali logaritmiċi u skali lineari jistgħu jkunu bżonnjuża f'dan l-istadju, imma skali logaritmiċi huma obbligatorji u ġeneralment jagħtu preżentazzjoni aħjar ta' varjazzjonijiet fil-mudell ta' tkabbir matul il-perjodu tat-test. Ta' min jinnota li t-tkabbir esponenzjali jipproduċi linja dritta meta pplottjat fuq skala logaritmika, u li l-inklinazzjoni tal-linja (niżla) tindika r-rata speċifika ta' tkabbir.

Permezz tal-plots, eżamina jekk il-koltivazzjonijiet ta' kontroll jikbrux esponenzjalment bir-rata mistennija matul it-test. Eżamina, b'mod kritiku l-punti kollha tad-dejta u l-apparenza tal-graffs, u ċċekkja d-dejta oriġinali u l-proċeduri għal żbalji possibbli. Iċċekkja b'mod partikolari kwalunkwe punt dwar dejta li tidher li tiddevja bi żball sistematiku. Jekk huwa ovvju li żbalji proċedurali jistgħu jiġu identifikati u/jew ikkunsidrati probabbli, il-punt tad-dejta speċifiku jiġi mmarkat bħala iżolat u ma huwiex inkluż f'analiżi statistika sussegwenti. (Konċentrazzjoni ta' alka ta' żero f'wieħed minn tnejn jew tliet reċipjenti replikati jistgħu jindikaw li r-reċipjent ma ġiex mlaqqam kif suppost, jew ma kienx imnaddaf b'mod xieraq. Raġunijiet għal ċaħda ta' punt ta' dejta bħala iżolat iridu jiġu mniżżla b'mod ċar fir-rapport tat-test. Raġunijiet aċċettati huma biss (rari) żbalji proċedurali u mhux sempliċement preċiżjoni ħażina. Proċeduri ta' statistiċi għall-identifikazzjoni ta' punti iżolati huma ta' użu limitat f'dan it-tip ta' problema u ma jistgħux jissostitwixxu ġudizzju ta' espert. Punti iżolati (immarkati bħala tali) għandhom preferibbilment jinżammu qalb il-punti tad-dejta fi kwalunkwe preżentazzjoni sussegwenti ta' dejta grafika jew tabulari.

2.2. VARJABBLI TA' RISPONS

L-għan tat-test huwa li jiġu ddeterminati l-effetti tas-sustanza tat-test fuq it-tkabbir tal-alke. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, għax pajjiżi membri għandhom preferenzi u bżonnijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu applikabbli fil-pajjiżi membri kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati billi jintużaw iż-żewġ varjabbli ta' rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) Rata medja ta' tkabbir speċifiku: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi taż-żieda logaritmika tal-bijomassa matul il-perjodu tat-test, espress bil-ġurnata.

(b) Prodott: dan il-varjabbli ta' rispons hija l-bijomassa fl-aħħar tat-test b'nuqqas tal-bijomassa inizjali.

Għall-applikazzjoni ta' dan il-metodu fi ħdan il-qafas regolatorju tal-UE, il-kalkolu tar-riżultati għandu jkun ibbażat fuq medja ta' rata ta' tkabbir speċifika għar-raġunijiet deskritti hawn taħt. Għandu jiġi nnutat li valuri ta' tossiċità kkalkulati billi jintużaw dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma humiex paragunabbli u din id-differenza trid tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifika (E_rC_x) ġeneralment ikunu ogħla mir-riżultati bbażati fuq prodott (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu tat-test jiġu osservati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, imma sempliċement li l-valuri huma differenti matematikament. Il-kunċett ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku hija bażata fuq il-mudell ġenerali ta' tkabbir esponenzjali ta' alke f'koltivazzjonijiet mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata fuq il-bażi tal-effetti tar-rata ta' tkabbir, mingħajr ma hija dipendenti fuq il-livell assolut tar-rata speċifika ta' tkabbir tal-kontroll, fuq in-niżla tal-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons jew fuq id-dewmien tat-test. B'kuntrast, riżultati bażati fuq ir-rispons varjabbli tal-prodott huma dipendenti fuq dawn il-varjabbli l-oħra. E_yC_x huwa dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċi ta' alka użata fit-test u fuq ir-rata massima ta' tkabbir speċifiku li tista' tvarja bejn speċijiet u kif ukoll bejn razez differenti ta' alka. Dan il-varjabbli ta' rispons ma għandux jiġi użat sabiex jipparaguna s-sensittività mat-tossiċi qalb l-ispeċi ta' alka jew kif ukoll razez differenti. Fil-waqt li l-użu ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku sabiex tiġi stmata t-tossiċità huwa xjentifikament ippreferut, stimi ta' tossiċità bażati fuq prodott huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu tat-test sabiex jiġu sodisfatti rekwiżiti regolatorji tal-mument f'ċertu pajjiżi.

2.2.1. **Rata medja ta' tkabbir**

Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku għal perjodu speċifiku hija kkalkulata bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa mill-ekwazjoni għal kull reċipjent singolu ta' kontrolli u trattamenti:

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

fejn:

$\mu_{i\text{-}j}$: hija r-rata medja speċifika ta' tkabbir minn ħin *i* sa *j*;

X_i: hija l-bijomassa fil-ħin *i*;

X_j: hija l-bijomassa fil-ħin *j*;

Għal kull grupp ta' trattament u grupp ta' kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi ta' varjazzjoni.

Ikkalkula rata medja speċifika ta' tkabbir fuq id-dewmien tat-test kollu (normalment ġranet 0-3), permezz ta' użu ta' bijomassa mlaqqma bħala l-valur tal-bidu minflok valur imkejjel tal-bidu, għax b'dan il-mod normalement tinkiseb preċiżjoni akbar. Jekk l-apparat użat għal kejl tal-bijomassa jħalli determinazzjoni biżżejjed preċiża tal-bijomassa mlaqqma baxxa (eż. cytometer ta' fluss) allura l-konċentrazzjoni tal-bijomassa mkejla fil-bidu tista' tiġi użata. Ivvaluta wkoll ir-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni, ikkalkulati bħala r-rati ta' tkabbir speċifiku f'kull ġurnata matul il-kors tat-test (ġranet 0-1, 1-2 u 2-3) u eżamina jekk ir-rata ta' kontroll ta' tkabbir tibqax kostanti (ara l-kriterji ta' validità, sezzjon 1.7). Rata ta' tkabbir speċifiku sinjifikatament aktar baxxa fl-ewwel ġurnata mir-rata medja totali ta' tkabbir speċifiku tista' tindika fażi ta' dewmien. Fil-waqt li fażi ta' dewmien tista' tiġi minimizzata u prattikament eliminata f'koltivazzjonijiet ta' kontroll permezz ta' propagazzjoni xierqa tal-prikoltivazzjoni, fażi ta' dewmien f'koltivazzjonijiet esposti tista' tindika rkupru wara stress tossiku inizjali jew esponiment mnaqqsa minħabba telf tas-sustanza tat-test (li tinkludi assorbiment fil-bijomassa tal-alka) wara esponiment inizjali. Għalhekk ir-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni tista' tiġi assessjata sabiex jiġu vvalutati l-effetti tas-sustanza tat-test li jiġru matul il-perjodu ta' esponiment. Differenzi sostanzjali bejn r-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni u r-rata medja ta' tkabbir jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir hija meħtieġa.

Ikkalkula l-persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir għal kull replika ta' trattament mill-ekwazjoni:

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

fejn:

$\%I_r$: persentaġġ ta' inibizzjoni f'rata medja ta' tkabbir speċifiku;

μ_C: valur medju għal rata medja ta' tkabbir speċifiku (μ) fil-grupp ta' kontroll;

μ_T: rata medja ta' tkabbir speċifiku għar-replika ta' trattament;

Meta solventi huma użati sabiex jiġu ppreparati soluzzjonijiet tat-test, il-kontrolli tas-solventi minflok il-kontrolli mingħajr solventi għandhom ikunu użati fil-kalkulazzjoni tal-persentaġġ ta' inibizzjoni.

2.2.2. **Prodott**

Il-prodott huwa kkalkulat bħala l-bijomassa fl-aħħar tat-test li minnu titnaqqas l-bijomassa tal-bidu għal kull reċipjent singolu ta' kontrolli u trattamenti. Għal kull test ta' konċentrazzjoni u kontroll, ikkalkula valur medju għall-prodott flimkien mal-istimi ta' varjazzjoni. Il-persentaġġ ta' inibizzjoni fil-prodott ($\%I_y$) jista' jiġi kkalkulat għal kull replika ta' trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

fejn:

$\% I_y$: persentaġġ ta' inibizzjoni ta' prodott;

Y_C: valur medju għall-prodott fil-grupp ta' kontroll;

Y_T: valur għall-prodott għar-replika ta' trattament.

2.3. PLOTTJAR TA' KURVA TA' RISPONS TA' KONĊENTRAZZJONI

Ipplottja l-persentaġġ ta' inibizzjoni kontra l-logaritmu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u eżamina l-plot mill-qrib, mingħajr ma tagħti każ ta' xi punt ta' dejta li ġie maqtugħ waħdu bħala iżolat fl-ewwel fażi. Daħħal linja lixxa min-nofs il-punti ta' dejta fuq l-għajn jew permezz ta' interpolazzjoni kompjuterizzata sabiex tieħu l-ewwel impressjoni tar-relazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' rispons, imbagħad ipproċedi b'metodu aktar dettaljat, preferibbilment metodu ta' statistika kompjuterizzata. Skont l-użu intiż tad-dejta, il-kwalità (preċiżjoni) u l-ammont ta' dejta, kif ukoll id-disponibblità ta' għodda ta' analiżi tad-dejta, jista' jiġi deċiż (u xi drabi ġġustifikat sew) li titwaqqaf l-analiżi tad-dejta f'dan l-istadju u sempliċement jinqraw il-figuri prinċipali EC_{50} u EC_{10} (u/jew EC_{20}) mill-kurva mdaħħla fuq l-għajn (ara wkoll it-taqsima ta' hawn taħt fuq effetti stimulatorji). Raġunijiet valida għax ma jintużax metodu statistiku jistgħu jinkludu:

— Dejta ma hijiex xierqa għal metodi kompjuterizzati sabiex tipproduċi riżultati li aktar tista' torbot fuqhom milli jistgħu jiġu ottenuti minn ġudizzju espert — f'tali sitwazzjonijiet xi programm ta' kompjuter jistgħu anke jfallu li jipproduċu soluzzjoni li tista' turbot fuqha (ripetizzjonijiet jistgħu ma jaqblux eċċ.)

— Reazzjonijiet ta' tkabbir stimulatorji ma jistgħux jiġu mmaniġġjati adegwatament permezz tal-użu ta' programmi ta' kompjuter li huma disponibbli (ara taħt).

2.4. PROĊEDURI STATISTIĊI

L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons kwantitattivà permezz ta' analiżi ta' regressjoni. Huwa possibbli li tintuża regressjoni lineari li hija mogħtija piż wara li d-dejta ta' rispons tiġi trasformata b'mod lineari — pereżempju f'unità probit jew logit jew Weibull (9), imma proċeduri ta' rigressjoni li mhumiex lineari, huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet fid-dejta li ma jistgħux jiġu evitati u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet lixxi. Meta viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jiġu mkabbra bit-trasformazzjoni, li tinterferi mal-analiżi (9). Ta' min jinnota li metodi standard ta' analiżi permezz ta' użu ta' trasformazzjonijiet probit, logit, jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq dejta quantal (eż. mortalità jew sopravvivenza), u jridu jiġu mmodifikati sabiex jakkomodaw tkabbir jew dejta fuq il-bijomassa. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jinsabu f'(10)(11) u (12). L-użu ta' analiżi ta' rigressjoni mhux lineari hiwa spjegat f'aktar dettall fl-Appendiċi 4.

Għal kull varjabbli ta' rispons li għandu jiġi analizzat, uża ir-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons sabiex tikkalkula punt ta' stimi ta' valuri EC_x. Meta possibbli, il-limiti ta' 95 % kunfidenza għal kull stima għandhom jiġu ddeterminati. Id-dħul sewwa tad-dejta ta' rispons mal-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat jew grafikament jew statistikament. Analiżi ta' rigressjoni għandha tkun magħmula permezz tal-użu ta' reazzjonijiet ta' repliki individwali, mhux b'midja ta' grupp ta' trattament. Jekk, però, id-dħul ta' kurva mhux lineari huwa diffiċli jew ifalli minħabba sparpaljar kbir fid-dejta, il-problema tista' tiġi evitata billi ssir ir-regressjoni fuq midja ta' grupp bħala mod prattiku sabiex titnaqqas l-influwenza ta' iżolati suspetti. L-użu ta' din l-għażla għandu jiġi identifikat fir-rapport tat-test bħala devjazzjoni mill-proċedura normali għaliex il-qbil tal-kurva ma' repliki individwali ma pproduċewx riżultat tajjeb.

Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu jiġu wkoll miksuba permezz tal-użu ta' interpolazzjoni lineari b'bootstrapping (13), jekk mudelli/metodi disponibbli ta' rigressjoni mhumiex tajbin għad-dejta.

Għal stima tal-LOEC u għalhekk l-NOEC, u għal effetti tas-sustanza tat-test fuq ir-rata ta' tkabbir, huwa neċessarju li jsir paragun tal-midja ta' trattament permezz tal-użu ta' analiżi ta' tekniki ta' varjazzjoni (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni trid imbagħad tiġi pparagunata mal-medja ta' kontroll permezz ta' metodu tat-test xieraq ta' paragun multiplu jew trend. It-test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun ta' għajnuna (14)(15)(16)(17)(18). Huwa neċessarju li tivvaluta jekk l-assunzjoni ta' omoġeneità ta' varjazzjoni ANOVA treġix. Din il-valutazzjoni tista' tiġi magħmula grafikament jew b'test formali (18). Testijiet xierqa huma dawk ta' Levene jew Bartlett. Nuqqas li tintlaħaq l-assunzjoni ta' omoġeneità ta' varjazzjonijiet tista' xi drabi tiġi korretta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk eteroġeneità ta' varjanza hija estrema u ma tistax tiġi korretta bi trasformazzjoni, analiżi b'metodi bħal step-down Jonkheere trend tests għandha tiġi kkunsidrata. Gwida addizzjonali għad-determinazzjoni tal-NOEC tinstab f'(12).

Żviluppi xjentifiċi reċenti wasslu għal rakkomandazzjoni sabiex jiġi abbandunat il-kunċett ta' NOEC u jinbidel b'punti ta' stima bbażati fuq regressjoni EC_x. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test tal-alka. Sfera ta' 10 sa 20 % tidher li hija xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment kemm l-EC_{10} u l-EC_{20} għandhom jiġu rrappurtati.

2.5. STIMULAZZJONI TA' TKABBIR

Stimulazzjoni ta' tkabbir (inibizzjoni negattiva) f'konċentrazzjonijiet baxxi hija xi drabi osservata. Din tista' tirriżulta jew minn hormesis ("stimulazzjoni tossika") jew minnn żieda ta' fatturi stimulanti ta' tkabbir mal-materjal tat-test għall-inqas midjum użat. Innota li ż-żieda ta' nutrijenti inorganiċi ma għandux ikollha effett dirett għaliex il-midjum tat-test għandu jżomm żieda ta' nutrijenti matul it-test. Stimulazzjoni f'doża baxxa tista' ġeneralment tiġi injorata f'kalkulazzjonijiet EC_{50} sakemm ma tkunx estrema. Madankollu, jekk hija estrema, jew valur EC_x għal x baxxa għandu jiġi kkalkulat, proċeduri speċjali jistgħu ikunu meħtieġa. Tħassir ta' reazzjonijiet stimulatorji mill-analiżi tad-dejta għandhom jiġu evitati jekk possibbli, u jekk software disponibbli li jdaħħal il-kurva ma jistax jaċċetta stimulazzjoni minuri, tista' tintuża interpolazzjoni lineari b'bootstrapping. Jekk l-istimulazzjoni hija estrema, l-użu ta' mudell ta' hormesis jista' jiġi kkunsidrata (19).

2.6. INIBIZZJONI TA' TKABBIR MHUX TOSSIKU

Materjali tat-test li jassorbu d-dawl jistgħu jagħtu lok għal tnaqqis fir-rata ta' tkabbir għaliex id-dellijiet inaqqsu l-ammont ta' dawl disponibbli. Tali tipi ta' effetti fiżiċi għandhom ikunu separati minn effetti tossiċi b'modifikazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test u tal-ewwel għandhom jiġu rappurtati separatament. Gwida tinstab f'(2) u (3).

3. RAPPURTAR

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Il-perjodu tat-test irid jinkludi dan li ġej:

Sustanza tat-test:

— natura fiżika u proprjetajiet relevanti fiżjokemikali, li jinkludu limitu ta' solubilità fl-ilma,

— dejta għall-identifikazzjoni tal-kimika, li tinkludi purità.

Speċi tat-test:

— ir-razza, min jipprovdi jew sors u l-kundizzjonijiet ta' koltivazzjoni użati.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dejta tal-bidu tat-test u d-dewmien tiegħu,

— deskrizzjoni tad-disinn tat-test: reċipjenti tat-test, il-volumi tal-koltivazzjonijiet, densità tal-bijomassa fil-bidu tat-test,

— kompożizzjoni tal-midjum,

— konċentrazzjonijiet u repliki tat-test (eż. Għadd ta' repliki, għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test u progressjoni ġeometrika li ġiet użata),

— deskrizzjoni tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, li tinkludi l-użu ta' materjali li jdewwbu eċċ.,

— apparat ta' culturing,

— intensità ta' dawl u kwalità (sors, omoġenità),

— temperatura,

— konċentrazzjonijiet ittestjati: il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u kwalunkwe riżultat ta' analiżi sabiex tiddetermina l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fir-reċipjent tat-test. L-effiċjenza ta' rkupru tal-metodu u l-limitu ta' kwantifikazzjoni fil-matriċi tat-test għandhom ikunu rappurtati,

— kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-Metodu ta' Ttestjar,

— metodu ta' determinazzjoni tal-bijomassa u evidenza ta' korrelazzjoni bejn il-parametru mkejjel u l-piż niexef.

Riżultati:

— valuri pH fil-bidu u fl-aħħar tat-test għal kull trattament,

— bijomassa għal kull flixkun f'kull punt ta' kejl u metodu sabiex titkejjel il-bijomassa,

— kurvi ta' tkabbir (plot ta' bijomassa kontra ħin),

— varjabbli ta' rispons kkalkulati għal kull trattament replikat, b'valuri medji u koeffiċjent ta' varjazzjoni għar-repliki,

— preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni konċentrazzjoni/effett,

— stimi ta' tossiċità varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} u intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalkulati, LOEC u NOEC u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom,

— jekk ANOVA ġiet użata, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. Id-differenza l-inqas sinifikanti),

— kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament,

— kwalunkwe effett ieħor osservat, eż. bidliet morfoloġiċi tal-alke,

— diskussjoni tar-riżultati, li jinkludu kwalunkwe influwenza fuq ir-riżultat tat-test li tirriżulta minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

4. LETTERATURA

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Ċanobatterji, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

(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.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692

(6) 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.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

(8) 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.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(10) 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.

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(16) 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.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

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

(19) 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.

Appendiċi 1

Razez li ġie ppruvat li huma adattati għat-test

Alke ħodor

— *Pseudokirchneriella subcapitata*, (qabel magħrufa bħala *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (qabel magħrufa bħala *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomi

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Ċanobatterji

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

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sorsi tar-razez

Ir-razez rakkomandati huma disponibbli f'koltivazzjonijiet unialkali mill-kollezzjonijiet li ġejjin (f'ordni alfabetiku):

ATCC: Kollezzjoni ta' Koltivazzjoni ta' Tip Amerikan
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Kollezzjoni ta' Koltivazzjoni ta' Alke u Protożoa
Istitut ta' Ekoloġija tal-Ilma Ħelu,
Laboratorju Windermere
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
UK

SAG: Kollezzjoni ta' Koltivazzjonijiet ta' Alka
Istitut tal-Fisjoloġija tal-Pjanti
Università ta' Göttingen
Nicholausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
GERMANY

UTEX Kollezzjoni ta' koltivazzjoni ta' Alke
Sezzjon ta' Bijoloġija Molekolari, Ċellulari u ta' Żvilupp
Skola tax-Xjenzi Bijoloġiċi
l-Università tat-Texas f'Austin
Austin, Texas 78712
USA

Apparenza u karatteristiċi tal-ispeċijiet rakkomandati

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Apparenza	Mgħawwġa, ċelloli singoli mibruma	Ovali, fil-parti l-kbira ċelloli singoli	virgi	Ktajjen ta' ċelloli ovali	virgi
Daqs (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volum ta' ċelloli(µm^3/ċell)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Piż niexef taċ-ċelloli(mg/ċell)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Rata ta' tkabbir (3) (ġurnata^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Imkejla b'apparat li jgħodd partiċelli elettroniċi
(2) Ikkalkulat mid-daqs
(3) Rata ta' tkabbir osservata l-aktar ta' spiss f'midjum OECD f'intensità ta' dawl ta'madwar 70 µE·m^{-2}·s^{-1} u 21 °C

Rakkomandazzjonijiet speċifiċi fuq Culturing u l-Immaniġġjar ta' Speċi tat-test Rakkomandati

Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus

Dawn l-alke ħodor huma ġeneralment faċli biex iżżommhom f'diversi midja ta' koltivazzjoni. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni. Iċ-ċelloli huma normalment solitarji, u kejl tad-densità taċ-ċelloli jista' faċilment jiġi magħmul permezz ta' apparat li jgħodd partiċelli elettroniċi jew mikroskopju.

Anabaena flos-aquae

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Huwa partikolarment importanti li jiġi evitat li l-koltivazzjoni titħalla tgħaddi l-fażi ta' tkabbir tal-log meta tiġi mġedda, rkupru huwa diffiċli f'dan il-punt.

Anabaena flos-aquae tiżviluppa ġabriet ta' ktajjen ta' ċelloli. Id-daqs ta' dawn il-ġabriet jista' jvarja mal-kundizzjonijiet ta' culturing. Jista' jkun neċessarju li jinkisru dawn il-ġabriet meta l-għadd bil-mikroskopju jew permezz ta' apparat li jgħodd il-partiċelli elettroniċi huwa użat għad-determinazzjoni tal-bijomassa.

Sonikazzjoni tas-sub-kampjuni jistgħu jiġu użati biex jinkisru l-ktajjen sabiex titnaqqas il-varjabilità fl-għadd. Sonikazzjoni itwal aktar milli meħtieġ sabiex jinkisru l-ktajjen f'tulijiet aqsar jistgħu jkissru ċ-ċelloli. L-intensità ta' sonikazzjoni u dewmien iridu jkunu identiċi għal kull trattament.

Għodd biżżejjed oqsma fuq il-hemocytometer (tal-anqas 400 ċellola) biex tgħin tikkompensa għal varjabbilità. Dan itejjeb l-attendibilità ta' determinazzjonijiet ta' densità mikroskopiċi.

Apparat li jgħodd il-partiċelli elettroniċi jista' jiġi użat għad-determinazzjoni tal-volum totali ta' ċelloli ta' Anabaena wara li l-ktajjen ta' ċelloli jinkisru b'sonifikazzjoni bil-għaqal. L-enerġija tas-sonifikazzjoni għandha tiġi rranġata sabiex jiġi evitat li l-ktajjen jinqasmu.

Uża ħallât bil-belliegħa jew metodu simili adegwat sabiex tiżgura li s-sospensjoni ta' alke biex ir-riċipjenti tat-test jiġu mlaqqma hija mħallta sew u b'mod omoġenju.

Kontenituri tat-test għandhom jitqiegħdu fuq mejda orbitali jew ta' tħallit reċiproku b'madwar 150 dawra kull minuta. Alternattiva oħra hija l-użu ta' ċaqlieq intermittenti sabiex titnaqqas it-tendenza ta' Anabaena li tifforma ċapap. Jekk ikun hemm ċapap, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu ottenuti kampjuni rappreżentattivi tal-kejl tal-bijomassa. Ċaqlieq qawwi qabel ma jittieħdu l-kampjuni jista' jkun neċessarju sabiex jiddiżintegraw ċapap ta' alka.

Synechococcus leopoliensis.

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni.

Synechococcus leopoliensis tikber bħal ċelloli solitarji b'forma ta' vireg. Iċ-ċelloli huma żgħar ħafna, li jikkomplika l-għadd permezz ta' mikroskopju għal kejl tal-bijomassa. Apparati li jgħoddu l-partiċelli elettroniċi mgħammra sabiex jgħoddu partiċelli sad-daqs ta' madwar 1 μm huma ta' għajnuna. Kejl in vitro fluorometric huma applikabbli ukoll.

Navicula pelliculosa

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni. Innota li kompost li fih is-silika huwa meħtieġ fil-midjum.

Navicula pelliculosa tista' tifforma gruppi taħt ċerti kundizzjonijiet ta' tkabbir. Minħabba l-produzzjoni ta' lipidi ċ-ċelloli talalka xi drabi għandhom it-tendenza li jakkumulaw fil-wiċċ. Taħt dawk ċ-ċirkustanzi, miżuri speċjali jridu jittieħdu meta subkampjuni huma meħuda għad-determinazzjoni tal-bijomassa sabiex jiġu miksuba kampjuni rappreżentattivi. Taħlit bilsaħħa, eż. bl-użu ta' ħallât bil-belliegħa, jista' jkun meħtieġ.

Appendiċi 2

Midja ta' tkabbir

Wieħed miż-żewġ midja ta' tkabbir li ġejjin jista' jintuża:

Midjum OECD: Midjum oriġinali ta' OECD TG 201, ukoll skont ISO 8692

US. EPA midjum AAP ukoll skont ASTM.

Meta dawn il-midja jiġu ppreparati, kimiċi reaġenti jew ta' grad analitiku għandhom jiġu użati u dejonizzati fl-ilma.

Kompożizzjoni tal-midjum-AAP (US. EPA) u l-midjum OECD TG 201

Komponent	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Il-proporzjon molari ta' EDTA għal ħadid teċċedi bi ftit unità. Dan jipprevjeni l-preċipitazzjoni tal-ħadid u, fl-istess ħin, chelation ta' jonji ta' metalli tqal hija minimizzata.

Fit-test bid-dijatomu Navicula pelliculosa, iż-żewġ midja jridu jkunu supplimentati b' $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ sabiex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 1,4 mg Si/l.

Il-pH tal-midjum jinkiseb f'ekwilibriju bejn is-sistema ta' karbonat tas-sistema tal-midjum u l-pressjoni parzjali tas-CO_2 fl-arja atmosferika. Bejn wieħed u ieħor ir-relazzjoni bejn pH b'25 °C u l-konċentrazzjoni tal-bikarbonat molari hija:

$$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$$

B'15 mg $NaHCO_3$, $pH_{eq} = 7,5$ (U.S. EPA midjum) u b'50 mg $NaHCO_3$/l, $pH_{eq} = 8,1$ (OECD midjum).

Komposti ta' elementi tal-midja tat-test

Element	EPA	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

Preparazzjoni tal-midjum OECD

Nutrijent	Konċentrazzjoni f'soluzzjoni ta' stokk
Soluzzjoni ta' stokk nru 1: makronutrijenti	
NH_4Cl $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ KH_2PO_4	$1,5\ g \cdot l^{-1}$ $1,2\ g \cdot l^{-1}$ $1,8\ g \cdot l^{-1}$ $1,5\ g \cdot l^{-1}$ $0,16\ g \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 2: ħadid	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	$64\ mg \cdot l^{-1}$ $100\ mg \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 3: elementi ta' traċċi	
H_3BO_3 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ $ZnCl_2$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	$185\ mg \cdot l^{-1}$ $415\ mg \cdot l^{-1}$ $3\ mg \cdot l^{-1}$ $1,5\ mg \cdot l^{-1}$ $0,01\ mg \cdot l^{-1}$ $7\ mg \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	$50\ g \cdot l^{-1}$

Sterilizza s-soluzzjonijiet ta' stokk permezz ta' filtrazzjoni b'membrana (diametru medju tal-pori 0,2 μm) jew permezz ta' autoclaving (120 °C, 15 min). Erfa' s-soluzzjonijiet fid-dlam b'4 °C.

Tagħmilx autoclave tas-soluzzjonijiet ta' stokk 2 u 4, imma sterilizzahom permezz ta' filtrazzjoni b'membrana.

Ipprepara midjum ta' tkabbir billi żżid volum xieraq ta' soluzzjonijiet ta' stokk 1-4 mal-ilma

Żid sa 500 ml ta' ilma sterilizzat:

— 10 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 1

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 2

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 3

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 4

Żid sa 1 000 ml b'ilma sterilizzat

Ħalli ħin biżżejjed sabiex tekwilibrija l-midjum mas-CO_2 atmosferiku, jekk neċessarju b'bubbling b'arja sterili filterjata għal ftit ħin.

Preparazzjoni tal-midjum U.S. EPA

A1.1. Żid ml wieħed ta' kull soluzzjoni stokk fi A1.2.1–A1.2.7 sa bejn wieħed u ieħor 900 mL ta' ilma dejonizzat jew distillat u agħmel dilwizzjoni sa 1L.

A1.2. Soluzzjonijiet stokk ta' makronutrijenti jsiru billi jinħallu dawn li ġejjin fi 500ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Rejaġġenti A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3, u A1.2.4 jistgħu jiġu kkombinati f' soluzzjoni stokk waħda.

A1.2.1. $NaNO_3$— 12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$— 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$— 2,205 g.

A1.2.4. *Soluzzjoni Konċentrata ta' Mikronutrijenti*— (see A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$— 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4— 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$— 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$— Ara n-Nota A1.1.

Nota A1.1-Użu għall-ispeċi diatom ittestjati biss. Jistgħu jiġu miżjuda direttament (202,4 mg) jew permezz tas-soluzzjoni stokk biex jinkiseb 20 mg/L ta' konċentrat finali fil-midjum.

A1.3. Soluzzjonijiet stokk ta' mikronutrijenti jsiru billi jinħallu dawn li ġejjin fi 500ml ta' ilma dejonizzat jew distillat:

A1.3.1. H_3BO_3— 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$— 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$— 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$— 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$— 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$— 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$— 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$— 150,000 mg.

[Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$— 0,005 mg Ara Nota A1.2.

Nota A1.2 — Uża biss fil-midjum ta' kulturi stokk tal-ispeċi diatom.

A1.4. Altera l-pH sa 7,5± 0,1 permezz ta' 0,1 *N* jew 1,0 *N* NaOH jew HCl.

A1.5. Iffiltra l-midjum f'kontenitur sterilizzat permezz ta' filtru bil-membrane ta' 0,22-μm jekk għandu jintuża midjum li jgħodd il-partiċelli jew filtru 0,45-μm magħandux jintuża.

A1.6. Aħżen il-midjum fid-dlam sa bejn wieħed u ieħor 4 °C sakemm jintuża.

Appendiċi 3

Eżempju tal-proċedura għall-culturing tal-alke

Osservazzjonijiet Ġenerali

L-għan ta' culturing fuq il-bażi tal-proċedura li ġejja huwa li jinkisbu koltivazzjonijiet ta' alka għal testijiet ta' tossiċità.

Metodi xierqa jridu jiġu użati sabiex jiġi żgurat li l-koltivazzjonijiet ta' alka ma jkunux infettati minn batteri. Koltivazzjonijiet axenic jistgħu jkunu mixtieqa imma koltivazzjonijiet unialkali jridu jiġu stabbiliti u użati.

L-operazzjonijiet kollha jridu jsiru f'kundizzjonijiet sterili sabiex kontaminazzjoni b'batteri u alke oħra tiġi evitata.

Apparat u materjal

Ara taħt Metodu ta' Ttestjar: Apparat.

Proċeduri għall-kisba ta' koltivazzjonijiet ta' alka

Preparazzjoni ta' soluzzjoni ta' nutrijent (midjum):

Il-melħ kollu tan-nutrijenti tal-midjum huwa ppreparat bħala soluzzjonijiet ta' stokk konċentrati u merfugħa fid-dlam u l-kesħa. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati b'filtrazzjoni jew b'autoclaving.

Il-midjum huwa ppreparat billi jiżdied l-ammont korrett ta' soluzzjoni ta' stokk sabiex jiġi sterilizzat ilma distillat, u dan isir b'attenzjoni biex l-ebda infezzjonijiet ma sseħħ. Għal midjum solidu 0,8 fil-mija ta' agar huwa miżjud.

Koltivazzjoni ta' stokk:

Il-koltivazzjonijiet ta' stokk huma koltivazzjonijiet ta' alka żgħar li regolarment jiġu trasferiti għal midjum ġdid sabiex jaġixxu bħala materjal inizjali tat-test. Jekk il-koltivazzjonijiet ma jintużawx regolarment, dawn jiġu skrezjati fuq tubi ta' agar. Dawn jiġu ttrasferiti f'midjum ġdid tal-anqas darba kull xahrejn.

Il-koltivazzjonijiet ta' stokk jitkabbru fi fliexken konikali li jkun fihom l-midjum xieraq (volum madwar 100 ml). Meta l-alke jiġu inkubati b'20 °C b'illuminazzjoni kontinwa, trasferiment ta' darba f'ġimgħa huwa meħtieġ.

Matul it-trasferiment, ammont ta' koltivazzjoni "antika" hija trasferita b'pipetti sterili fi flixkun ta' midjum frisk, biex ma' speċi li tikber malajr il-konċentrazzjoni inizjali hija madwar 100 darba iżgħar milli fil-koltivazzjoni l-antika.

Ir-rata ta' tkabbir ta' speċi tista' tkun determinata mill-kurva ta' tkabbir. Jekk hija magħrufa, huwa possibbli tistma d-densità f'liema l-koltivazzjoni għandha tkun trasferita għal midjum ġdid. Dan irid isir qabel ma l-koltivazzjoni tilħaq il-fażi tal-mewt.

Pre-koltivazzjoni:

Il-pre-koltivazzjoni hija maħsuba sabiex tagħti ammont ta' alke xieraq għat-tilqim ta' koltivazzjonijiet tat-test. Il-pre-koltivazzjoni hija inkubata taħt il-kundizzjonijiet tat-test u użata meta tkun għada qed tikber esponenzjalment, normalment wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' minn jumejn sa 4 ijiem. Meta l-koltivazzjonijiet tal-alka jkun fihom ċelloli deformati jew anormali, dawn iridu jiġu imwarrba.

Appendiċi 4

Analiżi ta' dejta b'regressjoni mhux lineari

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Ir-rispons f'testijiet tal-alka u testijiet oħra ta' tkabbir tal-mikrobi — it-tkabbir tal-bijomassa huwa ta' natura varjabbli kontinwu jew metriku — rata ta' proċess jekk rata ta' tkabbir hija użata, u l-integrali tagħha fuq il-ħin jekk il-bijomassa tiġi magħżula. It-tnejn huma referenzjati għar-rispons medja korrispondenti tal-kontrolli repliki li mhux esposti li juru rispons massimu għall-kundizzjonijiet imposti — b'dawl u temperatura bħala fatturi determinanti prinċipali f'test tal-alka. Is-sistema hija mqassma jew omoġenja u l-bijomassa tista' tidher bħala kontinwazzjoni mingħajr konsiderazzjoni taċ-ċelloli individwali. Il-varjazzjoni ta' distribuzzjoni tat-tip ta' rispons għal tali sistema għandha x'taqsam biss ma fatturi sperimentali (deskritti tipikament mil-log-normali jew distribuzzjonijiet normali ta' żball). Dan huwa b'kuntrast għar-reazzjonijiet tipiċi bioassay bi quantal dejta, għal-liema t-tolleranza (tipikament distribwita b'żewġ modijiet) ta' organiżmi individwali hija ta' spiss assunta li hija l-komponenti varjabbli dominanti. Risposti ta' kontroll hawn huma żero jew livell tal-isfond.

Fis-sitwazzjoni li mhix ikkumplikata, ir-rispons normalizzat jew relattiv, r, jonqos monotonikament minn 1 (inibizzjoni żero) sa 0 (100 fil-mija inibizzjoni). Innota li r-risposti kollha għandhom żball assoċjat, u li inibizzjonijiet negattivi apparenti jistgħu jiġu kkalkulati bħala riżultat ta' żball ta' każwali biss.

Analiżi ta' regressjoni

Mudelli

Analiżi ta' regressjoni timmira li tiddeskrivi kwantitattivament il-kurva konċentrazzjoni-rispons fil-forma ta' funzjoni matematika regressjoni Y = f (C) jew aktar ta' spiss F (Z) fejn Z = log C. Użata inversament $C = f^{-1}$ (Y) tħalli l-kalkolu tal-figuri EC_x li jinkludi l- EC_{50}, EC_{10} u EC_{20}, u l-95 % tagħhom ta' limiti ta' kunfidenza. Diversi forom ta' funzjonijiet sempliċi matematiċi għandhom jiġu ppruvati sabiex jiġu deskritti tajjeb ir-relazzjonijiet konċentrazzjoni-rispons miksuba f'testijiet ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka. Funzjonijiet jinkludu, pereżempju, l-ekwazjoni loġistika, l-ekwazjoni mhux simettrika Weibul u l-funzjoni ta' distribuzzjoni log, li huma kollha kurvi bil-forma tal-ittra "S" (sigmoid) li asimptotikalment joqorbu wieħed għal $C \rightarrow 0$, u żero għal $C \rightarrow$ infinità.

L-użu ta' mudelli ta' funzjoni kontinwa threshold (eż. il-mudell Koyman "għall-inibizzjoni tat-tkabbir tal-popolazzjoni" Kooijman et al. 1996) huwa proposta jew alternattiva reċenti għal mudelli asimptotiċi. Dan il-mudell jassumi xejn effetti f'konċentrazzjonijiet taħt ċertu livell, EC0+, li huwa stmat permezz ta' estrapolazzjoni tar-relazzjoni rispons-konċentrazzjoni biex tinterċetta l-bażi ta' konċentrazzjoni permezz tal-użu ta' funzjoni kontinwa li ma hijiex differenzjabbli fil-punt tat-tluq.

Innota li l-analiżi tista' tkun sempliċi minimizzazzjoni tas-somom tal-kwadrati varjabbli (tassumi varjanza kostanti) jew varjati mgħobbija jekk l-eteroġenità tal-varjanza hija kompensata

Proċedura

Il-proċedura tista' tiġi mfissra kif ġej: agħżel ekwazjoni xierqa funzjonali, Y = f (C), u adattaha mad-dejta b'regressjoni li mhix lineari. Preferibbilment uża l-kejl minn kull flixkun individwali minflok il-valuri medji tar-replikati, sabiex toħroġ kemm jista' jkun informazzjoni mid-dejta. Jekk il-varjazzjoni hija għolja, fuq in-naħa l-oħra, il-prattika tissuġġerixxi li l-valuri medji tar-repliki jistgħu jipprovdu stima matematika li aktar tista' turbot fuqha, inqas influwenzata bi żbalji sistematiċi fid-dejta, minn ma' kull punt individwali ta' dejta miżmum.

Ipplottja l-kurva adattata u d-data mkejla u eżamina jekk id-dħul tal-kurva huwiex adegwat. Analiżi tar-residwi tista' tkun għodda partikolarment ta' għajnuna għal dan il-għan. Jekk ir-relazzjoni funzjonali magħżula biex iddaħħal r-rispons ta' konċentrazjoni ma tiddeskrivix il-kurva kollha jew xi parti essenzjali tagħha, bħar-rispons f'konċentrazzjonijiet baxxi sewwa, ħu għażla oħra ta' dħul ta' kurva — eż. kurva mhux simettrika bħall-funzjoni Weibul, minflok waħda simettrika. Inibizzjonijiet negattivi jistgħu jkunu problema ma, pereżempju, il-funzjoni ta' distribuzjoni tal-log-normali, li l-istess

tiddomanda funzjoni ta' regressjoni alternattiva. Ma huwiex rakkomandat li jiġi assenjat żero jew valur pożittiv żgħir lil tali valuri negattivi għaliex dan jgħawweġ id-distribuzzjoni tal-iżball. Jista' jkun adegwat li jsir dħul ta' kurvi separati fuq partijiet tal-kurva bħall-parti ta' inibizzjoni baxxa sabiex jiġu stmati figuri $EC_{low\ x}$. Ikkalkula mill-ekwazjoni mdaħħla (permezz ta' "estimazzjoni inversa", $C = f^{-1}(Y)$, stimi karatteristiċi ta' punt EC_x's, u rraporta bħala minimu l-EC_{50} u wieħed jew żewġ stimi $EC_{low\ x}$. Esperjenza minn testijiet prattiċi turi li l-preċiżjoni tat-test tal-alka normalment tħalli stima raġonevolment akkurata lejn livell ta' inibizzjoni ta' 10 % jekk punti ta' data huma suffiċjenti — sakemm ma jkunx hemm stimulazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxi bħala fattur li jfixkel. Il-preċiżjoni ta' stima EC_{20} hija ta' spiss konsiderevolment aħjar minn dik ta' EC_{10}, għaliex l-EC_{20} huwa ġeneralment ippożizzjonat fuq il-parti bejn wieħed u ieħor lineari tal-kurva ċentrali konċentrazzjoni rispons. Xi drabi huwa diffiċli li ssir interpretazzjoni ta' EC_{10} minħabba stimulazzjoni ta' tkabbir. Għalhekk, filwaqt li l-EC_{10} hija normalment miksuba b'akkurezza suffiċjenti, huwa wkoll rakkomandat li tirraporta dejjem l-EC_{20}.

Fatturi ta' użin

Il-varjanza esperimentali ma hijiex ġeneralment kostanti u tipikament tinkludi komponent proporzjonali, regressjoni miżuna hija għalhekk b'vantaġġ magħmula b'rutina. L-użin ta' fatturi għal tali analiżi huwa normalment assunt bi proporzjon invers għall-varjanza:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Ħafna programmi ta' regressjoni jħallu l-għażla ta' analiżi ta' regressjoni miżuna ma' fatturi miżuna mniżżla f'tavola. B'mod konvenjenti, l-użin ta' fatturi għandu jiġi normalizzat billi dan jiġi mmultiplikat b'$n/\Sigma\ w_i$ (n huwa l-għadd ta' punti ta' dejta) sabiex is-somma tagħhom tiġi wieħed.

Normalizzazzjoni ta' risposti

Normalizzazzjoni bir-rispons medja ta' kontroll tagħti problemi prinċipali u tagħti lok għal struttura ta' varjazzjoni xi ftit ikkumplikata. Bit-tqassim tar-risposti bir-rispons medja ta' kontroll sabiex jinkiseb il-persentaġġ ta' inibizzjoni, wieħed jintroduċi żball addizzjonali ikkawżat bi żball fuq il-medja ta' kontroll. Sakemm dan l-iżball mhuwiex żgħir tant li mhux ta' importanza, l-użin ta' fatturi fil-limiti ta' regressjoni u kunfidenza għandhom jiġu kkoreġuti għal kovarjanza mal-kontroll (17). Innota li preċiżjoni għolja fuq il-rispons medju ta' kontroll stmat hija importanti sabiex titnaqqas il-varjanza totali għar-rispons relattiv. Il-varjanza hija kif ġej:

sottoskritt I jirreferi għal-livell ta' konċentrazzjoni i u sottoskritt 0 għall-kontrolli)

$$Y_i = \text{Rispons relattiv} = r_i/r_0 = 1 — I = f\ (C_i)$$

b'varjanza:

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

u għax

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

b'dejta normalment distribwita u m_i u m_0 repliki:

$$Var(r_i) = \sigma^2/m_i$$

il-varjanza totali tar-rispons relattiva, Y_i għalhekk issir:

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

L-iżball fuq il-medja ta' kontroll huwa inversament proporzjonali għar-radiċi kwadrata tal-għadd tal-medja ta' repliki ta' kontroll u xi drabi jista' jkun ġustifikat li jinkludi dejta storika u b'dan il-mod inaqqas l-iżball bil-kbir. Proċedura alternattiva hija li ma tinnormalizzax d-dejta u ddaħħal ir-risposti assoluti, inkluż id-dejta ta' rispons ta' kontroll, imma li tintroduċi il-valur tar-rispons ta' kontroll bħala parametru addizzjonali sabiex jiġi mdaħħal ma' regressjoni non lineari. B'ekwazjoni tas-soltu ta' regressjoni ta' żewġ parametri, dan il-metodu jeħtieġ dħul ta' 3 parametri, u għalhekk jitlob aktar punti ta' dejta milli regressjoni non-lineari fuq dejta li hija normalizzata permezz ta' rispons ta' kontroll li hija ssetjata minn qabel.

Intervalli ta' kunfidenza inversa

Il-kalkulazzjoni ta' intervalli ta' kunfidenza ta' regressjoni li mhix lineari bi stima inversa huma xi ftit ikkomplikati u mhux għażla standard disponibbli f'pakketti ta' programmi ta' statistika ta' kompjuter ordinarju. Limiti ta' kunfidenza approssimattivi jistgħu jiġu miksuba ma' programmi standard ta' regressjoni non-lineari ma' riparametrizzazzjoni (Bruce u Versteeg, 1992), li jinvolvu l-kitba mill-ġdid tal-ekwazjoni matematika bil-punti ta' stima mixtieqa, eż. l-EC_{10} u l-EC_{50} bħala parametri li għandhom jiġu stmati. (Ħalli l-funzjoni tkun I = f' (α, β, konċentrazzjoni) u utilizza r-relazzjonijiet tad-definizzjoni f'(α, β, EC_{10}) = 0.1 u f (α, β, EC_{50}) = 0.5 sabiex tissostitwixxi f'(α, β, konċentrazzjoni) b'funzjoni ekwivalenti g (EC_{10}, EC_{50}, konċentrazzjoni).

Kalkulazzjoni aktar diretta (Andersen et al, 1998) hija magħmula permezz taż-żamma tal-ekwazjoni oriġinali u l-użu ta' espansjoni ta' Taylor madwar il-medji ta' r_i u r_0

Reċentement metodi "boot strap" saru popolari. Tali metodi jużaw id-dejta mkejla u ġeneratur ta' numru kif ġie ġie li jiddirezjona rikampjunar ta' spiss, sabiex jistmaw varjazzjoni tad-distribuzzjoni empirika.

Letteratura

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): Konċentrazzjonijiet bla effett f'testijiet ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka. Riċerka tal-ilma, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. u Versteeg, D.J.(1992) Proċedura Statistika għall-Immudellar Kontinwu ta' Dejta Ekotossikoloġika. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Dejta ekotossikoloġika kontinwa valutata relattivament ma' rispons ta' kontroll. Ġurnal ta' Statistiċi, Agrikoli, Bijoloġiċi u Ambjentali, 3, 405-420.

ANNESS V

C.25. MINERALIZZAZZJONI LI TEĦTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRADAZZJONI

1. METODU

Dan il-metodu hu ekwivalenti għall-*OECD* TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test hu li jkejjel iż-żmien meħtieġ għall-bijodegradazzjoni ta' sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa fl-ilma naturali li jkun jeħtieġ l-ossiġnu u biex jikkwantifika l-osservazzjonijiet f'forma ta' espressjonijiet tar-rata tal-moviment. Dan it-test simulatorju huwa test li jsir fil-laboratorju billi jiġi mhawwad važett ħalli jkunu magħrufa r-rati ta' bijodegradazzjoni li teħtieġ l-ossiġnu ta' sustanzi organiċi f'kampjuni ta' ilma naturali tal-wiċċ (frisk, ftit mielaħ jew ilma baħar). Hu bbażat fuq l-ISO/DIS 14592-1 (2) u jinkludi wkoll elementi mill-metodi tat-test Ċ.23 u Ċ.24 (3)(4). Hemm l-għażla li, b'ħinijiet twal tat-test, operazzjoni semi-kontinwa tieħu post l-operazzjoni fuq grupp sabiex tipprevjeni d-deterjorament tal-mikrokosmu taħt test. L-għan prinċipali tat-test simulatorju hu biex tkun magħrufa l-mineralizzazzjoni tas-sustanza użata għat-test fl-ilma tal-wiċċ, u l-mineralizzazzjoni hi l-bażi ta' kif tiġi espressa d-diżintegrazzjoni tal-movimenti. Madankollu, it-test jista' jkollu għan ieħor sekondarju biex tinkiseb informazzjoni dwar id-diżintegrazzjoni ewlenija u l-formazzjoni ta' prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni. L-identifikazzjoni ta' prodotti ta' trasformazzjoni, u fejn hu possibbli l-kwantifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tagħhom, huma tassew importanti għal sustanzi li jiġu mineralizzati bil-mod ħafna (eż. fil-każ ta' nofs ħajjiet għas-sustanzi totali li jifdal wara l-evaporazzjoni ^{14}C li jaqbżu is-60 ġurnata). Konċentrazzjonijiet ogħla tas-sustanza użata għat-test (eż., > 100 µg/l) għandhom jintużaw normalment biex ikunu identifikati u kwantifikati prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri minħabba limitazzjonijiet analitiċi.

Konċentrazzjoni baxxa f'dan it-test tfisser konċentrazzjoni (eż. inqas minn 1 µg/l sa 100 µg/l) li hi baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni miksuba fit-test jirriflettu dawk li wieħed jistenna li jkun hemm fl-ambjent. Meta mqabbla mal-piż totali tas-sottostrati tal-karbonju bijodegradabbli li hemm fl-ilma naturali użat għat-test, is-sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa se sservi bħala sottostrata oħra. Dan jimplika li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni antiċipati huma tal-ewwel ordni (movimenti "li ma jikbrux") u li s-sustanza użata għat-test tista' tiġi ddegradata permezz ta' "kometaboliżmu". Movimenti tal-ewwel ordni jimplikaw li r-rata tad-diżintegrazzjoni (mg/L/kull ġurnata) hija proporzjonali mal-konċentrazzjoni tas-sottostrata li tonqos maż-żmien. Fil-każ tal-movimenti tal-ewwel ordni r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni speċifika, k, ma tiddependix fuq iż-żmien u l-konċentrazzjoni. Dan ifisser li, k ma tvarjax ħafna matul l-esperiment u lanqas tinbidel bil-konċentrazzjoni miż-juda waqt l-esperimenti. Skont id-definizzjoni, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni speċifika hija ugwali għall-bidla relattiva fil-konċentrazzjoni biż-żmien: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Għalkemm wieħed jistenna li l-movimenti tal-ewwel ordni jkunu normalment taħt il-kundizzjonijiet preskritti, jista' jkun hemm ċerti ċirkustanzi fejn movimenti oħra huma aktar addattati. Id-devjazzjonijiet mill-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu eż. jiġu osservati jekk il-fenomeni tat-trasferiment tal-piż bħar-rata tat-tifrix, aktar milli r-rata tar-reazzjoni bijoloġika, tkun qed tillimita r-rata tal-bijotrasformazzjoni. Madankollu, id-data tista' kważi dejjem tkun deskritta minn movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu li jaċċettaw kostanti tar-rata ta' konċentrazzjoni dipendenti.

Informazzjoni dwar il-bijodegradabbiltà tas-sustanza użata għat-test f'konċentrazzjonijiet ogħla (eż. mit-testijiet standard ta' *screening*) kif ukoll informazzjoni dwar id-degradabbiltà li mhix ta' natura bijoloġika, prodotti ta' trasformazzjoni u karatteristiċi fiżiko-kemikali relevanti għandhom ikunu disponibbli qabel it-test biex ikun jista' jiġi stabbilit l-ippjanar esperimentali u jiġu interpretati r-riżultati. L-użu ta' sustanzi għat-test imsemmija ^{14}C u l-għarfien tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C fl-aħħar tat-test, għandhom jgħinu biex tkun magħrufa l-bijodegradabbiltà finali. Meta tkun użata sustanza għat-test li ma ngħatatx isem, il-bijodegradazzjoni finali tista' tkun stmata biss jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni ogħla u l-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri kollha jkunu magħrufa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Bijodegradazzjoni primarja: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef l-identità kimika.

Bijodegradazzjoni funzjonali: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef karatteristika speċifika.

Bijodegradazzjoni li tkun teħtieġ l-ossiġnu finali: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi meta jkun hemm l-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali u xi elementi oħra (mineralizzazzjoni) preżenti u l-ħolqien tal-piż totali ta' l-organiżmi u prodotti organiċi li fihom bijosinteżi tal-mikroorganiżmi ġodda.

Mineralizzazzjoni: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika f'materja organika minħabba l-mikroorganiżmi li hemm fl-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali ta' xi elementi oħra preżenti.

Fażi tad-dewmien: Il-ħin minn meta jibda test sakemm jintlaħaq l-addattament tad-degradar tal-mikro organiżmi u l-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika żdied għal livell li jista' jkun magħruf (eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew inqas, jiddependi minn kemm hi preċiża t-teknika tal-kejl).

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni: L-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika f'test, irrekordjata f'perċentwal, li 'l fuq minnu ma ssirx aktar bijodegradazzjoni waqt it-test.

Sottostrata primarja: Ġabra ta' karbonju naturali u sorsi ta' enerġija li jkabbru u jżommu l-piż totali tal-organiżmi mikrobjali.

Sottostrata sekondarja: Komponent tas-sottostrata li hemm f'dik il-konċentrazzjoni baxxa, li bid-diżintegrazzjoni tiegħu, ammonti żgħar ħafna ta' karbonju u enerġija jiġu mgħoddija lill-mikroorganiżmi kompetenti, meta mqabbla mal-karbonju u l-enerġija mogħtija mid-diżintegrazzjoni tal-komponenti tas-sottostrata ewlenija (sottostrati primarji).

Ir-rata tad-diżintegrazzjoni kostanti: Rata tal-moviment kostanti tal-ewwel ordni jew li tixbaħha, k (d^{-1}), li tindika r-rata tal-proċessi tad-diżintegrazzjoni. Għal esperiment fuq grupp k hi stmata mill-parti tal-bidu tal-kurva tad-diżintegrazzjoni miksuba wara li tintemm il-fażi tad-dewmien.

Nofs ħajja, $t_{1/2}$ (d): Terminu użat biex jikkaratterizza r-rata tar-reazzjoni tal-ewwel ordni. Hu l-intervall tal-ħin li jikkorrispondi għal tnaqqis fil-konċentrazzjoni b'fattur 2. In-nofs ħajja u l-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni huma marbuta ma' l-ekwazzjoni $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Il-brejk tad-diżintegrazzjoni, DT_{50} (d): Terminu użat biex jikkwantifika r-riżultat tat-testijiet tal-bijodegradazzjoni. Huwa l-intervall ta' ħin, inkluż il-fażi tad-dewmien, meħtieġ biex jintlaħaq valur ta' 50 % bijodegradazzjoni.

Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) u l-limitu tal-kwantifikazzjoni (*LOQ*): Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-identità tas-sustanza ma tkunx tista' tintgħaraf mill-karatteristiċi li ddaħħlu fil-preparazzjoni għall-analiżi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-konċentrazzjoni ma tistax tkun magħrufa bi preċiżjoni aċċettabbli.

Karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*): Dik il-parti tal-karbonju organiku f'kampjun ta' ilma li ma tistax titneħħa b'fażi ta' separazzjoni speċifika, per eżempju b'azzjoni ċentrifuga permezz ta' magna f'40 000 ms^{-2} għal 15-il min jew bl-iffiltrar tal-membrana billi jintużaw membrani li fihom pori b'dijametru ta' 0,2 μm-0,45 μm.

L-attività organika ^{14}C totali (*TOA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku.

L-attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma (*DOA*): L-attività totali organika ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku maħlul fl-ilma.

L-attività organika ^{14}C f'forma ta' *partikuli* separati (*POA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku f'forma ta' *partikuli* separati.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan it-test simulatorju japplika għal sustanzi organiċi li ma jevaporawx malajr jew jevaporaw xi ftit malajr ittestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. Permezz ta' fliexken miftuħa għall-arja (eż. tajjar imdeffes), sustanzi bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* inqas minn madwar 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (madwar 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) jistgħu jitqiesu li ma jevaporawx malajr fil-prattika. Permezz ta' fliexken magħluqa bl-ispazju fuq, hu possibbli li jiġu ttestjati sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr (bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) mingħajr telf fis-sistema tat-test. Jista' jkun hemm telf tas-sustanzi msejħa ^{14}C, jekk ma jittieħdux il-prekawzjonijiet ġusti, meta jitneħħa s-CO_2. F'dawk is-sitwazzjonijiet, jista' jkun hemm bżonn li s-CO_2 jinqabad ġo assorbitur intern bl-*alkali* jew li tintuża sistema esterna li tassorbi s-CO_2 (għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$; ara Anness 3). Biex ikunu magħrufa l-movimenti tal-bijodegradazzjoni, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza użata għat-test iridu jkunu taħt meta tinħall fl-ilma. Ta' min jinnota, iżda, li l-valuri tal-letteratura ta' meta jinħall fl-ilma jistgħu jkunu ogħla sew minn meta tinħall is-sustanza użata għat-test fl-ilmijiet naturali. Hemm l-għażla li tiġi stabbilita s-solubilità ta' sustanzi tat-test partikolari li ma tantx jinħallu fl-ilma permezz tal-ilmijiet naturali li jkunu qed jiġu ttestjati.

Il-metodu jista' jkun użat biex tiġi simulata l-bijodegradazzjoni fl-ilma tal-wiċċ li ma jkunx fih partikuli ħorox ("test li jsir fil-baħar miftuħ") jew fil-wiċċ tal-ilma mhux ċar, eż. li jista' jkun hemm ħdejn post fejn l-ilma jiltaqa' man-naqal ("test sospiż tan-naqal").

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test isir fi grupp billi s-sustanza użata għat-test tiġi żviluppata fiha l-batteri jew mill-ilma tal-wiċċ biss ("test li jsir fil-baħar miftuħ") jew ilma miżjud b'solidi/naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq ta' 0,01 sa lg/L użin xott ("test sospiż" tan-naqal biex ikun jixbah *body* tal-ilma miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq jew naqal li jerġa' jkun sospiż bejn il-qiegħ u fuq. Is-solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq/il-konċentrazzjoni tan-naqal fil-firxa t'isfel ta' dan l-intervall hi tipika għal ħafna ilmijiet fil-wiċċ. Il-fliexken tat-test tiżviluppata fihom batteri fid-dlam f'temperatura ambjentali taħt kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu u l-aġitazzjoni. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għandhom jintużaw sabiex jiġu ddeterminati l-movimenti tad-diżintegrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet għandhom ivarjaw minn xulxin b'fattur ta' 5 sa 10 u għandhom jirrappreżentaw il-firxa mistennija ta' konċentrazzjonijiet fl-ambjent. Il-konċentrazzjoni massima tas-sustanza tat-test m'għandhiex teċċedi 100 µg/L, iżda l-konċentrazzjonijiet massimi tat-test taħt 10 µg/L jew inqas huma preferuti biex ikun żgurat li l-bijodegradazzjoni ssegwi l-movimenti tal-ewwel ordni. L-ibaxx konċentrazzjoni m'għandhiex teċċedi 10 µg/L, iżda l-ibaxx konċentrazzjonijiet tat-test ta' 1-2 µg/L jew inqas minn 1 µg/L huma preferuti. Normalment analiżi adegwata ta' dik il-konċentrazzjoni baxxa tista' tintlaħaq bl-użu ta' sustanzi msejħa ^{14}C li ssib tixtriħom. Minħabba l-limitazzjonijiet analitiċi, ta' spiss ikun impossibbli li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test bil-preċiżjoni meħtieġa, jekk is-sustanza tat-test hi applikata f'konċentrazzjoni ta'≤ 100 µg/L (ara t-tieni paragrafu f'sezzjoni 1.7.2.). Konċentrazzjonijiet ogħla ta' sustanzi użati għat-test (> 100 µg/L u xi kultant > 1 mg/L) jistgħu jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta' prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri jew jekk m'hemmx metodu ta' analiżi speċifiku b'limitu baxx li jiddittektja. Jekk ikunu ttestjati konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, jista' ma jkunx possibbli li r-riżultati jintużaw biex tkun stmata l-kostanti tad-diżintegrazzjoni tal-ewwel ordni u n-nofs ħajja, għax id-diżintegrazzjoni probabbilment ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni.

Id-diżintegrazzjoni tkun segwita f'intervalli tal-ħin addattati, billi titkejjel jew is-sustanza li jkun fadal wara l-evaporazzjoni ^{14}C jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test meta tintuża analiżi kimika speċifika. L-għoti tal-isem ^{14}C tal-aktar parti stabbli tal-molekula jiżgura li tkun determinata l-mineralizzazzjoni totali, filwaqt li l-għoti ta' l-isem ^{14}C ta' parti inqas stabbli tal-molekula, kif ukoll l-użu ta' analiżi speċifika, jagħti lok għal evalwazzjoni tal-bijodegradazzjoni primarja biss. Madankollu, l-aktar parti stabbli mhux neċessarjament tinkludi n-nofs funzjonali relevanti tal-molekula (li tista' tkun relatata ma' karatteristika speċifika bħat-tossiċità, il-bijoakkumulazzjoni, eċċ.) Jekk hekk ikun il-każ, ikun xieraq li tintuża sustanza tat-test, imsemmija ^{14}C, fil-parti funzjonali sabiex issegwi t-tneħħija tal-karatteristika speċifika.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Kemm is-sustanzi tat-test li ġew immarkati permezz ta' raġġi (*radiolabelled*)kif ukoll dawk li ma ġewx mogħtija isem jistgħu jintużaw f'dan it-test. It-teknika tal-għoti tal-isem ^{14}C hi rakkomandata u l-għoti tal-isem għandu jsir normalment fl-aktar parti(jiet) stabbli tal-molekula (ara anki sezzjoni 1.4.). Għal sustanzi li fihom aktar minn ċirku li mhux saturizzat bl-umdità, karbonju wieħed jew aktar f'kull ċirku għandu preferebbilment ikun mogħti l-isem ^{14}C. Barra minn hekk, karbonju wieħed jew aktar fuq iż-żewġ naħat ta' għaqdiet li jistgħu jiġu diżintegrati faċilment għandhom preferibbilment ikollhom l-isem ^{14}C. Il-purità kimika u/jew radjokimika tas-sustanza tat-test għandha tkun > 95 %. Għal sustanzi mmarkati permezz ta' raġġi, attività speċifika ta' madwar 50 µCi/mg (1,85 MBq) jew aktar hi preferuta sabiex tiffaċilita l-kejl ^{14}C f'testijiet li jsiru b'konċentrazzjonijiet baxxi fil-bidu. Għandu jkun hemm l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza użata għat-test:

— is-solubilità fl-ilma [Metodu A6];

— is-solubilità f'aġent(i) organiku li jinħall (sustanzi applikati bl-aġent li jinħall jew li ma tantx jinħallu fl-ilma);

— il-kostanti dikompost (pKa) jekk is-sustanza għandha tendenza għal *protonation* jew *deprotonation* [*OECD TG* 112] (5);

— il-pressjoni tal-fwar [Metodu A.4] u l-liġi ta' *Henry* kostanti;

— stabbilità kimika fl-ilma u fid-dlam (idrolisi) [Metodu C.7].

Meta sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma jkunu qed jiġu ttestjati fl-ilma baħar, ta' min ikun jaf il-kostanti tat-tneħħija tal-melħ (jew "il-kostanti *Setschenow*") K^s, li huma mfissra permezz tal-espressjoni: log (S/S') = K^s C_m, fejn S u S' huma kemm tinħall is-sustanza fl-ilma pur u l-ilma baħar, rispettivament, u C_m hija l-konċentrazzjoni *molar* tal-melħ.

Jekk it-test isir bħala "test tan-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u fuq" l-informazzjoni li ġejja għandha tkun disponibbli:

— koeffiċjent tad-diviżjoni *n-octanol*/ilma [Metodu A.8];

— koeffiċjent ta' kemm il-molekuli jżommu fil-wiċċ ta' likwidu (*absorption coefficient*) [Metodu C.18];

Informazzjoni oħra utli tista' tinkludi:

— il-konċentrazzjoni ambjentali, jekk tkun magħrufa jew stmata;

— it-tossiċità tas-sustanza użata għat-test għall-mikroorganiżmi [Metodu C.11];

— bijodegraddibiltà lesta u/jew li teżisti fiha [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];

— studji dwar il-bijodegradabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu fl-ilma jew li ma teħtieġx ossiġnu fil-ħamrija u fil-bidla tan-naqal/l-ilma [Metodi C.23, C.24].

1.6. SUSTANZA UŻATA BĦALA REFERENZA

Sustanza, li tista' tiddiżintegra faċilment f'kundizzjonijiet li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma (eż. l-*aniline* jew *is-sodium benzoate*) għandha tintuża bħala sustanza ta' referenza. L-intervall ta' ħin mistenni għad-diżintegrazzjoni tal-*aniline* u tas-*sodium benzoate* huwa normalment inqas minn ġimagħtejn. L-iskop tas-sustanzi użati bħala referenza hu li jkun żgurat li l-attività tal-mikroorganiżmi ta' l-ilma użat għat-test hi f'ċerti limiti; jiġifieri li l-ilma fih popolazzjoni attiva ta' mikroorganiżmi.

1.7. KRITERJI DWAR IL-KWALITA'

1.7.1. **Irkuprar**

Hekk kif tiġi miżjuda s-sustanza użata għat-test, kull test tal-konċentrazzjoni tal-bidu għandu jiġi vverifikat billi titkejjel l-attività ^{14}C, jew permezz ta' analiżi kimika fil-każ ta' sustanzi li m'għandhomx isem, f'tal-inqas kampjuni doppji. Dan jagħti informazzjoni dwar kemm għandu jkun applikat u kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku kif ukoll dwar kemm hu uniformi t-tqassim tas-sustanza użata għat-test. Normalment, l-attività ^{14}C inizjali jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jintużaw fl-analiżi sussegwenti tad-data aktar milli l-konċentrazzjoni nominali bħala telf minħabba s-*sorption* u żbalji fid-daqs tad-dożi jiġu kumpensati. Għas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C, il-livell ta' irkuprar fl-aħħar tal-esperiment hu mogħti bil-bilanċ fil-piż (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Idealment, il-bilanċ tal-piż immarkat permezz ta' raġġi għandu jestendi minn 90 % għal 110 %, filwaqt li l-preċiżjoni analitika għandha twassal għal irkuprar tal-bidu bejn 70 % u 110 % għal sustanzi tat-test li m'għandhomx isem. Dawn il-firxiet għandhom ikunu interpretati bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test. Il-preċiżjoni analitika tista' tiġi ddeterminata ukoll għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni ibaxx mill-konċentrazzjoni tal-bidu u għall-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri.

1.7.2. **Kemm għandu jiġi mtenni u kemm hu sensittiv il-metodu analitiku**

Kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku (inkluż l-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-bidu) biex tiġi kwantifikata s-sustanza tat-test, u l-prodotti ta' trasformazzjoni, jekk jixraq, għandu jkun iċċekkjat billi jkun hemm ħames analiżi l-istess tal-estratti individwali tal-ilma tal-wiċċ.

Il-limitu ta' għarfien (*LOD*) tal-metodu analitiku għas-sustanza użata għat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 1 % tal-ammont tal-bidu applikat lis-sistema tat-test jekk hu possibbli. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) għandu jkun daqs jew inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni applikata. L-analiżi kimika ta' ħafna sustanzi organiċi u l-prodotti tat-trasformazzjoni tagħhom ta' spiss jeħtieġu li s-sustanza użata għat-test tkun applikata f'konċentrazzjoni kemm xejn għolja, jiġifieri > 100 μg/L.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Tagħmir**

It-test jista' jsir fi fliexken forma ta' lembut jew forma ta' ċilindru tad-daqs addattat (eż. li jesgħu 0,5 jew 1,0 litru) magħluqa b'tappijiet tas-silikon jew lastku, jew fi fliexken tas-*serum* b'għotjien li ma joħroġx minnhom CO_2 (eż. b'għeluq tal-lastku sintetiku). Inkella t-test jista' jsir bl-użu ta' ħafna fliexken u bl-osservazzjoni tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha, ta' l-inqas darbtejn, f'kull intervall tal-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1). Għas-sustanzi tat-test li ma jevaporawx malajr u li mhumiex immarkati bir-raġġi, m'hemmx bżonn ta' tappijiet jew għotjien li ma joħroġx gass minnhom; biċċiet tat-tajjar li ma jagħtux lok li jkun hemm kontaminazzjoni mill-arja huma addattati (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.). Sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr għandhom ikunu ttestjati f'sistema tat-tip tal-*bijometer* billi jitħawwad bil-mod l-ilma tal-wiċċ. Biex ikun żgurat li ma ssirx

kontaminazzjoni mill-batterji, il-kontenituri jistgħu jiġu sterilizzati billi jissaħħnu jew jiġu stimjati qabel ma jintużaw. Barra minn hekk, it-tagħmir standard tal-laboratorju li ġej huwa użat:

— mejda li tittriegħed jew oġġetti li jħalltu manjetiċi biex ikun hemm ċaqliq kontinwu tal-fliexken użati għat-test,

— magna ċentrifuga,

— pH meter,

— *turbidimeter* biex ikejjel konċentrazzjoni tal-frak tat-tajn,

— forn jew majkrowejv biex ikun magħruf il-piż xott,

— apparat li jissepara l-membrana,

— sterilizzatur li juża' stim bi pressjoni għolja jew forn biex jisterilizza bis-sħana l-kontenituri tal-ħġieġ,

— faċilitijiet biex jimmaniġġjaw is-sustanzi mmarkati ^{14}C,

— tagħmir biex tiġi kwantifikata l-attività ^{14}C f'kampjuni mit-taħlitiet li jaqbdu s-CO_2 u, jekk hemm bżonn, mill-kampjuni tan-naqal,

— tagħmir analitiku biex tkun magħrufa s-sustanza użata għat-test (jew is-sustanza ta' referenza) jekk tintuża' analiżi kimika speċifika (eż. dak li jifred il-gass f'taħlita, dak li jifred il-likwidu bi pressjoni għolja).

1.8.2. **Taħlitiet tal-kwantità tas-sustanza tat-test**

Ilma mingħajr *ions* użat biex jiġu ppreparati t-taħlitiet tal-kwantità tat-test u s-sustanzi ta' referenza (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.7). L-ilma mingħajr *ions* m'għandux ikun fih sustanzi li jistgħu jkunu tossiċi għall-mikroorganiżmi, u l-karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*) m'għandux ikun aktar minn 1 mg/L (6).

1.8.3. **Ġbir u ġarr tal-ilma tal-wiċċ**

Il-post fejn jittieħdu l-kampjuni għall-ġbir tal-ilma tal-wiċċ għandu jintgħażel skont l-għan tat-test f'kull sitwazzjoni partikolari. Meta jintgħażlu l-postijiet fejn għandhom jittieħdu l-kampjuni, għandha titqies l-istorja ta' kontribut agrikolu, industrijali jew domestiku li jista' jkun hemm. Jekk ikun magħruf li ambjent akwatiku ġie kkontaminat bis-sustanza tat-test jew l-analogu strutturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, m'għandux jintuża' għall-ġbir ta' ilma għat-test, sakemm l-investigazzjoni tar-rati ta' diżintegrazzjoni f'postijiet li kienu esposti qabel huwa l-għan dikjatur ta' l-investigatur. Il-*pH* u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu mkejla fil-post tal-ġbir. Barra minn hekk, il-fond tat-teħid tal-kampun u d-dehra tal-kampjun tal-ilma (eż. kulur u nuqqas ta' ċarezza) għandhom jiġu nnutati (ara sezzjoni 3). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu u/jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis fl-ilma u fis-saff tan-naqal tal-wiċċ għandu jitkejjel sabiex juri l-kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma sakemm dan ma jkunx ovvju mid-dehra u mill-esperjenza storika tal-post. L-ilma tal-wiċċ għandu jinġarr f'kontenitur li hu mnaddaf sew. Waqt il-ġarr, it-temperatura tal-kampjun m'għandhiex teċċedi b'mod sinifikanti t-temperatura użata fit-test. Hu rakkomandat li tiġi mkessħa għal temperatura ta' 4 °C waqt il-ġarr jekk idum aktar minn 2 jew 3 sigħat. Il-kampjun tal-ilma m'għandux ikun iffriżat.

1.8.4. **Il-ħżin u l-preparazzjoni tal-ilma tal-wiċċ**

It-test għandu jibda preferibbilment fi żmien ġurnata wara li jinġabar il-kampjun. Il-ħżin tal-ilma, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u għall-ebda raġuni m'għandu jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat. Il-kampjun tal-ilma għandu jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat b'gas sakemm jintuża. Qabel ma jintuża, il-partijiet l-irqaq ħorox għandhom jitneħħew, eż. billi jiġu iffiltrati minn ġo filter tan-najlon li x-xibka tiegħu tkun daqs 100 µm jew b'filter tal-karta ħoxna, jew billi jitħalla joqgħod ħalli n-naqal jinżel fil-qiegħ.

1.8.5. **Il-preparazzjoni tal-ilma miżjud bin-naqal (mhux obbligatorja)**

Għat-test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, in-naqal tal-wiċċ jiġi miżjud fil-fliexken li fihom ilma naturali (iffiltrat biex jitneħħew il-frak ħorox kif deskritt fis-sezzjoni 1.8.4.) biex tinkiseb is-sospensjoni; il-konċentrazzjoni ta' solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq għandha tkun bejn 0,01 u 1 g/L. In-naqal tal-wiċċ għandu jkun ta' l-istess post minn fejn ittieħed il-kampjun ta' l-ilma. Skont l-ambjent akwatiku partikulari, in-naqal tal-wiċċ jista' jew ikun karatterizzat minn kontenut għoli ta' karbonju organiku (2.5-7.5 %) u konsistenza fina jew minn kontenut baxx ta' karbonju organiku (0.5-2.5 %) u konsistenza ħarxa (3). In-naqal tal-wiċċ jista' jiġi preparat kif ġej: ħu diversi biċċiet min-nofs tan-naqal billi tuża tubu trasparenti tal-plastik, neħħilu s-saffi ta' fuq li

jeħtieġu l-ossiġnu (mill-wiċċ sa fond ta' massimu ta' 5 mm) eżatt wara li jittieħed il-kampjun u itfagħhom flimkien. Il-kampjun li joħroġ tan-naqal għandu jinġarr ġo kontenitur li l-parti ta' fuq tiegħu hi kbira biżżejjed għall-arja biex iżomm lin-naqal f'kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu (kessħu għal 4 °C jekk il-ġarr idum aktar minn 2-3 sigħat). Il-kampjun tan-naqal għandu jinżamm bejn il-qiegħ u l-wiċċ fl-ilma tat-test fi proporzjon ta' 1:10 u jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat bil-gass sakemm jintuża. Il-ħżin tan-naqal, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u m'għandux jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat.

1.8.6. **Proċedura semi-kontinwa (mhux obbligatorja)**

L-inkubazzjoni fit-tul (diversi xhur) tista' tkun meħtieġa jekk il-perjodu tad-dewmien isir qabel ma tkun tista' titkejjel diżintegrazzjoni sinifikanti tas-sustanza tat-test. Jekk din tkun magħrufa minn testijiet imgħoddija tas-sustanza, it-test jista' jinbeda permezz tal-proċedura semi-kontinwa, li tagħti lok għal tiġdid perjodiku ta' parti mill-ilma tat-test jew mis-sospensjoni (ara Anness 2). Inkella, it-test normali fuq grupp jista' jinbidel b'test semi-kontinwu, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test intlaħqet matul madwar 60 ġurnata ta' testjar billi ntużat il-proċedura tal-grupp (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.8.3).

1.8.7. **Żieda tas-sustanza tat-test (jew ta' referenza)**

Għal dawk is-sustanzi li jinħallu malajr fl-ilma (> 1 mg/L) u jevaporaw ftit (bir-regola ta' *Henry* kostanti < 1 Pa·m^3/mol jew < 10^{-5} atm·m^3/mol), taħlita tal-kwantità tista' tiġi ppreparata fl-ilma mingħajr *ions* (ara sezzjoni 1.8.2); il-volum addattat tal-kwantità jiġi miżjud fil-kontenituri tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa. Il-volum ta' xi kwantità tat-taħlita għandu jkun il-minimu prattiku (< 10 % tal-volum tal-likwidu finali, jekk jista' jkun). Proċedura oħra hi li s-sustanza tat-test tiġi maħlula f'volum akbar ta' ilma tat-test, li tista' tidher bħala alternattiva għall-użu ta' aġenti orġaniċi li jinħallu.

Jekk ma jkunx possibbli, it-taħlitiet tal-kwantità ta' sustanzi li ma jevaporawx malajr u li ma jinħallux malajr fl-ilma għandhom ikunu preparati permezz ta' aġent organiku li jinħall u li jevapora malajr, iżda l-ammont tal-aġent li jinħall miżjuda mas-sistema tat-test m'għandux jeċċedi il-1 % v/v u m'għandux iħalli effetti ħżiena fuq l-attività tal-mikroorganiżmi. L-aġent li jinħall m'għandux jaffettwa l-istabbilità tas-sustanza tat-test fl-ilma. L-aġent li jinħall m'għandux jitneħħa fi kwantità żgħira tant li ma żżidx b'mod sinifikanti l-konċentrazzjoni *DOC* ta' l-ilma tat-test jew is-sospensjoni. Dan għandu jkun iċċekkjat bl-analiżi tas-sustanza speċifika jew, jekk jista' jkun, permezz ta' analiżi *DOC* (6). Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi llimitat l-ammont ta' aġent li jinħall trasferit għal dak li hu assolutament neċessarju, u biex ikun żgurat li l-ammont tas-sustanza tat-test tista' tinħall fil-volum finali ta' l-ilma tat-test. Jistgħu jintużaw tekniki oħra biex tiddaħħal is-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test kif deskritt f'(7) u (8). Meta aġent organiku li jinħall jintuża għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, il-kontrolli tal-aġent li jinħall li fihom l-ilma tat-test (mingħajr żidiet) u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza miżjuda għandhom ikunu ttrattati bl-istess mod bħall-kontenituri attivi tat-test miżjuda bis-sustanza tat-test f'dak li jġorr l-aġent li jinħall. L-iskop tal-kontrolli tal-aġent li jinħall hu biex jiġu eżaminati xi effetti negattivi li jistgħu jkunu kkawżati mill-aġent li jinħall fuq il-popolazzjoni tal-mikroorganiżmi kif indikat mid-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

1.8.8. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.8.8.1. *Temperatura tat-test*

L-inkubazzjoni għandha ssir fid-dlam (preferibbilment) jew f'dawl batut b'temperatura kkontrollata (± 2 °C), li tista' tkun it-temperatura tal-esperiment jew it-temperatura standard ta' 20-25 °C. It-temperatura tal-esperiment tista' tkun jew it-temperatura proprja tal-kampjun ta' meta jittieħed il-kampjun jew it-temperatura medja tal-esperiment fil-post fejn jittieħed il-kampjun.

1.8.8.2. *Ċaqliq*

Iċ-ċaqliq permezz ta' ċaqliq jew tħawwid kontinwu għandu jsir biex il-partikuli ż-żgħar u l-mikroorganiżmi jkunu miżmuma xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ. Iċ-ċaqliq jgħin ukoll biex jiġi trasferit l-ossiġnu mill-parti ta' fuq għal-likwidu sabiex il-kundizzjonijiet fejn ikun meħtieġ l-ossiġnu jistgħu jinżammu b'mod adegwat. Qiegħed il-fliexken fuq mejda li titriegħed (madwar 100 rpm ta' ċaqliq) jew uża xi ħaġa manjetika biex tħawwad. Iċ-ċaqliq irid ikun kontinwu. Iżda, iċ-ċaqliq jew it-tħawwid għandu jsir bil-mod kemm jista' jkun, filwaqt li jinżamm f'livell uniformi x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

1.8.8.3. *Tul tat-test*

It-test m'għandux idum aktar minn 60 jum sakemm ma tkunx qed tiġi applikata l-proċedura semi-kontinwa bit-tiġdid perjodiku tat-test ta' sospensjoni (ara sezzjoni 1.8.6 u Anness 2). Madankollu, il-perjodu tat-test għat-test tal-grupp jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 ġurnata, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 jum. Id-diżintegrazzjoni hi monitorjata, f'intervalli tal-ħin addattati, billi tkun magħrufa l-attività ^{14}C tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni jew $^{14}CO_2$ evolut (ara sezzjoni 1.8.9.4) u/jew permezz ta' analiżi kimika (sezzjoni 1.8.9.5). Il-ħin tal-inkubazzjoni għandu jkun twil biżżejjed biex jevalwa l-proċess ta' diżintegrazzjoni. L-ammont ta' diżintegrazzjoni preferibbilment għandu jeċċedi 50 %; għas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod, l-ammont ta' diżintegrazzjoni għandu jkun biżżejjed (normalment aktar minn 20 % diżintegrazzjoni) sabiex jiżgura li tiġi stmata r-rata kostanti ta' diżintegrazzjoni tal-moviment.

Kejl perjodu tal-*pH* u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu fis-sistema tat-test għandu jsir sakemm dan ma jkunx meħtieġ minħabba esperjenzi mgħoddija minn testi simili bil-kampjuni ta' l-ilma u n-naqal miġbura mill-istess post. Taħt xi kundizzjonijiet, il-metaboliżmu tas-sottostrati primarji f'konċentrazzjonijiet aktar għolja fl-ilma jew in-naqal jistgħu jwasslu għall-evoluzzjoni biżżejjed tas-CO_2 u t-tneħħija tal-ossiġnu biex li jbiddlu b'mod sinifikanti l-kundizzjonijiet esperimentali waqt it-test.

1.8.9. **Il-Proċedura**

1.8.9.1. *Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test fil-baħar miftuħ*

Ittrasferixxi volum addattat ta' ilma tat-test fil-fliexken tat-test, sa qisu terz tal-volum tal-flixkun u mhux anqas minn madwar 100 ml. Jekk jintużaw diversi fliexken (biex ikunu jistgħu jiġu magħrufa l-konsegwenzi tal-fliexken kollha kull meta jittieħdu l-kampjuni), il-volum addattat tal-ilma tat-test hu kważi wkoll ta' madwar 100 ml, għaliex volumi żgħar tal-kampjuni jistgħu jinfluwenzaw it-tul tal-fażi tad-dewmien. Is-sustanza tat-test hi miżjuda mit-taħlita tal-kwantità kif deskritta fis-sezzjonijiet 1.8.2 u 1.8.7. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test li jvarjaw b'fattur ta' 5 sa 10 għandhom jintużaw sabiex ikunu magħrufa l-movimenti tad-diżintegrazzjoni u biex tiġi kalkolata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni tal-moviment. Iż-żewġ konċentrazzjonijiet magħżula għandhom ikunu inqas minn 100 µg/L u preferibbilment inqas minn < 1-10 µg/L.

Agħlaq il-fliexken bit-tappijiet jew għotjien li minnhom ma tistax tgħaddi arja u CO_2. Għall-kimiċi tat-test li ma jevaporawx ta' ^{14}C li m'għandhomx isem, biċċiet tat-tajjar huma addattati biex jintużaw bħala tappijiet biex jevitaw kontaminazzjoni mill-arja (ara sezzjoni 1.8.1) dejjem jekk xi prodotti maġġuri ta' diżintegrazzjoni huma magħrufa li ma jevaporawx, u jekk tintuża' determinazzjoni tas-CO_2 indiretta (ara Anness 3).

Inkuba l-fliexken fit-temperatura magħżula (ara sezzjoni 1.8.8.1). Neħħi l-kampjuni għall-analiżi kimika jew il-kejl ^{14}C fil-bidu tat-test (jiġifieri qabel ma tibda d-diżintegrazzjoni; ara sezzjoni 1.7.1) u mbagħad f'intervalli tal-ħin addattati matul it-test. It-teħid tal-kampjuni jista' jsir billi jitneħħew is-sotto kampjuni (eż. 5 ml tal-kampjuni) minn kull repetizzjoni tal-esperiment jew permezz tal-esperjenza tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha meta jittieħdu l-kampjuni. Il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test tista' tinstab direttament jew indirettament (ara Anness 3). Normalment, ikun meħtieġ minimu ta' ħames postijiet fejn jittieħdu kampjuni waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni (jiġifieri wara li tintemm il-fażi tad-dewmien) sabiex tkun stmata r-rata kostanti affidabbli, sakemm ma jkunx ġustifikat li tliet postijiet tat-teħid ta' kampjuni huma biżżejjed għas-sustanzi li jiddiżintegraw malajr. Għas-sustanzi li ma jiddiżintegrawx malajr jista' jsir faċilment aktar kejl waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni u, għalhekk, għandhom jintużaw aktar postijiet tad-data biex tkun stmata k. L-ebda skeda tal-ħin fissa għat-teħid ta' kampjuni ma tista' tkun stipulata, għaliex ir-rata ta' bijodegradabbiltà tvarja; madankollu hu rakkomandat li jittieħed kampjun darba f'ġimgħa jekk id-diżintegrazzjoni tkun baxxa. Jekk is-sustanza tat-test tiddiżintegra malajr, it-teħid ta' kampjuni għandu jsir darba kuljum fl-ewwel tlett ijiem u mbagħad kull tieni jew tielet ġurnata. Taħt ċerti ċirkostanzi, bħal b'sustanzi li jkollhom azzjoni kimika mgħaġġla ħafna fl-ilma, ikun meħtieġ li jittieħdu kampjuni f'intervalli ta' siegħa. Hu rrikmandat li jsir studju preliminari qabel it-test sabiex ikunu magħrufa l-intervalli addattati tat-teħid ta' kampjuni. Jekk il-kampjuni jridu jkunu disponibbli għal aktar analiżi speċifika, ta' min jieħu aktar kampjuni u mbagħad jintgħażlu dawk li jridu jiġu analizzati fl-aħħar tal-esperiment wara li tintuża strateġija b'lura, jiġifieri l-aħħar kampjuni jiġu analizzati l-ewwel (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5 għal gwida dwar l-istabbilità tal-kampjuni waqt il-ħżin).

1.8.9.2. *Numru ta' fliexken u kampjuni*

Lesti numru biżżejjed ta' fliexken tat-test biex ikollok:

— fliexken tat-test; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (preferibbilment minimu ta' 3) jew diversi fliexken tat-test għal kull konċentrazzjoni, jekk fliexken tat-test sħaħ jiġu pproċessati kull darba li jittieħdu l-kampjuni (simbolizzata F_T),

— fliexken tat-test għall-kalkolazzjoni tal-bilanċ tal-piż; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tat-test (simbolizzata F_M),

— kontroll vojt, l-ebda sustanza tat-test; tal-inqas tal-flixkun tat-test vojt li fih biss l-ilma tat-test (simbolizzata F_B),

— kontroll ta' referenza; flixkien doppji bis-sustanza ta' referenza (eż. *aniline* jew *sodium benzoate* f'10 µg/l) (simbolizzata F_C). L-iskop tal-kontroll tar-referenza hu li jiġi kkonfermat minimu ta' attività tal-mikroorganiżmi. Jekk hu konvenjenti, sustanza ta' referenza mmarkata bir-raġġi tista' tintuża, anki meta d-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi mmonitorjata permezz ta' analiżi kimika,

— kontroll li ma fihx mikroorganiżmi; wieħed jew aktar mill-fliexken li fihom ilma tat-test mingħajr mikroorganiżmi biex tkun eżaminata d-diżintegrazzjoni mhux ħajja li jista' jkun hemm jew xi tneħħija oħra li mhix bijoloġika tas-sustanza tat-test (simbolizzata F_S). L-attività bijoloġika tista' titwaqqaf permezz ta' sterilizzazzjoni bi pressjoni għolja taħt stim (121 °C; 20 min) tal-ilma tat-test jew billi jiġi miżjud tossikant (eż. *sodium azide* (NaN_3) f'10-20 g/l, *chloride* tal-merkurju ($HgCl_2$) f'100 mg/l jew *formalin* f'100 mg/l jew billi tiġi esposta għar-raġġi gamma. Jekk jintuża $HgCl_2$, għandhom jiddisponu minnu bħala skart tossiku. Għall-ilma miżjud bin-naqal f'ammont kbir, mhux faċli li jinkisbu l-kundizzjonijiet li ma jkunx fihom mikroorganiżmi; f'dan il-każ hu irrikkmandat li ssir aktar minn sterilizzazzjoni waħda bi pressjoni għolja tal-istim (eż. tliet darbiet). Ta' min iqis li l-karatteristiċi tas-*sorption* tan-naqal jistgħu jinbidlu meta ssir l-isterilizzazzjoni bi pressjoni għolja tal-istim,

— kontrolli tal-aġenti li jħollu, li fihom l-ilma tat-test u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza; fliexken doppji trattati bl-istess ammont ta' aġent li jinħall u bl-użu tal-istess proċedura bħal dik użata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. L-iskop hu li jiġu eżaminati xi effetti ħżiena tal-aġent li jinħall billi tkun magħrufa d-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

Fit-tfassil tat-test, l-investigatur għandu jqis l-importanza relattiva ta' żjieda fir-repetizzjoni tal-esperiment kontra żjieda fin-numru ta' ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni. In-numru eżatt ta' fliexken meħtieġa jiddependi mill-metodu użat biex titkejjel id-diżintegrazzjoni (ara t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.; sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3).

Għandhom jittieħdu żewġ sotto kampjuni (eż. 5 ml kampjuni) minn kull flixkun tat-test kull meta jittieħdu l-kampjuni. Jekk jintużaw diversi fliexken biex ikunu jistgħu jiġu pproċessati fliexken sħaħ, minimu ta' żewġ fliexken għandu jkun issagrifikat kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż [mhux obbligatorju]*

Żid il-volumi meħtieġa ta' ilma tat-test u n-naqal, jekk hemm bżonn, fil-kontenituri tat-test (ara sezzjoni 1.8.5). Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż huwa l-istess bħal dak għat-test li jsir fil-baħar miftuħ (ara s-sezzjonijiet 1.8.9.1 u 1.8.9.2). Jekk jista' jkun uża' fliexken tas-*serum* jew fliexken ta' għamla simili. Qiegħed il-fliexken magħluqa mimduda fuq dak li jreġħedhom. Ovvjament, fliexken miftuħa għal sustanzi li ma jevaporawx ta' ^{14}C mhux mogħtija isem, għandhom jitqegħdu fil-pożizzjoni wieqfa, f'dan il-każ hu rrikkmandat li jsir tħawwid manjetiku u l-użu ta' *bars* manjetiċi miksija bil-ħġieġ. Jekk hemm bżonn, iċċarġja l-fliexken bil-gass biex iżżomm il-kundizzjonijiet xierqa li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu.

1.8.9.4. *Determinazzjonijiet radjokemikali*

Is-$^{14}CO_2$ evolut jitkejjel indirettament u direttament (ara Anness 3). Is-$^{14}CO_2$ jiġi magħruf indirettament permezz tad-differenza bejn l-attività ^{14}C inizjali fl-ilma tat-test jew is-sospensjoni u l-attività totali tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni meta jittieħdu l-kampjuni kif jitkejlu wara li l-kampjun ikun mimli bl-aċtu għal ph 2-3 u jitneħħa s-CO_2. Il-karbonju inorganiku għalhekk jitneħħa u l-attività mkejla tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni tiġi minn materjal organiku. L-għarfien indirett tas-$^{14}CO_2$ m'għandux jintuża', jekk il-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiffurmaw waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test (ara Anness 3). Jekk jista' jkun, l-evoluzzjoni $^{14}CO_2$ għandha titkejjel direttament (ara Anness 3) kull meta jittieħdu l-kampjuni f'tal-inqas flixkun wieħed tat-test, din il-proċedura tagħti lok biex ikunu ċċekkjati l-bilanċ tal-piż u l-proċess tal-bijodegradazzjoni, iżda hi ristretta għat-testijiet li jsiru fuq il-fliexken magħluqa.

Jekk is-$^{14}CO_2$ evolut jitkejjel direttament waqt it-test, aktar fliexken għandhom jiġu ppreparati għal dan il-għan fil-bidu tat-test. Hu rrikkmandat li tkun magħrufa b'mod dirett is-$^{14}CO_2$, jekk prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiġu ffurmati waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test. F'kull post ta' kejl il-fliexken tat-test l-oħra jimtlew bl-aċtu għal pH2-3 u s-$^{14}CO_2$ jinġabar f'assorbitur intern jew estern (ara Anness 3).

Hemm ukoll l-għażla fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C u prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri jistgħu jkunu magħrufa permezz tar-radjokromatografija (eż. kromatografija ta' saff irqiq, *RAD-TLC*) jew HPLC li taqbad ir-radjokimiċi.

Għażla oħra tista' tkun il-fażi tat-tqassim tar-radjoattività li fadal (ara Anness 1) u s-sustanza tat-test li jifdal wara l-evaporazzjoni u l-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu jiġu ddeterminati.

Fl-aħħar tat-test il-bilanċ tal-piż għandu jkun determinat permezz ta' kejl dirett tas-$^{14}CO_2$ bl-użu ta' fliexken separati tat-test li minnhom ma jittieħdu l-ebda kampjuni waqt it-test (ara Anness 3).

1.8.9.5. *Analiżi kimika speċifika*

Jekk ikun hemm metodu analitiku sensittiv speċifiku, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi evalwata billi titkejjel il-konċentrazzjoni totali li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test minflok l-użu ta' tekniki li jimmarkaw bir-raġġi. Jekk tintuża' sustanza tat-test immarkata bir-raġġi (biex titkejjel il-mineralizzazzjoni totali), analiżi kimiċi speċifiċi jistgħu jsiru fl-istess ħin biex jagħtu informazzjoni oħra utli u biex jiċċekkjaw il-proċedura. Analiżi kimika speċifika tista' tintuża wkoll biex jitkejjlu l-prodotti ta' trasformazzjoni ffurmati waqt id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test, u dan hu rrikkmandat għas-sustanzi li huma mineralizzati b'nofs ħajjiet li jeċċedu 60 ġurnata. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni kull meta jittieħdu l-kampjuni għandhom jiġu mkejla u jsir rapport dwarhom (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' dik applikata). Ġeneralment, il-prodotti tat-trasformazzjoni li jinstabu f'≥ 10 % tal-konċentrazzjoni applikata fi kwalunkwe ħin meta jittieħdu l-kampjuni għandhom ikunu identifikati sakemm ma jkunux hemm raġunijiet oħra ġustifikati biex isir mod ieħor. Il-prodotti ta' trasformazzjoni li għalihom dejjem qed jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet waqt l-istudju għandhom ukoll jitqiesu fl-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jeċċedux il-limitu msemmi hawn fuq, għaliex dawn jistgħu jindikaw persistenza. L-analiżi tal-prodotti ta' trasformazzjoni fil-kontrolli ta' sterilizzazzjoni għandha titqies, jekk trasformazzjoni mhux ħajja mgħaġġla tas-sustanza tat-test (eż. idrolisi) tista' tiġri. Il-bżonn ta' kwantifikazzjoni u identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom jitqiesu każ b'każ, u jingħataw ġustifikazzjonijiet għalihom fir-rapport. Tekniki biex jiġu estratti permezz tal-aġent organiku li jinħall għandhom ikunu applikati skont id-direzzjonijiet mogħtija fil-proċedura analitika rispettiva.

Il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu f'temperatura ta' 2 sa 4 °C u jiġu ssiġġillati biex ma tidħolx arja jekk l-analiżi ssir fi żmien 24 siegħa (jekk hu possibbli). Għal ħżin aktar fit-tul, il-kampjuni għandhom ikunu ffriżati taħt temperatura ta' – 18 °C jew ippriservati kimikament. L-użu ta' l-aċtu biex jiġu ppriservati l-kampjuni mhux metodu rrikmandat, għaliex il-kampjuni bl-aċtu jistgħu jkunu instabbli. Jekk il-kampjuni ma jiġux analizzati fi żmien 24 siegħa u mhumiex soġġetti għall-ħżin aktar fit-tul, għandu jsir studju dwar l-istabbilità tal-ħżin biex juru l-istabbiltà tal-kimiċi li hemm interess fihom taħt temperatura tal-ħżin ta' – 18 °C jew kundizzjonijiet ippriservati. Jekk il-metodu analitiku jinvolvi jew li jiġi estratt l-aġent li jinħall jew il-fażi li jiġi estratt is-solidu (*SPE*), l-estrazzjoni għandha ssir mall-ewwel wara li jittieħdu l-kampjuni jew wara li jinħażen il-kampjun miżmum fil-friġġ għal massimu ta' 24 siegħa.

Skont is-sensittività tal-metodu analitiku, jista' jkun hemm bżonn volum ta' kampjuni akbar minn dawk indikati fil-paragrafu 1.8.1. It-test jista' jsir faċilment bil-volumi tat-test ta' litru fi fliexken b'volum ta' 2-3 litri, li bis-saħħa t'hekk ikunu jistgħu jinġabru kampjuni ta' madwar 100 ml.

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. KIF JIĠU TRATTATI R-RIŻULTATI

2.1.1. **Il-Plot tad-data**

Qarreb il-ħinijiet tat-teħid ta' kampjuni għal numru sħiħ ta' sigħat (sakemm is-sustanza ma tiddiżintegrax ħafna fi ftit minuti jew sigħat) iżda mhux għal numru sħiħ ta' ġranet. Ipplottja l-estimi tal-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test (għas-sustanzi msemmija ^{14}C) jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni (għal sustanzi li mhux mogħtija isem), kontra l-ħin kemm fi plot lineari kif ukoll semi-logaritmiku (ara Figuri 1a, 1b). Jekk saret id-diżintegrazzjoni, qabbel ir-riżultati mill-fliexken F_T ma' dawk mill-fliexken F_S. Jekk il-medji tar-riżultati mill-fliexken bis-sustanza tat-test (F_T) u l-fliexken li ma fihomx mikro-organiżmi (F_S) jvarjaw b'inqas minn 10 %, wieħed jista' jassumi li d-diżintegrazzjoni osservata hi l-aktar waħda mhux ħajja. Jekk id-diżintegrazzjoni fil-fliexken F_S hi ibaxx, il-figuri jistgħu jintużaw biex isewwu dawk miksuba bil-fliexken F_T (billi jitnaqqsu minnhom) sabiex ikun stmat il-livell ta' bijodegradazzjoni. Meta jsiru analiżi mhux obbligatorji għall-prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni, għandhom jingħataw plots tal-formazzjoni u l-waqgħa tagħhom flimkien ma' plot tal-waqgħa tas-sustanza tat-test.

Ħu stima tat-tul tal-fażi tad-dewmien t_L mill-kurva tad-diżintegrazzjoni (plot semi-logaritmiku) billi tislet il-parti lineari tad-diżintegrazzjoni żero jew inkella billi tiddetermina l-ħin għal madwar 10 % diżintegrazzjoni (ara Figuri 1a u 1b). Mill-plot semi-logaritmiku, ħu stima tar-rata tal-ewwel ordni kostanti, k, u l-iżball standard tagħha permezz ta' rigress linear ta' ln (attività ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test) kontra l-ħin. Bil-kejl ^{14}C b'mod partikolari, uża biss data li tappartjeni għall-parti lineari tal-bidu tal-kurva wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien, u agħti preferenza biex tagħżel ftit data u li tkun rappreżentattiva aktar milli tagħżel numru akbar ta' data aktar inċerta. L-inċertezza hawnhekk tinkludi żbalji interni fl-użu dirett irrikmandat tal-attivitajiet ^{14}C imkejla li jifdal wara l-evaporazzjoni (ara hawn taħt). Xi kultant ikun relevanti li tikkalkula żewġ rati kostanti differenti, jekk id-diżintegrazzjoni ssegwi mudell f'żewġ fażijiet. Għal dan il-għan huma mfissra żewġ fażijiet differenti tal-kurva tad-diżintegrazzjoni. Il-kalkolazzjonijiet tar-rata kostanti k, u n-nofs ħajja $t_{½} = \ln 2/k$, għandhom isiru għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment, meta jittieħdu sotto kampjuni mill-istess flixkun, jew billi jintużaw il-valuri medja, meta l-fliexken kollha huma ipproċessati kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.2). Meta tintuża l-proċedura msemmija l-ewwel, ir-rata kostanti u n-nofs ħajja għandhom ikunu rrappurtati għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment u bħala valur medju bl-iżball standard. Jekk intużaw konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, il-kurva tad-diżintegrazzjoni tista' tiddevja sew minn linja dritta (plot semi-logaritmiku) u l-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu ma jkunux validi. Għalhekk ma jagħmilx sens li tiġi spjegata nofs ħajja. Madankollu, għal firxa limitata ta' data, movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu jistgħu jiġu applikati u tkun stmata d-diżintegrazzjoni ta' nofs il-ħin DT_{50} (ħin biex tintlaħaq 50 % diżintegrazzjoni). Madankolli, ta' min iżomm f'moħħu, li t-tul ta' ħin tad-diżintegrazzjoni lil hinn mill-firxa ta' data magħżula ma jistax ikun previst bl-użu ta' DT_{50} li hu sempliċement dak li jiddeskrivi sett ta' data partikolari. Jeżistu għodda analitiċi li jiffaċilitaw il-kalkolazzjonijiet statistiċi u t-tpinġija tal-kurva u l-użu ta' dan it-tip ta' *software* hu irrikmandat.

Jekk isiru analiżi kimiċi speċifiċi, ħu stima tar-rata tal-kostanti u tan-nofs ħajjiet għad-diżintegrazzjoni primarja bħal t'hawn fuq għal mineralizzazzjoni totali. Jekk id-diżintegrazzjoni primarja hi l-proċess li jillimita jistgħu xi kultant jintużaw punti tad-data mill-proċess kollu tad-diżintegrazzjoni. Dan jiġri minħabba li l-kejl huwa dirett b'kuntrast mal-kejl tal-attività ^{14}C.

Jekk jintużaw sustanzi msemmija ^{14}C, bilanċ tal-piż għandu jkun imfisser f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni applikata tal-bidu, tal-inqas fl-aħħar tat-test.

2.1.2. Attività li jifdal wara l-evaporazzjoni

Meta l-parti msemmija ^{14}C ta' sustanza organika tkun bijodegradata, il-parti l-kbira tal^{-14}C tkun maqluba f'$^{14}CO_2$, filwaqt li parti oħra tintuża' għat-tkabbir tal-piż kollu tal-organiżmi u/jew sintesi ta' sustanzi extra-ċellulari meħtieġa għall-metaboliżmu. Għalhekk, il-bijodegradazzjoni' finali' kompluta ta' sustanza ma twassalx biex jiġi ikkonvertit 100 % tal-karbonju tagħha f'$^{14}CO_2$. Il^{-14}C li hemm fil-prodotti ffurmati bil-bijosinteżi hi sussegwentement merħija bil-mod bħala $^{14}CO_2$ minħabba "l-mineralizzazzjoni sekondarja". Għal dawn ir-raġunijiet il-plots tal-attività organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni (mkejla wara li jitneħħa s-CO_2) jew tas- $^{14}CO_2$ prodott kontra l-ħin juru "parti inferjuri" wara li tkun tlestiet id-diżintegrazzjoni. Dan jikkumplika l-interpretazzjoni kinetika tad-data u għal dan il-għan, il-parti inizjali tal-kurva biss (wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien u qabel ma tkun intlaħqet madwar 50 % diżintegrazzjoni) għandha tintuża' normalment biex tkun stmata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tiġi diżintegrata, l-attività totali organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni hi dejjem ogħla mill-attività ^{14}C assoċjata mas-sustanza tat-test intatta li jifdal. Jekk is-sustanza tat-test hi diżintegrata bir-reazzjoni ta' l-ewwel ordni u frazzjoni kostanti α hi mibdula fil-minerali CO_2, in-niżla inizjali tal^{-14}C kurva li tisparixxi (organika totali ^{14}C kontra l-ħin) se tkun α immultiplikata bin-niżla tal-kurva korrispondenti għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (jew, biex inkunu preċiżi, il-parti tas-sustanza tat-test mogħtija l-isem ^{14}C). Bl-użu tal-kejl tal-attività totali organika ^{14}C mhux ikkoreġuta, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni ikkalkulata se tkun għalhekk konservattiva. Proċeduri biex ikunu stmati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mill-attivitajiet radjokimiċi mkejla bbażati fuq diversi ipotesi ta' simplifikazzjoni ġew deskritti fil-letteratura (2)(9)(10)(11). Dawk il-proċeduri huma faċilment applikabbli għal sustanzi li jiddiżintegraw malajr.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Jekk jinstab li k hi indipendenti mill-konċentrazzjoni miżjuda (jiġifieri jekk il-k ikkalkulata hi kważi l-istess f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test), wieħed jista' jassumi li r-rata kostanti ta' l-ewwel ordni hi rappreżentattiva tal-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar użati, jiġifieri s-sustanza tat-test, il-kampjun ta' l-ilma, u t-temperatura tat-test. Sa fejn jistgħu jiġu ġeneralizzati r-riżultati jew estiżi għal sistemi oħra jrid ikun evalwat billi jiġġudikahom espert. Jekk tintuża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test, u għalhekk id-diżintegrazzjoni ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni, id-data ma tistax tintuża' għal stima diretta tar-rata kostanti tal-ewwel ordni jew in-nofs ħajja korrispondenti. Madankollu, data meħuda minn test li juża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test tista' xorta tibqa' tajba biex ikun stmat l-ammont ta' mineralizzazzjoni totali u/jew biex ikunu misjuba u kwantifikati l-prodotti ta' trasformazzjoni.

Jekk ikunu magħrufa r-rati ta' proċessi oħra ta' telf barra l-bijodegradazzjoni (eż l-idroliżi jew l-evaporazzjoni mgħaġġla), huma jistgħu jitnaqqsu mir-rata ta' telf netta osservata waqt it-test biex tingħata stima approssimattiva tar-rata tal-bijodegradazzjoni. Id-data għall-idroliżi tista', eż. tinkiseb mill-kontroll li ma fihx mikro-organiżmi jew mill-ittestjar fl-istess ħin billi tintuża' konċentrazzjoni ogħla tas-sustanza tat-test.

L-għarfien indirett u dirett tas-$^{14}CO_2$ (sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3) jista' jintuża biss biex ikejjel sa fejn saret il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test f'CO_2Ir-radjokromatografija (*RAD-TLC*) jew il-*HPLC* jistgħu jintużaw biex janalizzaw il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C u l-iffurmar ta' prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Biex tkun tista' ssir stima diretta tan-nofs ħajja, jeħtieġ li ma jkun hemm l-ebda prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (mfissra bħala ≥ 10 % tal-ammont applikat tas-sustanza tat-testJekk ikun hemm prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri kif imfissra hawnhekk, jeħtieġ li jkun hemm evalwazzjoni dettaljata tad-dataDin tista' tinkludi testjar imtenni u/jew identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5) sakemm id-destin tal-prodotti ta' trasformazzjoni ma jistax ikun evalwat sew mill-esperjenza (eż. informazzjoni dwar ir-rotot tad-diżintegrazzjoni). Peress li l-proporzjon tal-karbonju tas-sustanza tat-test mibdul f'CO_2 ivarja (l-aktar skont il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u sottostrati oħra li jkun hemm, il-kundizzjonijiet tat-test u l-komunità tal-mikroorganiżmi), dan it-test ma jagħtix lok biex issir stima faċli tal-bijodegradazzjoni finali bħal f'test dgħajjef *DOC*; iżda r-riżultat huwa simili għal dak miksub permezz ta' test respirometriku. L-ammont ta' mineralizzazzjoni għalhekk ikun inqas minn jew ugwali għal-livell minimu ta' bijodegradazzjoni finaliBiex tinkiseb stampa aktar sħiħa tal-bijodegradazzjoni finali (l-mineralizzazzjoni u l-inkorporazzjoni fil-piż ta' l-organiżmi), l-analiżi tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C għandha ssir fl-aħħar tat-test (ara l-Anness 1). Il-^{14}C fl-għadira tal-partikuli separati se tkun magħmula minn ^{14}C inkorporati fil-piż tal-mikroorganiżmi batteriċi u ^{14}C iffurmati b'lura f'partikuli organiċi.

2.3. VALIDITÀ TAT-TEST

Jekk is-sustanza ta' referenza mhix diżintegrata fl-intervall tal-ħin mistenni (għal *aniline* u *sodium benzoate*, normalment inqas minn ġimagħtejn), il-validità tat-test tkun suspettata u trid tkun ivverifikata aktar, jew inkella t-test għandu jiġi mtenni b'kampjun ġdid tal-ilma. F'*ring* test ISO tal-metodu fejn seba' laboratorji li jinsabu madwar l-Ewropa ipparteċipaw, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni addattati għall-*aniline* varjaw minn 0,3 għal 1.7 ġurnata^{-1} b'medja ta' 0,8 d^{-1} f' 20 °C u żball standard ta' ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0.9 ġranet). Ħinijiet tipiċi tad-dewmien kienu 1 sa 7 ijiem. L-ilmijiet eżaminati ġew irrappurtati li kellhom piż totali tal-mikroorganiżmi batteriċi li jikkorrispondi għal 10^3 -10^4 *units* li jiffurmaw kolonja (*CFL*) kull ml. Ir-rati tad-diżintegrazzjoni fl-ilmijiet Ewropej tan-Nofs li huma rikki fin-nutrienti kienu akbar minn dawk fl-ilmijiet Nordiċi li huma relattivament neqsin min-nutrienti tal-pjanti, li jista' jkun dovut għall-istat differenti tan-nutrizzjoni jew qabel kienu esposti għal sustanzi kimiċi.

L-irkuprar totali (bilanċ tal-piż) fl-aħħar ta' l-esperiment għandu jkun bejn 90 % u 110 % għas-sustanzi immarkati bir-raġġi, filwaqt li l-irkuprar inizjali fil-bidu ta' l-esperiment għandu jkun bejn 70 % u 110 % għas-sustanzi li mhumiex imsemmija. Madankollu, il-firxiet indikati għandhom ikunu interpretati biss bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test.

3. **RAPPORT TAT-TEST**

It-tip ta' studju, jiġifieri t-test f'baħar miftuħ jew it-test tan-naqal li jkun miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, għandu jkun dikjarat sew fir-rapport tat-test, li għandu jkun fih ukoll ta' l-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test u s-sustanza(i) ta' referenza:

— ismijiet komuni, ismijiet kimiċi (irrikmanda *IUPAC* u/jew ismijiet *CAS*), numri *CAS*, *formulas* strutturali) li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża' sustanza mmarkata bir-raġġi) u karatteristiċi relevanti fiżiko-kimiċi tat-test u s-sustanza ta' referenza (ara sezzjonijiet 1.5 u 1.6),

— ismijiet kimiċi, numri *CAS*, *formulas* strutturali (li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża sustanza immarkata bir-raġġi) u karatteristiċi fiżiko-kimiċi tas-sustanzi użati bħala standards għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni,

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanzi tat-test u ta' referenza,

— il-purità radjokimika tal-attività kimika msemmija u speċifika (fejn jixraq).

Ilma tal-wiċċ:

L-informazzjoni minima li ġejja għall-kampjun tal-ilma meħud għandha tingħata:

— post u deskrizzjoni tas-sit fejn ittieħdu l-kampjuni inkluż, jekk jista' jkun, l-istorja tal-kontaminazzjoni,

— id-data u l-ħin tal-ġbir tal-kampjuni,

— in-nutrienti (N totali, l-ammonju, in-*nitrite*, in-*nitrate*, P totali, *orthophosphate* maħlul fl-ilma),

— il-fond tal-ġbir,

— id-dehra tal-kampjun (eż. il-kulur u kemm hu mdardar),

— id-*DOC* u t-*TOC*,

— il-*BOD*,

— it-temperatura u l-*pH* fl-istess post u ħin tal-ġbir,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġu l-ossiġnu mhumiex ovvji),

— kemm fih melħ jew kemm jgħaddi minnu (fil-każ tal-ilma baħar u ilma ftit mielaħ),

— solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ (fil-każ ta' kampjun mdardar),

— jekk jista' jkun xi informazzjoni oħra relevanti dwar il-post fejn ittieħdu l-kampjunu fil-ħin meta ttieħdu (eż. data vera jew storika dwar ir-rata tat-tgelgil tax-xmajjar jew il-kurrenti tal-baħar, postijiet maġġuri li jbattlu 'l barra li huma viċin il-post u t-tip ta' tbattil, il-kundizzjonijiet tat-temp qabel il-ħin li fih ittieħdu l-kampjuni,

u l-informazzjoni mhux obbligatorja li ġejja:

— il-piż totali tal-mikroorganiżmi (eż. l-għadd dirett ta' l-*acridine orange* jew il-units li jiffurmaw kolonji),

— karbonju inorganiku,

— konċentrazzjoni ta' *chlorophyll-a* bħala stima speċifika għall-piż totali tal-mikroorganiżmi ta' l-alka.

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja dwar in-naqal għandha tingħata jekk isir it-test dwar in-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ:

— kemm hu fil-fond in-naqal miġbur,

— id-dehra tan-naqal (bħal ikkulurita, imtajna, imnaqqla, jew imramla),

— il-konsistenza (eż. ramel aħrax, ramel fin, naqal u tafal),

— użin xott f'g/l tas-solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-konċentrazzjoni *TOC* jew it-telf fil-piż meta jinxtegħel bħala kejl tal-kontenut ta' materja organika,

— il-*pH*,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġ l-ossiġnu mhumiex ovvji).

Kundizzjonijiet tat-test:

— dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test tal-laboratorju, il-ħżin tal-kampjun u t-trattament minn qabel tal-kampjun, id-data ta' kif marru l-istudji,

— l-ammont ta' sustanza tat-test applikat, il-konċentrazzjoni tat-test u s-sustanza ta' referenza,

— il-metodu tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test inkluż kull użu ta' aġenti li jinħallu fl-ilma,

— il-volum tal-ilma tal-wiċċ użat u n-naqal (jekk intuża) u l-volum użat għall-kampjuni f'kull intervall għall-analiżi,

— deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata,

jekk m'għandhomx jinżammu kundizzjonijiet mudlama, informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet b' "dawl batut",

— informazzjoni dwar il-metodu(i) użat(i) biex ikunu stabbiliti l-kontrolli li ma fihomx mikroorganiżmi (eż. it-temperatura, il-ħin u n-numru ta' sterilizzazzjonijiet bi stim ta' pressjoni għolja),

— it-temperatura tal-inkubazzjoni,

— informazzjoni dwar tekniki analitiċi u l-metodu(i) użati għal kejl radjokemikali u għall-bilanċ tal-piż u l-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk sar),

— numru ta' repetizzjonijiet tal-esperiment.

Riżultati:

— persentaġġi ta' rkuprar (ara sezzjoni 1.7.1),

— kemm għandhom jiġu mtennija u kemm huma sensittivi l-metodi analitiċi użati inkluż il-limitu ta' sejbien (*LOD*) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) (ara sezzjoni 1.7.2),

— id-data kollha mkejla (inkluż il-punti tal-ħin tat-teħid tal-kampjuni) u l-valuri kkalkulati f'forma ta' tabelli u l-kurvi tad-diżintegrazzjoni; għal kull konċentrazzjoni tat-test u għal kull flixkun irrepetut għall-esperiment, irrapporta l-ko-effiċjent tal-korrelazzjoni lineari għan-niżla tal-plot logaritmiku, il-fażi tad-dewmien stmata u r-rata kostanti tal-ewwel ordni jew li tixxiebah (jekk jista' jkun), u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja korrispondenti (jew il-perjodu nofs ħajja, t_{50}),

— irrapporta l-valuri relevanti bħala medji tar-riżultati osservati fir-repetizzjonijiet individwali tal-esperimenti, eż. it-tul tal-fazi tad-dewmien, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja (jew t_{50}),

— qiegħed f'kategoriji s-sistema jew bħala mhux addattata jew addattata kif ġudikati mid-dehra tal-kurva tad-diżintegrazzjoni u mill-influwenza li jista' jkun hemm tal-konċentrazzjoni tat-test,

— ir-riżultati tal-verifika tal-bilanċ tal-piż finali u r-riżultati fuq il-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk hemm),

— il-frazzjoni ta' ^{14}C mineralizzat u, jekk jintużaw analiżi speċifiċi, il-livell finali tad-diżintegrazzjoni primarja,

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni tal-konċentrazzjoni *molar* u l-persentaġġ tal-prodotti applikati u maġġuri ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5), fejn jixraq,

— mogħdija proposta tat-trasformazzjoni, fejn jixraq,

— diskussjoni tar-riżultati.

4. LETTERATURA

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Il-kwalità tal-ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegrabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi — Parti 1: Ħawwad il-flixkun tat-test tal-grupp li fih ilma tal-wiċċ jew ilma tal-wiċċ/naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

3. Metodu tat-Testjar C. 23. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma u li ma jeħtiġux ossiġnu fil-ħamrija.

4. Metodu tat-Testjar C.24. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu u li ma jeħtiġux l-ossiġnu biex jikbru fin-naqal akwatiku.

5. *OECD* (1993). Linji ta' gwida biex ikunu Ittestjati l-Kimiċi. *OECD*, Pariġi.

6. ISO 8245 (1999). Kwalità tal-ilma — Linji ta' gwida dwar l-għarfien tal-karbonju organiku totali (*TOC*) u karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*).

7. ISO 10634 (1995). Il-kwalità tal-ilma — Gwida biex jiġu ippreparati u trattati *compounds* organiċi li ma jinħallux malajr fl-ilma għal evalwazzjoni sussegwenti tal-bijodegradabbiltà tagħhom f'mezz li fih l-ilma.

8. Abbozz tal-*OECD* (2000). Dokument ta' Gwida dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli. Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Sensiela fuq l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni. Nru 22 (biex ikun ippubblikat fis-sajf 2000).

9. Simkins, S. u Alexander, M. (1984). Mudelli għall-movimenti tal-mineralizzazzjoni bil-varjabbli tal-konċentrazzjoni tas-sottostrata u d-densità tal-popolazzjoni Mikrobijoloġija Ambjentali Applikata 47, 394-401.

10. Ingerslev, F. u N. Nyholm. (2000). Test dwar it-tħawwid ta' flixkun biex ikunu magħrufa r-rati tal-bijodegradazzjoni tal-kimiċi msejħa ^{14}C b'konċentrazzjonijiet baxxi fis-sistemi ta' l-ilma tal-wiċċ. Sigurtà Ambjentali Ekotossika 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Rapport tat-test tar-*ring*: Kwalità tal-Ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fil-wiċċ tal-ilma tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi parti 1 — rapport tat-test tar-*ring* 1998/1999. Ħawwad il-flixkun tal-grupp tat-test li fih l-ilma tal-wiċċ jew l-ilma tal-wiċċ/naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

Anness 1

Fażi tat-tqassim tal-^{14}C

Sabiex tiċċekkja l-proċedura, il-kejl tas-soltu tal-attività ^{14}C organika totali li jifdal wara l-evaporazzjoni (*TOA*) għandha tkun miżjuda bil-kejl tal-bilanċ tal-piż li jinvolvi għarfien dirett tal-$^{14}C_2$ evoluta wara li tinqabad f'assorbitur (ara Anness 3). Fiha nnifsha, formazzjoni pożittiva $^{14}CO_2$ hi evidenza diretta tal-bijodegradazzjoni kuntrarjament għad-diżintegrazzjoni mhux ħajja, jew mekkaniżmi oħra ta' telf, bħall-evaporazzjoni mgħaġġla u s-*sorption*. Informazzjoni oħra utli li tikkaratterizza l-imġiba tal-bijodegradabbiltà tista' tinkiseb mill-kejl tat-tqassim tat-*TOA* bejn l-istat maħlul fl-ilma (attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma, *DOA*) u l-istat tal-partikuli separati (attività organika ^{14}C tal-partikuli separati, *POA*) wara l-firda tal-partikuli separati permezz ta' filtrar tal-membrana jew ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga. Il-*POA* hu magħmul mis-sustanza tat-test *sorbed* fuq il-piż totali tal-mikroorganiżmi u fuq partikuli oħra barra mill-karbonju tas-sustanza tat-test li ntużaw għas-sinteżi tal-materjal ġdid ċellulari u riżultat t'hekk inkorporti fil-frazzjoni tal-piż totali tal-partikuli separati tal-mikroorganiżmi. L-iffurmar ta' materjal organiku ^{14}C maħlul fl-ilma jista' jkun stmat bħala *DOA* fl-aħħar tal-bijodegradazzjoni (art għolja fuq id-diżintegrazzjoni kontra l-kurva tal-ħin).

Ħu stima tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni f'kampjuni magħżula bl-iffiltrar tal-kampjuni fuq 0,22 μm jew 0,45 μm jew filter tal-membrana ta' materjal li ma jżommx fil-wiċċ ammonti sinifikanti tas-sustanza tat-test (filters *polycarbonate* jistgħu jkunu addattati). Jekk is-*sorption* tas-sustanza tat-test fuq il-filter hi kbira wisq biex tkun injorata (biex tiġi iċċekjata qabel l-esperiment) jista' jintuża' proċess b'magna ta' ċentrifuga (2 000 g, 10 min) minflok l-iffiltrar.

Ipproċedi bil-likwidu ffiltrat jew is-solidu mifrud mil-likwidu kif deskritt fl-Anness 3 għal kampjuni mhux iffiltrati. Ħoll il-filters tal-membrana fi fluwidu florexxenti addattat u għodd bħas-soltu, normalment billi tuża' biss il-metodu tal-proporzjon tal-istandards esterni biex titnaqqas l-illuminazzjoni, jew uża kampjun li jitħallat ma' l-ossiġnu. Jekk intuża l-proċess b'magna ta' ċentrifuga, erġa' ssospendi l-ballun żgħir iffurmat minn frazzjoni ta' partikuli separati f'1-2 ml ta' ilma distillat u ttrasferrixxih għal kontenitur żgħir tal-mediċini li hu florexxenti. Aħsel sussegwentement darbtejn b'1ml ilma distillat u ittrasferixxi l-ilma tal-ħasil għall-kontenitur żgħir tal-mediċini. Jekk hemm bżonn, is-sospensjoni tista' ssir f'ġel li jgħodd il-florexxenza tal-likwidu.

Anness 2

proċedura semi-kontinwa

Tista' tkun meħtieġa l-inkubazzjoni fit-tul għal diversi xhur sabiex tintlaħaq diżintegrazzjoni suffiċjenti tas-sustanzi li ma jobdux. It-tul tat-test m'għandux jaqbeż normalment is-60 ġurnata sakemm il-karatteristiċi tal-kampjun tal-ilma oriġinali ma jinżammux permezz ta' tiġdid tat-test ta' sospensjoni. Madankollu, il-perjodu tat-test jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 jum mingħajr tiġdid tas-sospensjoni tat-test, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 ġurnata.

Waqt l-inkubazzjoni għal perjodi twal, id-diversità tal-komunità tal-mikroorganiżmi tista' titnaqqas minħabba mekkaniżmi diversi ta' telf u minħabba l-qerda possibbli tal-kampjun tal-ilma ta' nutrijenti essenzjali u sottostrati primarji tal-karbonju. Hu għalhekk irrikmandat li jintuża test semi-kontinwu biex tkun determinata biżżejjed ir-rata ta' diżintegrazzjoni tas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod. It-test għandu jinbeda permezz ta' proċedura semi-kontinwa jekk, skont esperjenza mgħoddija, hu mistenni li jkun meħtieġ perjodu ta' inkubazzjoni ta' tliet xhur biex tinkiseb 20 % diżintegrazzjoni tas-sustanza. Inkella, it-test normali tal-grupp jista' jinbidel f'wieħed semi-kontinwu, jekk ma tkunx inkisbet diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test waqt madwar 60 ġurnata ta' testjar bl-użu tal-proċedura tal-grupp. Il-proċedura semi-kontinwa tista' titwaqqaf u t-test jit-kompla bħala esperiment tal-grupp, meta tkun ġiet irrekordjata diżintegrazzjoni sostanzjali (eż. > 20 %).

Fit-test semi-kontinwu, kull ġimagħtejn, madwar terz tal-volum tat-test tas-sospensjoni jiġi mibdul b'ilma frisk miġbur bis-sustanza tat-test miżjuda mal-konċentrazzjoni tal-bidu. In-naqal jiġi miżjud bl-istess mod ma' l-ilma mibdul mal-konċentrazzjoni tal-bidu (bejn 0,01 u 1 g/l), jekk isir it-test sospiż tan-naqal mhux obbligatorju. Meta jsir it-test mas-solidi tan-naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, hu importanti li s-sistema sospiża kollha tinżamm anki waqt li jitneħħa l-ilma, u l-ħin residenti jkun identiku għas-solidi u l-ilma, għax inkella x-xebħ maħsub ma' sistema uniformi akwatika bl-ebda fażijiet fissi tista' tintilef. Għal dawn ir-raġunijiet, konċentrazzjoni inizjali tan-naqal miżmum bejn il-qiegħ u l-wiċċ fil-medda t'isfel tal-intervall speċifikat hi preferuta, meta tintuża l-proċedura semi-kontinwa.

Iż-żieda preskritta tas-sustanza tat-test tfisser li l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test ma tiġix maqbuża bit-tiġdid parzjali tat-test ta' sospensjoni u, għalhekk, l-addattament, li hu ta' spiss meqjus b'konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, ikun evitat. Peress li l-proċedura tikkonsisti minn dħul mill-ġdid tal-organiżmi u kumpens tan-nutrijenti meqruda u s-sottostrati primarji, id-diversità oriġinali tal-mikroorganiżmi terġa' tinġab għal li kienet, u t-tul tat-test jista' jkun estiż għal dejjem fil-prinċipju. Meta tintuża' l-istess proċedura semi-kontinwa, hu importanti li wieħed jinnota l-konċentrazzjoni li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi korretta għall-ammonti tas-sustanza tat-test miżjuda u mneħħija f'kull proċedura ta' tiġdid. It-total u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula fl-ilma tista' tintuża' b'mod alternat għall-*compounds* li jiffurmaw lura ftit. Il-formazzjoni lura hi insinifikanti (< 5 %) taħt il-kundizzjonijiet speċifikati (0,1-1g solidi/l) għas-sustanzi ta' *log Kow* < 3 (validi għall-*compounds* newtrali *lipophilic*). Dan jidher permezz tal-eżempju ta' kalkolazzjoni li ġej. 0,1 g/l ta' solidi bejn wieħed u ieħor jikkorrispondu għal 10 mg ta' karbonju kull litru (frazzjoni ta' karbonju, $f_C = 0.01$). Billi nassumu li;

Log K_{ow} (tas-sustanza tat-test) = 3

$K_{oc} = 0.42 \times K_{ow}$

Koeffiċjent ta' partizzjoni, $K_d = f_C \times K_{oc}$

imbagħad, il-frazzjoni maħlula fl-ilma tal-konċentrazzjoni totali (C-ilma (C_w)/C-totali (C_t) hija:

$$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$$

Anness 3

Kif jiġi determinat il-$^{14}CO_2$

Għarfien indirett tal-$^{14}CO_2$

Għall-kejl tas-soltu, il-metodu indirett huwa normalment l-inqas wieħed li jieħu ħin u l-aktar metodu preċiż jekk is-sustanza tat-test ma tevaporax malajr u ma tkunx trasformata f'prodotti tat-trasformazzjoni li jevaporaw malajr. Trasferiment sempliċi tal-kampjuni mhux iffiltrati eż. daqs ta' 5 ml f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina. Attività addattata fil-kampjuni hija5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq) fil-bidu, u attività minima inizjali hi madwar 1 000 dpm. Is-CO_2 għandu jitneħħa wara li jinkesa bl-aċtu għal pH 2-3 b'1-2 qatriet ta' H_3PO_4 ikkonċentrat jew *HC1*. It-tneħħija tas-CO_2 tista' ssir billi jiddaħħlu bżieżaq tal-arja għal nofs siegħa — siegħa. Inkella, il-kontenituri ż-żgħar użati għall-mediċina jistgħu jiġu mħawda bis-saħħa għal siegħa — sagħtejn (per eżempju fuq *microplate shaker*) jew b'tħawwid aktar ġentili li jitħalla bil-lejl. L-effiċjenza tal-proċedura tat-tneħħija tas-CO_2 għandha tkun iċċekkjata (billi jittawwal il-perjodu ta' l-iċċarġjar bil-gass jew tat-tħawwid). Likwidu florexxenti, addattat biex jiġu magħduda l-kampjuni akwatiċi għandu mbagħad jiġi miżjud, il-kampjuni uniformi fuq mikser li jdur u r-radjoattività magħrufa permezz tal-għadd tal-likwidu florexxenti, titnaqqas l-attività tal-isfond misjub fit-testijiet vojta (F_B). Sakemm l-ilma tat-test ma jkunx ikkulurit ħafna jew ikun fih konċentrazzjoni għolja tal-partikuli, il-kampjuni normalment juru florexxenza uniformi u se jkun biżżejjed biex jitnaqqsu l-korrezzjonijiet bl-użu ta' standard estern. Jekk l-ilma tat-test hu ikkulurit ħafna, jista' jkun hemm bżonn li titnaqqas il-korrezzjoni permezz ta' żjieda ta' standard intern. Jekk il-konċentrazzjoni tal-partikuli hi għolja jista' ma jkunx possibbli biex tinkiseb taħlita jew ġel uniformi, jew il-varjazzjoni fit-tnaqqis bejn il-kampjuni tista' tkun kbira. F'dak il-każ il-metodu tal-għadd deskritt hawn taħt għat-test tat-taħlitiet ta' semi-likwidi jista' jintuża. Jekk it-test isir bħala test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-kejl tal-$^{14}CO_2$ jista' jsir indirettament billi jittieħed kampjun uniformi ta' 10 ml tal-ilma tat-test/sospensjoni tat-test u jinfirdu l-fażijiet permezz ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga b'veloċità addattata (eż. b'40 000 m/s^2 għal 15-il min.) Il-fażi akwatika għandha mbagħad tkun trattata kif deskritt hawn fuq. L-attività ^{14}C fil-fażi tal-partikuli separati (*POA*) għandha tkun determinata billi n-naqal jerġa' jiġi miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ f'volum żgħir ta' ilma distillat, billi jiġi trasferit f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina, u billi jiżdied il-likwidu florexxenti ħalli jifforma ġel (jeżistu likwidi speċjali florexxenti għal dan il-għan). Skont in-natura tal-partikuli (eż. kemm fihom materjal organiku), jista' jkun jaqbel li l-kampjun jiġi diġerit bil-lejl b'*solubiliser* tat-*tissue* u mbagħad jiġi uniformi fuq mikser li jdur qabel ma jiżdied il-likwidu florexxenti. Inkella, il-*POA* tista' tinstab permezz ta' kombustjoni mill-ossiġnu bl-użu ta' dak li jħallat ma' l-ossiġnu l-kampjun. Meta tkun qed tgħodd, l-istandards interni għandhom dejjem ikunu inklużi, u jista' jkun hemm bżonn li jsiru t-tiswijiet tat-tnaqqis billi jiżdied standard intern għal kull kampjun individwali.

Għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$

Jekk il-$^{14}CO_2$ evoluta titkejjel direttament, għandha ssir billi jiġu preparati aktar fliexken fil-bidu tat-test, jiġu pproċessati l-fliexken tat-test f'kull punt tal-kejl billi l-fliexken tat-test jimtlew bl-aċtu għal pH 2-3 u jinġabar il-$^{14}CO_2$ f'assorbitur intern (imqiegħed f'kull flixkun fil-bidu tat-test) jew estern. Bħala mezz li jassorbi jista' jintuża' jew l-*alkali* (eż. taħlita *1 N NaOH*, jew *NaOH pellet*), *ethanolamine* jew ibbażata fuq l-*ethanolamine*. Għall-kejl dirett tal-$^{14}CO_2$, il-fliexken għandhom ikunu magħluqa per eżempju bl-għeluq tal-lastku sintetiku.

Figura 1a

Eżempju ta' plot aritmetiku tad-data (l-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin

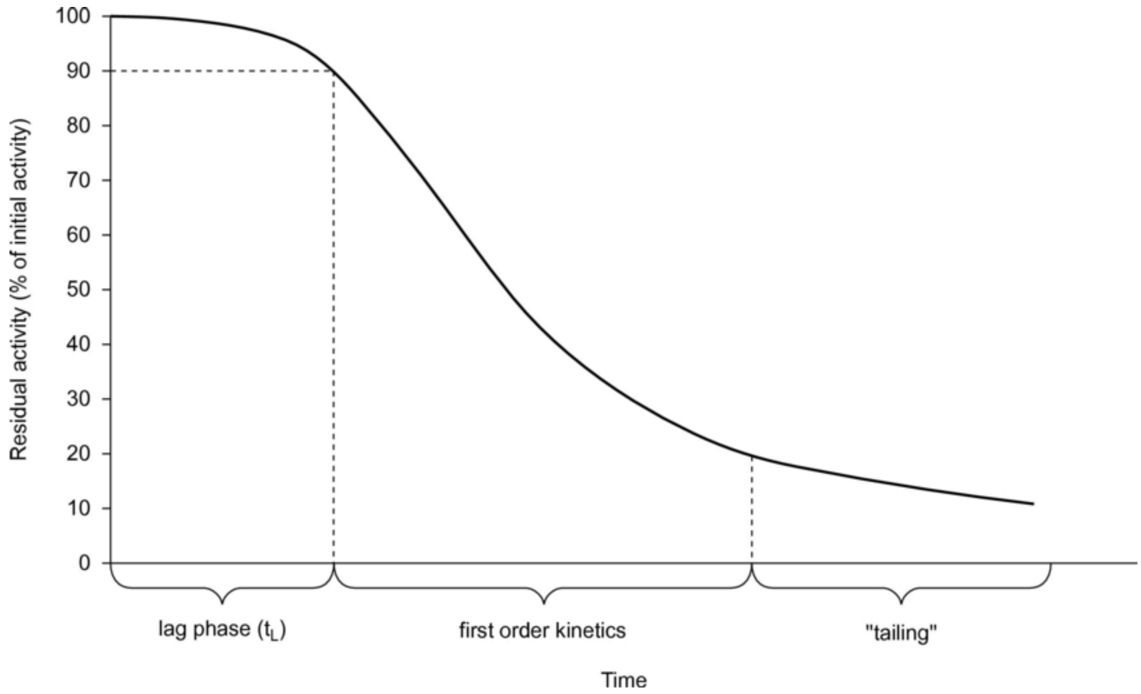
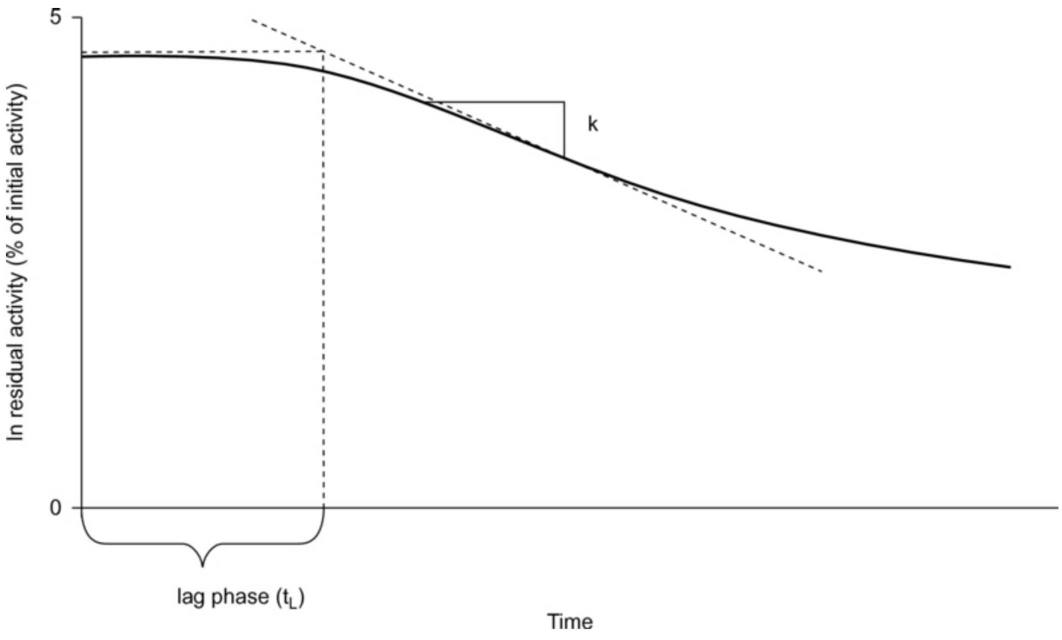


Figura 1b

Eżempju ta' plot semi-logaritmika (ln għall-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin).



ANNESS VI

C.26. *LEMNA* SP. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 221 (2006) (1). Kien hemm qbil wiesa' bejn l-awtoritajiet tal-UE li t-test tal-*Lemna* huwa alternattiva xierqa għal test tal-algal għal sustanzi li għandhom kulur qawwi (2)(3).

1.1. DAĦLA

Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex tiġi evalwata t-tossiċità ta' sustanzi għall-pjanti akkwatiċi tal-ilma ħelu tal-ġeneru *Lemna* (ħażiż li jgħatti l-wiċċ tal-ilma qiegħed jew duckweed). Dan huwa bbażat fuq linji gwida eżistenti (4)(5)(6)(7)(8)(9) iżda jinkludi modifikazzjonijiet ta' dawk il-metodi sabiex jirrifletti r-riċerka u konsultazzjoni riċenti fuq għadd ta' kwistjonijiet importanti. Il-metodu propost ġie vvalidat permezz ta' ring-test internazzjonali (10).

Dan il-Metodu ta' ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar għal tossiċità li juża *Lemna gibba* u *Lemna minor*, li t-tnejn li huma ġew studjati fit-tul u li huma s-suġġett tal-istandards imsemmija hawn fuq. It-tassonomija ta' *Lemna* spp. hija diffiċli, peress li hija kkumplikata bl-eżistenza ta' għażla wiesgħa ta' fenotipi. Għalkemm varjabilità ġentika bħala reazzjoni għal sustanzi tossiċi tista' tiġri fil-każ ta' *Lemna*, bħalissa mhemmx dejta suffiċjenti dwar dan is-sors ta' varjabilità li jissuġġerixxi klonu biex jintuża f'dan il-Metodu ta' ttestjar. Ta' min jinnota li dan it-test ma jsirx b'mod fejn jiġi evitat kull kuntatt ma' mikro-organiżmi oħra, iżda jittieħdu passi matul l-istadji tal-proċedura tat-test li jnaqqsu kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra.

Dettalji dwar ittestjar b'tiġdid (semi-statiku u flow-through) u mingħajr tiġdid (statiku) tas-soluzjoni tat-test huma deskritti. Skont ma jkunu l-għanijiet tat-test u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rrakkomandat li tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' metodi semi-statiċi u flow through, eż. għal sustanzi li malajr jintilfu minn soluzzjoni bħala riżultat ta' volatilizzazzjoni, fotodegradazzjoni, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. Iktar indikazzjonijiet huma mgħotija fi (11).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet li ġejjin huma użati għall-għanijiet tal-Metodu tal-Ittestjar:

Bijomassa: hija l-piż niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test, surrogati għal bijomassa, bħal ma huma għadd ta' frondi u erja ta' frondi, huma mkejla tipikament u l-użu tat-terminu "bijomassa" għalhekk jirreferi għal dawn il-kejlijiet ta' surrogati wkoll.

Klorożi: huwa l-fenomenu ta' meta jisfar it-tessut tal-frond.

Klonu: huwa organiżmu jew ċellula mnissla minn individwu wieħed permezz ta' riproduzzjoni asesswali. Individwi mill-istess klonu huma, għalhekk, ġenetikament identiċi.

Kolonja: tfisser il-kollettiv tal-frond omm u l-frond bint (normalment 2 sa 4) imwaħħlin ma' xulxin. Xi kultant issir referenza għaliha bħala pjanta.

EC_x: hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula ġo midjum tat-test li jirriżulta minn x % (eż. 50 %) tnaqqis fit-tkabbir ta' *Lemna* f'perjodu stabbilit ta' espożizzjoni (li trid tkun imsemmija espliċitament jekk devjanti mid-dewmien sħiħ jew normali tat-test). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew rendiment, is-simbolu "E_rC" huwa użat għar-rata ta' tkabbir u "E_yC" huwa użat għar-rendiment, segwit mill-varjabbli ta' kejl użat, eż. (għadd ta' frond).

Flow-through: huwa test fejn is-soluzzjonijiet tat-test huma mibdula kontinwament.

Frond: hija struttura f'għamla ta' werqa individwali/waħda ta' pjanta duckweed. Hija l-iżgħar unità, i.e. individwali, kapaċi li tirriproduċi.

Gibbożità: tfisser frondi li jidhru mħattbin jew minfuħin.

Tkabbir: huwa żieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. l-għadd tal-frondi, il-piż niexef, piż bil-likwidu jew l-erja tal-frond, tul il-perjodu tat-test.

Rata tat-tkabbir (rata medja ta' tkabbir speċifiku): hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa waqt il-perjodu ta' espożizzjoni.

Konċentrazzjoni Minima tal-Effett Osservat (LOEC): hija l-iktar konċentrazzjoni baxxa ttestjata li fiha jiġi osservat li s-sustanza għandha effett statistikament sinifikanti li jnaqqas it-tkabbir (b'valur $p < 0.05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin speċifiku ta' espożizzjoni. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test b'valur ogħla mil-LOEC irid ikollhom effett daqs jew ikbar minn dawk osservati bil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfatti, għandha spjegazzjoni sħiħa tingħata għalfejn il-LOEC (u għalhekk l-NOEC) ġie magħżul.

Varjabbli ta' kejl: huma kull tip ta' varjabbli li huma mkejla, biex jiġi espress il-punt ta' tmiem tat-test, billi jintuża varjabbli ta' rispons wieħed jew iktar varjabbli differenti. F'dan il-metodu l-għadd tal-frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż niexef huma varjabbli ta' kejl.

Monokultura: hija kultura bi speċi waħda ta' pjanta.

Nekrożi: hija tessut tal-frond mejjet (i.e. abjad jew imxarrab bl-ilma)

Konċentrazzjoni Bl-Ebda Effett Osservat (NOEC): hija l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt il-LOEC.

Fenotipa: hija l-karatteristiċi osservabbli ta' organiżmu determinati mill-interazzjoni tal-ġeni tagħha mal-ambjent tagħha.

Varjabbli ta' rispons: huma varjabbli li jintużaw għall-istima ta' tossiċità derivata minn varjabbli mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa b'metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-metodu, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati minn varjabbli ta' kejl bħall-għadd ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż niexef.

Test semi-statiku (ta' tiġdid): huwa test li fih s-soluzzjoni tat-test hija perjodikament mibdula f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku: huwa metodu tat-test mingħajr it-tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Punt ta' tmiem tat-test: jiddeskrivi l-fattur ġenerali li jinbidel bis-sustanza kimika relattiva għall-kontroll bħala għan tat-test. F'dan il-metodu, il-punt ta' tmien tat-test huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, li jista' jiġi espress b'varjabbli differenti ta' rispons li huma bbażati fuq varjabbli waħda jew iktar ta' kejl.

Midjum tat-test: huwa l-midjum komplut ta' tkabbir sintetiku li fuqu jikbru l-pjanti tat-test meta esposti għas-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test tiġi normalment maħlula fil-midjum tat-test.

Rendiment: huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex jesprimi bijomassa fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu tal-espożizzjoni

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

Kulturi ta' pjanti li jikbru b'mod esponenzjali, tal-ġeneru *Lemna* jitħallew jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test fuq perjodu ta' sebat ijiem. L-għan tat-test huwa li tikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanza fuq it-tkabbir veġetattiv fuq dan il-perjodu, bbażat fuq valutazzjoni ta' varjabbli ta' kejl magħżula. L-għadd tal-frondi huwa l-varjabbli primarju tal-kejl. Mill-inqas varjabbli wieħed ieħor ta' kejl (l-erja totali tal-frond, piż niexef jew piż frisk) hu mkejjel ukoll, peress li xi sustanzi jistgħu jaffetwaw varjabbli oħra ta' kejl ħafna iktar minn numri tal-frond. Biex jiġu kkwantifikati l-effetti relatati mas-sustanza, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-EC_x (eż EC_{50})

Il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-inibizzjoni ta' tkabbir, espress bħala żieda logaritmika fil-varjabbli ta' kejl (rata speċifika ta' tkabbir medju) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

Varjabbli ta' rispons addizzjonali użat f'dan il-Metodu ta' ttestjar hu r-rendiment, li jista' jkun neċessarju biex jiġu rispettati r-rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Jiġi ddefinit bħala l-varjabbli ta' kejl fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni li minnhom jitnaqqsu l-varjabbli fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rendiment irreġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' rendiment (eż. 50 %) hija kkalkulata u espressa bħala E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni minima tal-effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bl-ebda effett osservat (NOEC) jistgħu jiġu ddeterminati statiskament.

1.4. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Metodu analitiku, b'sensittività xierqa għal kwantifikazzjoni tas-sustanza fil-midjum tat-test għandha tkun aċċessibbli.

Informazzjoni fuq is-sustanza tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, purità, solubilità tal-ilma, stabbiltà fl-ilma u dawl, pK_a, K_{ow}, pressjoni tal-fwar u bijodegradabilità. Is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar tista' tiġi użata biex jiġi kkalkulat il-kostanti tal-Prinċipju ta' Henry, li jindika jekk huwiex probabbli li jkun hemm telf sinifikanti matul il-perjodu tat-test. Dan juri jekk għandhomx jittieħdu passi sabiex dan it-telf jiġi kontrollat. Meta l-informazzjoni dwar is-solubilità u l-istabbiltà tas-sustanza tat-test m'hijiex ċerta, huwa rrakkomandat li dawn jiġu vvalutati taħt il-kundizzjonijiet tat-test, i.e. midjum ta' tkabbir, temperatura, sistema ta' dawl li għandha tintuża fit-test.

Meta l-kontroll tal-aċidità tal-midjum tat-test huwa partikolarment importanti, pereżempju. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi li huma idrolitikament instabbli, iż-żieda ta' buffer lill-midjum ta' tkabbir huwa rrakkomandat (ara l-ewwel paragrafu fit-taqsima 1.7.4.). Iktar indikazzjonijiet għal ittestjar ta' sustanzi b'karatteristiċi fiżikokemikali li jagħmilhom diffiċli biex jiġu ttestjati huwa pprovdut fi (11).

1.5. SUSTANZA TA' REFERENZA

Sustanza/i ta' referenza, bħal 3,5-dichlorophenol użat fir-ring test internazzjonali (10), tista'/jistgħu tiġi/jiġu ttestjat(i) bħala mezz ta' kontroll tal-proċedura tat-test. Huwa opportun li tiġi ttestjata sustanza ta' referenza mill-inqas darbtejn f'sena jew, meta l-ittestjar isir inqas frekwentement, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità tas-sustanza tat-test.

1.6. VALIDITÀ TAT-TEST

Biex it-test ikun validu, il-ħin ta' irduppjar tal-għadd tal-frondi fil-kontroll irid ikun inqas minn jumejn u nofs (60 siegħa), li jikkorispondi ma' żieda ta' bejn wieħed u ieħor seba' darbiet f'sebat ijiem u rata medja ta' tkabbir speċifiku ta' 0.275 d^{-1}. Permezz tal-kundizzjonijiet tal-midja u t-test deskritti fil-Metodu tal-Ittestjar, dan il-kriterju jista' jintlaħaq bl-użu ta' sistema ta' ttestjar statiku (8). Huwa wkoll maħsub li dan il-kriterju jista' jiġi milħuq taħt kundizzjonijiet ta' ttestjar semi-statiku u flow-through. Kalkolu tal-ħin ta' irduppjar huwa muri fit-taqsima 2.1.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.7.1. **Apparat**

Kull tagħmir f'kuntatt mal-midja tat-test għandu jkun magħmul minn ħġieġ jew materjal ieħor li ma jagħmilx reazzjoni kimika. Tagħmir tal-ħġieġ użat għal-għanijiet tal-kultura u ittestjar għandu jiġi mnaddaf minn kull kontaminant kimiku li jista' jipperkola fil-midjum tat-test u jrid ikun sterili. Il-kontenituri tat-test għandhom ikunu wiesgħa biżżejjed sabiex il-frondi ta' kolonji differenti fil-kontenituri tal-kontroll jikbru mingħajr ma jirkbu lil xulxin fit-tmiem tat-test. Ma jimpurtax jekk l-għeruq imissu l-qiegħan tal-kontenituri tat-test, iżda fond minimu ta' 20 mm u volum minimu ta' 100 ml f'kull kontenitur tat-test huwa rrakkomandat. L-għażla tal-kontenituri tat-test ma hijiex ta' importanza kbira sakemm dawk ir-rekwiżiti jiġu mħarsa. Ġarar tal-ħġieġ, plattini ta' kristalizzazzjoni u plattini petri tal-ħġieġ ta' daqsijiet adatti kollha rriżultaw xierqa. Kontentituri tal-ħġieġ għandhom ikunu mgħottija sabiex titnaqqas kemm jista' jkun l-evoparazzjoni u l-kontaminazzjoni bi żball, waqt li titħalla l-bidla tal-arja neċessarja. Kontenturi tat-test xierqa, u partikolarment l-għotien, għandhom jevitaw dellijiet jew bidliet fil-karatteristiċi spettrali tad-dawl.

Il-kulturi u l-kontenituri tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan l-aħjar li jsir permezz tal-użu ta' kmamar ambjentali ta' tkabbir, inkubaturi, jew kmamar separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu jistgħu jiġu kkontrollati u miżmuma f'livell kostanti (ara t-taqsima 1.7.8).

1.7.2. **Organiżmu tat-test**

L-organiżmu użat għal dan it-test huwa jew *Lemna gibba* jew *Lemna minor*. Deskrizzjonijiet qosra ta' speċi ta' duckweed li ġew użati għal ittestjar għal tossiċità huma mogħtija fl-Appendiċi 1. Materjal ta' pjanti jista' jinkiseb minn kollezzjoni ta' kultura, laboratorju ieħor jew mill-għalqa. Jekk miġbura mill-għalqa, il-pjanti għandhom jiġu miżmuma fil-kultura fl-istess midjum bħal dak użat għall-ittestjar mill-inqas għal tmien ġimgħat qabel l-użu. Siti ta' għelieqi użati għal ġabra ta' kulturi inizjali għandhom ikunu ħielsa minn sorsi ovvji ta' kontaminazzjoni. Jekk miġjuba minn laboratorju ieħor jew minn kollezzjoni ta' kultura għandhom jiġu miżmuma bl-istess mod mill-inqas għal tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti jew tal-ispeċi jew klonu (jekk magħruf) użat għall-ittestjar għandu dejjem jiġi rrapurtat.

Monokulturi, li huma viżibilment ħielsa minn kontaminazzjoni minn organiżmi oħrajn bħal alga u protożoa, għandhom jiġu użati. Pjanti b'saħħithom ta' *L. minor* jikkonsistu f'kolonji li jkollhom bejn żewġ jew ħames frondi, waqt li kolonji b'saħħithom ta' *L. gibba* jista' jkollhom sa seba' frondi.

Il-kwalità u l-uniformità tal-pjanti użati għat-test ikollhom influwenza sinifikanti fuq ir-riżultat tat-test u għalhekk għandhom jintgħażlu bil-ħsieb. Pjanti żgħar li jikbru malajr mingħajr leżjonijiet li jidhru jew diskolorazzjoni (klorożi) għandhom jiġu użati. Kulturi ta' kwalità tajba huma indikati b'inċidenza għolja ta' kolonji li fihom mill-inqas żewġ frondi. Għadd kbir ta' frondi waħedhom juri stress ambjentali, eż. limitazzjoni ta' nutrijenti, u materjal ta' pjanti minn kulturi bħal dawn ma għandux jintuża għal ittestjar.

1.7.3. **Kultura**

Biex tnaqqas il-frekwenza ta' manteniment ta' kulturi (eż. meta l-ebda *Lemna* test ma jkun ippjanat għal xi perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu f'illuminazzjoni u temperatura (4-10 °C) mnaqqsa. Dettalji ta' produzzjoni ta' kulturi huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Sinjali ovvji ta' kontaminazzjoni b'alga jew organiżmi oħrajn jirrikjedu sterilizzazzjoni tal-wiċċ ta' sub-kampjun ta' frondi *Lemna*, segwit bi trasferiment f'midjum ġdid (ara l-Appendiċi 2). F'dan il-każ, il-kultura kkontaminata li jibqa' għandha tintrema.

Mill-inqas sebat ijiem qabel l-ittestjar, kolonji suffiċjenti huma trasferiti asettikament f'midjum sterili ġdid u kkultivati għal 7-10 ijiem taħt il-kundizzjonijiet tat-test.

1.7.4. **Midjum tat-test**

Midja differenti huma rrakkomandati għal *Lemna minor* u *Lemna gibba*, kif deskritt hawn taħt. L-inklużjoni ta' buffer pH fil-midjum tat-test (MOPS (aċidu sulfoniku 4-morpholinepropane, CAS No: 1132-61-2; EINECS No: 214-478-5 f'midjum *L. minor* u $NaHCO_3$ f'midjum *L. gibba*) għandha tiġi kkunsidrata akkuratament meta huwa suspettat li jista' jagħmel reazzjoni mas-sustanza tat-test u jinfluwenza l-espressjoni tat-tossiċità tiegħu. Midjum Steinberg (12) huwa aċċettabbli wkoll sakemm jintlaħqu l-kriterji tal-validità.

Modifkazzjoni tal-istandard Svediż (SIS) midjum ta' tkabbir *Lemna* huwa rrakkomandat għal produzzjoni ta' kulturi ta' *L. minor* u ttestjar tal-istess. Il-kompożizzjoni ta' dan il-midjum hija mogħtija fl-Appendiċi 3.

Il-midjum ta' tkabbir, 20X — AAP, kif deskritt fl-Appendiċi 3, huwa irrakkomandat għal produzzjoni ta' kulturi u ttestjar ta' *L. gibba*.

Il-midjum Steinberg, kif deskritt fl-Appendiċi 3, huwa wkoll adattat għal *L. minor*, iżda jista' jintuża għal *L. gibba* sakemm il-kriterji tal-validità jintlaħqu.

1.7.5. **Soluzzjonijiet tat-test**

Soluzzjonijiet tat-test huma ġeneralment ippreparati bid-diluzzjoni ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata. Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata tas-sustanza tat-test huma ġeneralment ippreparati billi tinħall is-sustanza fil-midjum tal-tkabbir.

L-iktar konċentrazzjoni għolja ttestjata tas-sustanza tat-test normalment ma għandiex teċċedi s-solubilità tal-ilma tas-sustanza taħt il-kundizzjonijiet tat-test. Għandu jiġi kkunsidrat iżda li *Lemna* spp. iżżomm fil-wiċċ u tista' tiġi esposta għal sustanzi li jinġabru bejn l-ilma u l-arja (eż. sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma jew sustanzi idrofobiċi jew sustanzi attivi fil-wiċċ). F'ċirkustanzi bħal dawn, l-espożizzjoni tirriżulta minn materjal li ma huwiex fis-soluzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-test, jistgħu, skont il-karatteristiċi tas-sustanza tat-test, jeċċedu s-solubilità tal-ilma. Għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu fl-ilma, jista' jkun hemm bżonn li tiġi ppreparata soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ħafna jew dispersjoni tas-sustanza bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex tiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet eżatt tas-sustanza tat-test lill-midjum tat-test u tgħin f'dispersjoni u

x-xoljiment tagħha. Kull sforz għandu jsir sabiex jiġi evitat l-użu ta' materjali bħal dawn. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità riżultanti minn użu ta' solventi jew dispersanti awżiljarji. Pereżempju, solventi użati ta' spiss li ma jikkawżawx fitotossiċità f'konċentrazzjonijiet sa 100 µl l^{-1} jinkludu acetone u dimethylformamide. Jekk jintuża solvent jew dispersant, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rrapurtata u minimizzata kemm jista' jkun (100 µl·l^{-1}), u kull trattament u kontroll għandu jkollu l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew dispersant. Iktar indikazzjonijiet dwar l-użu ta' dispersanti huma mogħtija fi (11).

1.7.6. **Gruppi tat-test u kontroll**

Tagħrif bil-quddiem dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test lil *Lemna*, eż. minn test li jsib il-gamma, jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test adattati. Fit-test definittiv ta' tossiċità, għandu jkun hemm mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje ġeometrika. Preferibbilment il-fattur ta' separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma għandux jeċċedi 3.2, iżda valur ikbar jista' jintuża meta l-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni hija ċatta. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet huma użati. Mill-inqas tliet repliki għandhom jintużaw f'kull konċentrazzjoni tat-test.

Meta tiġi ssettjata l-gamma ta' konċentrazzjonijiet tat-test (għal sejba ta' gamma u/jew għat-test definittiv ta' tossiċità), dawn li ġejjin għandhom jiġi kkunsidrati:

— biex tiddetermina EC_x, il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex tiżgura livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula l-EC_{50}, l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal-EC_{50}. Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli,

— jekk l-għan huwa li jiġu vvalutati l-LOEC/NOEC, l-iktar konċentrazzjoni baxxa tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex it-tkabbir ma jkunx ħafna inqas minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed sabiex it-tkabbir ikun ħafna iktar baxx minn dak tal-kontroll. Jekk dan ma huwiex il-każ, it-test irid jiġi ripetut bl-użu ta' firxa ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-ogħla konċentrazzjoni ma hijiex fil-limitu ta' solubilità jew il-konċentrazzjoni fil-limitu massimu rikjest, eż. 100 mg·l^{-1}).

Kull test għandu jinkludi kontolli li jikkonsistu f'midjum tal-istess nutrijent, l-istess għadd ta' frondi u kolonji, kundizzjonijiet ambjentali u proċeduri bħall-kontenituri tat-test iżda mingħajr is-sustanza tat-test. Jekk solvent jew dispersant awżiljarju huwa użat, trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/dispersant preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħal tal-kontenituri għandu jiġi inkluż. L-għadd ta' kontenituri ta' kontroll ripetut (u kontenituri ta' solvent, jekk applikabbli) għandu jkun mill-inqas daqs, u idealment id-doppju, tal-għadd ta' vetturi użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

Jekk determinazzjoni ta' NOEC ma hijiex rikjesta, id-diżinn tat-test jista' jinbidel biex jiżdied l-għadd ta' konċentrazzjonijiet u jnaqqas l-għadd ta' repliki ta' kull konċentrazzjoni. Madankollu, l-għadd ta' repliki ta' kontroll iridu jkunu mill-inqas tlieta.

1.7.7. **Espożizzjoni**

Kolonji li jikkonsistu minn 2 sa 4 frondi li jidhru huma trasferiti mill-kultura inoculum u huma mpoġġija każwalment fil-kontenituri ta' kontroll f'kundizzjonijiet asettiċi. Kull kontenitur tat-test għandhu jkollu total ta' bejn disa' jew tnax-il frond. L-għadd ta' frondi u kolonji jridu jkunu l-istess bħal dawk użati f'kull kontenitur tat-test. Esperjenza miksuba b'dan il-metodu u dejta tar-ring-test indikaw li jekk tuża tliet repliki għal kull trattament, b'kull replika jkollha minn disa' sa' tnax-il frond fil-bidu, dan huwa biżżejjed biex tinduna b'differenzi fit-tkabbir ta' ċirka 4 sa 7 % ta' inibizzjoni kkalkulat bir-rata ta' tkabbir (10 sa 15 % ikkalkulata skont ir-rendiment) bejn it-trattamenti (10).

Diżinn każwali għal post ta' kontenituri tat-test fl-inkubatur huwa rikjest sabiex titnaqqas kemm jista' jkun l-influwenza ta' differenzi ta' spazju fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Diżinn ibblokkat jew ripożizzjonament każwali tal-kontenituri meta jsiru osservazzjonijiet (jew ripożizzjonament iktar frekwenti) hu rikjest ukoll.

Jekk test preliminari ta' stabbilità juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma tistax tinżamm (i.e. il-konċentrazzjoni imkejla taqa' taħt 80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) matul it-tul taż-żmien tat-test (sebat ijiem), l-użu ta' sistema ta' ttestjar semistatiku hu rrakkomandat. F'dan il-każ, il-kolonji għandhom jiġu esposti għal soluzzjonijiet tat-test u kontroll preparati mill-ġdid f'mill-inqas żewġ okkażjonijiet matul it-test (eż. ġranet 3 u 5). Il-frekwenza ta' espożizzjoni għal midjum ġdid jiddependi mill-istabbilità tas-sustanza tat-test; frekwenza iktar għolja tista' tkun neċessarja biex jinżammu konċentrazzjonijiet kważi-kostanti ta' sustanzi instabbli ħafna u volatili. F'xi ċirkustanzi, proċedura flow-through tista' tkun neċessarja (11)(13).

Ix-xenarju ta' espożizzjoni minn applikazzjoni ta' weraq (sprej) mhijiex koperta f'dan il-Metodu ta' ttestjar, iżda ara (14).

1.7.8. **Kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni**

Dawl kontinwu fluworexxenti sħun jew frisk għandu jintuża biex jipprovdi intensità tad-dawl magħżula minn għażla ta' 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ meta mkejjel f'radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f'punti fl-istess distanza mis-sors ta' dawl bħall-frondi *Lemna* (ekwivalenti għal 6 500-10 000 lux). Kull differenza mill-intensità tad-dawl magħżula fuq l-erja tat-test ma tistax tkun iktar minn ± 15 %. Il-metodu ta' rivelazzjoni u kejl ta' dawl, partikolarment it-tip ta' sensur, jaffetwa l-valur imkejjel. Sensuri sferiċi (li jirrispondu għal dawl mill-angli kollha ta' fuq jew taħt il-pjan ta' kejl) u sensuri "cosine" (li jirrispondu għal dawl mill-angli kollha fuq il-pjan ta' kejl) huma aħjar minn sensuri unidirezzjonali, u jagħtu riżultati ogħla għal sors ta' iktar minn punt wieħed tat-tip deskritt hawn.

It-temperatura fil-kontenituri tat-test trid tkun ta' 24 ± 2 °C. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandiex tiżdied b'iktar minn 1,5 unità matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' aktar minn 1,5 unità ma tinvalidax it-test meta jkun jista' jintwera li l-kriterji ta' validità ġew issodisfati. Trid tingħata kura addizzjonali għall-pH drift f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli jew metalli. Ara (11) għal iktar indikazzjonijiet.

1.7.9. **Tul ta' żmien**

Dan it-test jintemm sebat ijiem wara li l-pjanti jiġu ttrasferiti fil-kontenituri tat-test.

1.7.10. **Kejl u determinazzjonijiet analitiċi**

Fil-bidu tat-test, l-għadd ta' frondi fil-kontenituri tat-test jingħadd u jiġi rrekordjat, b'attenzjoni li tiżgura li frondi sporġenti li jidhru b'mod ċar, huma kkunsidrati. Numri ta' frondi li jidhru normali jew anormali, għandhom jiġu determinati fil-bidu tat-test, mill-inqas darba kull tlett ijiem matul il-perjodu ta' espożizzjoni (i.e. f'mill-inqas 2 okkażjonijiet matul il-perjodu ta' 7 ijiem), u meta t-test jiġi mitmum. Tibdil fl-iżvilupp tal-pjanti, eż. fid-daqs tal-frond, dehra, indikazzjoni ta' nekrożi, klorożi jew gibbożità, xoljiment ta' kolonji u telf ta' abilità li żżomm f'wiċċ l-ilma, u fit-tul u dehra ta' għeruq, għandhom jiġu nnutati. Karatteristiċi sinifikanti tal-midjum tat-test (eż preżenza ta' materjal li ma nħallx, tkabbir ta' alga fil-kontenitur tat-test) għandhom jiġu nnutati.

Barra minn determinazzjonijiet tal-għadd ta' frondi matul it-test, l-effetti tas-sustanza tat-test fuq waħda (jew iktar) mill-varjabbli ta' kejl li ġejjin huma vvalutati wkoll:

(i) erja totali tal-frond,

(ii) piż niexef,

(iii) piż frisk

L-erja totali tal-frond għandha l-vantaġġ li tista' tiġi ddeterminata għal kull test u l-kontenitur tal-kontroll fil-bidu, matul u fit-tmiem tat-test. Piż niexef jew frisk għandu jiġi ddeterminat fil-bidu tat-test minn kampjun ta' kultura ta' inoculum rappreżentativ ta' dak li jkun użat biex jinbeda t-test, u fit-tmiem tat-test bil-materjal ta' pjanti minn kull kontenitur tat-test u kontroll. Jekk l-erja ta' frond ma tkunx imkejla, piż niexef huwa preferut fuq piż frisk.

L-erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk jistgħu jiġu ddeterminati kif ġej:

(i) *Erja totali tal-frond*: L-erja totali tal-frond tal-kolonji kollha tista' tiġi ddeterminata permezz ta' analiżi tal-immaġini. Dell tal-kontenitur tat-test jista' jiġi miġbud permezz ta' kamera tal-vidjo (i.e. billi l-kontenitur jitpoġġa fuq kaxxa ta' dawl) u l-immaġini li tirriżulta tinqaleb għal waħda diġitali. Bil-kalibrazzjoni ma' forom ċatti ta' erja magħrufa, l-erja totali tal-frond f'kontenitur tat-test tista' tiġi mbagħad iddeterminata. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi eskluża interferenza kkważata mill-bordura tal-kontenitur tal-vettura. Approċċ alternattiv iżda li jieħu iktar xogħol huwa li jittieħdu ritratti tal-kontenituri tat-test u pjanti, taqta' d-dell tal-kolonji li jirriżulta u tiddetermina l-erja tagħhom permezz ta' analizzatur ta' erja ta' weraq jew karti millimetrati. Tekniki oħra (eż. ir-ratio ta' toqol ta' karta bejn l-erja ta' dell tal-kolonji u l-erja ta' unità) jistgħu jkunu adegwati wkoll.

(ii) *Piż niexef*: Il-kolonji kollha huma miġbura minn kull kontenitur tat-test u maħsulin b'ilma distillat jew dejonizzat. L-ilma żejjed tagħhom jitneħħa billi jiġi assorbit u mbagħad huma jiġu mnixxfa f'60 °C għal piż kostanti. Kull biċċiet ta' għeruq għandhom jiġu inklużi. Il-piż niexef għandu jiġi espress b'eżattezza ta' mill-inqas 0,1 mg.

(iii) *Piż frisk*: Il-kolonji kollha huma trasferiti għal ġo tubi li jkunu ntiżnu qabel, magħmula minn polistrene (jew materjal ieħor li ma jagħmilx reazzjoni kimika), b'toqob żgħar (ta' 1 mm) fil-qiegħan tondi. It-tubi huma mbagħad ċentrifugati bi 3 000 rpm għal 10 minuti f'temperatura ambjentali. Tubi, li issa jkun fihom kolonji mnixxfa, huma miżuna mill-ġdid u l-piż frisk huwa kkalkulat billi jitnaqqas il-piż tat-tubu vojt.

1.7.10.1. *Frekwenza ta' kejl u determinazzjoni analitika*

Jekk tintuża sistema ta' ttestjar statiku, il-pH għandha tiġi mkejla fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Jekk tintuża sistema ta' ttestjar semistatiku, il-pH għandha tiġi mkejla f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test "ġdida" qabel kull tiġdid u f'soluzzjonijiet korrispondenti "użati".

L-intensità tad-dawl għandha tiġi mkejla fil-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra f'punti fl-istess distanza mis-sors ta' dawl bħall-frondi *Lemna*. Kejl irid isir mill-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-midjum fil-kontenitur sostitwit miżmum fl-istess kundizzjonjiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandhom jiġu rreġistrati mill-inqas darba kuljum.

Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma ddeterminati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiċi, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

F'testijiet semi-statiċi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma hijiex mistennija li tibqa' fi ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, hu neċessarju li f'kull tiġdid jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test preparati riċentement u l-istess soluzzjonijiet (ara t-tielet paragrafu fit-taqsima 1.7.7). Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza tat-test mhix fi ± 20 % tan-nominali, iżda fejn evidenza suffiċjenti tista' tiġi pprovduta biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (i.e. fil-gamma 80-120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jsiru biss fuq l-ogħla u l-iktar konċentrazzjonijiet baxxi tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test qabel it-tiġdid hemm biss bżonn li ssir f'replika waħda f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tal-kontenituri miġbura skont ir-replika).

Jekk jintuża test flow-through, sistema ta' teħid ta' kampjuni simili għal dak deskritt għal testijiet semi-statiċi, inkluż l-analiżi fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem tat-test, huwa adegwat, iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet "użati" mhux idoneju f'dan il-każ. F'dan it-tip tat-test, ir-rata ta' fluss ta' dilwent u sustanzi tat-test jew soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ta' sustanza tat-test għadhom jiġu ċċekjati kuljum.

Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza li qiegħda tiġi ttestjata kienet miżmuma b'mod sodisfaċenti fi ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew dik imkejla inizjalment, matul it-test, analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq il-valuri nominali jew inizjali imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew dik inizjali mkejla hija ikbar minn ±20 %, analiżi tar-riżultati għandha tkun imsejsa fuq il-medja ġeometrika tal-konċentrazzjoni matul l-espożizzjoni jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (11).

1.7.11. Test tal-limitu

F'għadd ta' ċirkustanzi, eż. meta test preliminarju jindika li s-sustanza tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi fuq konċentrazzjonijiet sa 100 mg l^{-1}, jew sal-limitu tas-solubilità fil-midjum tat-test (liema minnhom huwa l-iktar baxx), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil ta' reazzjonijiet fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament (100 mg l^{-1} jew konċentrazzjoni daqs il-limitu tas-solubilità). Huwa rrakkomandat b'enfasi li dan ikun mgħejjun b'analiżi tal-konċentrazzjoni ta' espożizzjoni. Il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità kollha deskritti qabel japplikaw għat-test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li l-għadd ta' repliki ta' trattament irid ikun irduppjat. Tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz tat-test statistiku li jqabbel ir-riżultati medji, eż. Student's t-test.

2. DEJTA U RAPPURTAR

2.1. ĦIN TA' RDUPPJAR

Biex jiġi ddeterminat iż-żmien ta' rduppjar (T_d) tal-għadd tal-frondi u l-aderenza ma' dan il-kriterju ta' validità bl-istudju (it-taqsima 1.6), il-formula li ġejja hija użata flimkien ma' dejta miġjuba mill-kontenituri tal-kontroll:

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

fejn μ hija r-rata ta' medja ta' tkabbir speċifiku ddeterminat kif deskritt fl-ewwel u fit-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1.

2.2. VARJABBLI TA' RISPONS

L-għan tat-test hu li jiddetermina l-effett tas-sustanza tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv ta' *Lemna*. Dan il-Metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, għax pajjiżi membri għandhom preferenzi u bżonnijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-testijiet ikunu aċċettabli fil-pajjiżi membri kollha, l-effetti għandhom jiġu vvalutati billi jintużaw kemm il-varjabbli (a) u kemm dik (b) li huma deskritti hawn taħt.

(a) Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat mhux biss fuq il-bażi ta' bidliet fil-logaritmi tan-numri tal-frond, iżda wkoll fuq il-bażi ta' bidliet fil-logaritmi ta' parametru ieħor ta' kejl (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk) fuq il-ħin (espress bħala ġranet) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament. Xi drabi issir referenza għal dan bħala rata relattiva ta' tkabbir (15).

(b) Rendiment: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat mhux biss fuq il-bażi ta' bidliet fl-għadd tal-frondi, iżda wkoll fuq il-bażi ta' bidliet f'parametru ieħor ta' kejl (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament sat-tmiem tat-test.

Għandu jiġi nnutat li l-valuri ta' tossiċità kkalkulati permezz tal-użu ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jiġu mqabbla u din id-differenza trid tiġi rikonoxxuta meta r-riżultati tat-test jiġu użati. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) ikunu ġeneralment ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux ikun interpretat bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, sempliċement għax il-valuri huma differenti matematikament. Il-kunċett ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku huwa bbażat fuq il-mudell ġenerali ta' tkabbir esponenzjali ta' duckweed f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija kkalkulata fuq il-bażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir mingħajr ma tkun dipendenti fuq il-livell assolut tar-rata speċifika ta' tkabbir tal-kontroll, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni-rispons jew fuq id-dewmien tat-test. B'kuntrast, riżultati bbażati fuq il-varjabbli ta' rispons tar-rendiment huma dipendenti fuq dawn il-varjabbli l-oħrajn kollha. E_yC_x hija dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċje tad-duckweed użata fit-test u fuq ir-rata massima speċifika ta' tkabbir li tista' tvarja bejn speċi jew anki kloni differenti. Dan il-varjabbli ta' rispons ma għandux jintuża biex tqabbel is-sensittivita għal sustanzi tossiċi fost l-ispeċi tad-duckweed jew anki kloni differenti. Waqt li l-użu ta' rata medja speċifika ta' tkabbir biex tikkalkula t-tossiċita hija xjentifikament preferuta, kalkoli ta' tossiċità bbażati fuq rendiment huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu ta' ttestjar biex jissodisfaw ir-rekwiżiti regolatorji f'xi pajjiżi.

Kalkoli ta' tossiċità għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u fuq varjabbli ta' kejl ieħor addizzjonali (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk), għaliex xi sustanzi jistgħu jaffetwaw varjabbli oħra ta' kejl ħafna iktar mill-għadd tal-frondi. Dan l-effett ma jiġix rivelat billi tikkalkula l-għadd tal-frondi biss.

L-għadd ta' frondi kif ukoll kull varjabbli ieħor ta' kejl reġistrat, i.e. erja totali tal-frond, piż niexef jew piż frisk, huma mniżżlin f'tabella flimkien mal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test ta' kull okkażjoni ta' kejl. Analiżi tad-dejta sussegwenti eż. biex tikkalkula LOEC, NOEC jew EC_x għandhom ikunu bbażati fuq il-valuri għar-repliki individwali u mhux fuq medji kkalkulati għal kull grupp ta' trattament.

2.2.1. Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku

Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku għal perjodu speċifiku tiġi kkalkulata fuq iż-żjieda logaritmika fil-varjabbli ta' tkabbir — numri ta' frond u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef jew piż frisk) — billi tintuża l-formula ta' hawn taħt għal kull replika ta' kontroll u trattamenti:

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

fejn:

— $\mu_{i\text{-}j}$: rata medja ta' tkabbir speċifiku minn ħin i sa j

— N_i: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin i

— N_j: varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'ħin j

— t: perjodu ta' ħin minn i sa j

Għal kull grupp ta' trattament jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni.

Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku għandha tkun ikkalkulata għal-perjodu sħiħ tat-test (ħin "i" fil-formula ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata medja ta' tkabbir flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni. Għandha tiġi wkoll stimata r-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni sabiex jiġu vvalutati effetti tas-sustanza tat-test li jivverifikaw ruħhom matul il-perjodu ta' espożizzjoni (eż. billi jiġu eżaminati l-kurvi ta' tkabbir trasformati f'logaritmi). Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni u r-rata medja ta' tkabbir jindikaw devjazzjoni mit-tkabbir esponenzjali kostanti u għandha issir eżaminazzjoni bir-reqqa tal-kurvi ta' tkabbir. F'dan il-każ, approċċ konservattiv ikun li jiġu mqabbla r-rati ta' tkabbir speċifiku minn kulturi ittrattati waqt il-perjodu ta' ħin ta' inibizzjoni massima ma' kontrolli waqt l-istess perjodu ta' ħin.

Persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

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

fejn:

— $\%I_r$: persentaġġ ta' inibizzjoni fir-rata medja ta' tkabbir speċifiku

— μ_C: valur medju għal μ fil-kontroll

— μ_T: valur medju għal μ fil-grupp ta' trattament

2.2.2. Rendiment

Effetti fuq ir-rendiment huma determinati fuq il-bażi ta' żewġ varjabbli ta' kejl, għadd ta' frondi u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef u piż frisk) preżenti f'kull kontenitur tat-test fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Għal piż niexef u piż frisk, il-bijomassa tal-bidu hija ddeterminata fuq il-bażi ta' kampjun ta' frondi meħud mill-istess lott użat biex tlaqqam il-kontenituri tat-test (ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 1.7.3). Għal kull

konċentrazzjoni tat-test jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rendiment flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni. Il-persentaġġ medju ta' inibizzjoni f'termini ta' rendiment (% I_y) tista' tiġi kkalkulata għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

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

fejn:

— % I_y: persentaġġ tat-tnaqqis fir-rendiment

— b_C: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

— b_T: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

2.2.3. Ipplottjar ta' kurvi ta' rispons ta' konċentrazzjoni

Għandhom jiġu pplottjati l-kurvi ta' rispons ta' konċentrazzjoni li juru l-persentaġġ medju ta' inibizzjoni tal-varjabbli tar-rispons (I_r, jew I_y ikkalkulat kif muri fl-aħħar paragrafu tat-taqsima 2.2.1 jew fit-taqsima 2.2.2) u l-konċentrazzjoni logaritmika tas-sustanza tat-test.

2.2.4. Estimi ta' EC_x

Estimi ta' EC_x (eż. EC_{50}) għandhom dejjem ikunu bbażati kemm fuq ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) kif ukoll fuq ir-rendiment (E_yC_x), u t-tnejn li huma għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk). Dan għaliex hemm sustanzi tat-test li jinfluwenzaw l-għadd ta' frondi u l-varjabbli ta' kejl oħra b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (għadd tal-frondi); E_rC_x (erja totali tal-frondi, piż niexef, jew piż frisk); E_yC_x (għadd tal-frondi); u E_yC_x (erja totali tal-frondi, piż niexef, jew piż frisk).

2.3. PROĊEDURA STATISTIKA

L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni konċentrazzjoni-rispons permezz ta' analiżi ta' regressjoni. Huwa possibbli li tiġi użata regressjoni medja lineari wara li ssir trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta ta' rispons — pereżempju f'unità probit jew logit jew Weibull (16), iżda proċeduri non-lineari ta' regressjoni huma ppreferuti għax jittrattaw aħjar l-irregolaritajiet inevitabbli ta' dejta u d-devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet lixxi. Qrib l-inibizzjoni żero jew inibizzjoni totali, dawn l-irregolaritajiet jistgħu jiġu mkabbra bit-trasformazzjoni, u dan ifixkel l-analiżi (16). Għandu jiġi nnutat li l-metodi standard ta' analiżi li jużaw trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għal użu fuq dejta ta' natura quantal (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu mmodifikati biex jagħmlu tajjeb għal dejta tar-rata ta' tkabbir jew rendiment. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinstabu fi (17), (18), u (19).

Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Fejn huwa possibbli, il-limiti ta' kunfidenza tal-95 % għal kull stima għandhom jiġu ddeterminati. Il-livell ta' kemm huwa tajjeb l-adattament tad-dejta ta' rispons għall-mudell ta' regressjoni għandu jiġi stmat grafikament jew statistikament. L-analiżi ta' regressjoni għandha ssir bl-użu ta' risponsi ta' repliki individwali, u mhux medji ta' gruppi ta' trattament.

Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jinkisbu bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (20), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibbli mhumiex xierqa għad-dejta.

Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa neċessarju li jiġu mqabbla l-medji ta' trattament permezz ta' użu ta' analiżi ta' tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja ta' kull konċentrazzjoni għandha mbagħad tiġi mqabbla mal-medja ta' kontroll billi jintuża metodu xieraq ta' paragun multiplu jew metodu tat-test trend. Test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun utli (21)(22)(23)(24). Huwa neċessarju li tivvaluta jekk l-ipotesi ANOVA ta' omoġeneità ta' varjanza treġix. Din il-valutazzjoni tista' ssir grafikament jew b'test formali (25). Testijiet adegwati huma dak ta' Levene jew Bartlett. Nuqqas li tintlaħaq l-ipotesi ta' omoġeneità ta' varjanzi tista' xi drabi tiġi kkoreġuta permezz ta' trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, analiżi b'metodi bħal testijiet ta' trend 'l isfel Jonkheere għandhom jiġu kkunsidrati. Iktar indikazzjoni dwar id-determinazzjoni tal-NOEC tista' tinstab f' (19).

Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimi EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan il-*Lemna* test. Madankollu, sensiela ta' minn 10 sa 20 % tidher xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment l-EC_{10} u l-EC_{20} għandhom jiġu rrapurtati t-tnejn li huma.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dawn li ġejjin:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi, li jinkludu l-limitu ta' solubilità tal-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni kimika (eż. In-Numru CAS), li tinkludi l-purità.

Speċi tat-test:

— isem xjentifiku, klonu (jekk magħruf) u sors.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-proċedura tat-test użat (statiku, semi-statiku jew flow-through);

— id-dejta tal-bidu tat-test u d-dewmien tiegħu;

— il-midjum tat-test:

— deskrizzjoni tad-diżinn sperimentali: kontenituri tat-test u għata, volumi ta' soluzzjoni, għadd ta' kolonji u frondi kull kontenitur tat-test fil-bidu tat-test;

— konċentrazzjoniet tat-test (nominali u mkejla kif inhu xieraq) u għadd ta' repliki għal kull konċentrazzjoni:

— metodi ta' preparazzjoni ta' materjal b'konċentrazzjoni standardizzata u soluzzjonijiet tat-test li jinkludi l-użu ta' xi solventi jew dispersanti;

— temperatura matul it-test;

— sors ta' dawl, intensità tad-dawl u omoġeneità;

— valuri ta' pH tat-test u tal-midja ta' kontroll;

— konċentrazzjonijiet ta' sustanzi tat-test u l-metodu ta' analiżi b'dejta xierqa ta' ivvalutar ta' kwalità (studji ta' validazzjoni, devjazzjonijiet standard u l-limiti ta' kunfidanza ta' analiżi);

— metodi għal determinazzjoni tal-għadd tal-frondi u varjabbli ieħor ta' kejl eż. piż niexef, piż frisk u erja ta' frond;

— kull devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' ttestjar.

Riżultati:

— dejta mhux elaborata: għadd ta' frondi u varjabbli oħra ta' kejl f'kull test u kontenitur ta' kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni ta' analiżi;

— medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;

— kurvi ta' tkabbir għal kull konċentrazzjoni (irrakkomandata ma' varjabbli ta' kejl logaritmikament trasformat, ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1);

— ħin ta' rduppjar/rata ta' tkabbir fil-kontroll ibbażat fuq l-għadd ta' frondi;

— varjabbli ta' rispons ikkalkulati għal kull replika ta' trattament, b'valuri medji u varjazzjoni ta' koeffiċjent għar-repliki;

— rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni konċentrazzjoni/effett;

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalukulati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— jekk ANOVA kienet użata, id-daqs tal-effett li jista' jiġi individwat (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);

— kull stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba f'kull trattament;

— kull sinjal li jidher ta' fitotossiċità u kif ukoll osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati, li tinkludi kull influwenza fuq ir-riżultat tat-test li ħarġet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' ttestjar.

4. LETTERATURA

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test

(2) The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) 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.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

(8) 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

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) 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.

(11) 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.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(14) 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.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(17) 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.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(23) 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.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(25) 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.

Appendiċi 1

Deskrizzjoni ta' *Lemna* spp.

Il-pjanta akkwatika li komunement tissejjaħ bħala ħażiż li jgħatti l-wiċċ tal-ilma qiegħed (duckweed), Lemna spp., hija parti mill-familja Lemnaceae li għandha għadd ta' speċi madwar id-dinja f'erba' ġenera. Id-dehra u t-tassonomija differenti tagħhom ġew deskritti b'mod sħiħ (1)(2). *Lemna gibba* u *L. minor* huma speċi rappreżentattivi ta' postijiet b'temperatura moderata u huma komunement użati għal testijiet ta' tossiċità. Iż-żewġ speċi għandhom werqa biz-zokk (frond) tonda li żżomm fil-wiċċ jew taħt il-wiċċ tal-ilma, u għerq irqiq ħafna joħroġ minn nofs tal-wiċċ l-iktar baxx ta' kull frond. Lemna spp. rari tipproduċi fjuri u l-pjanti jitnisslu billi veġetattivament jipproduċu frondi ġodda (3). B'kuntrast ma' pjanti ixjaħ, iż-żgħar għandhom it-tendenza li jkunu iktar ċari, li jkollhom għeruq iqsar u jikkonsisti minn tnejn sa tliet frondi ta' daqsijiet differenti. Id-daqs żgħir ta' *Lemna*, l-istruttura sempliċi tagħha, ir-riproduzzjoni u l-ħin qasir ta' ġenerazzjoni jagħmlu pjanti ta' dan il-ġeneru tajbin ħafna għal ittestjar fil-laboratorju (4)(5).

Minħabba differenza probabbli bejn l-ispeċi, fis-sensittività, paraguni ta' sensittività fost speċi waħda biss huma validi.

Eżempji ta' speċi ta' *Lemna* li ġew użati għal ittestjar: Referenza għal Speċi

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 (USEPA). (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.

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

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

Sorsi ta' speċijiet ta' *Lemna*

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

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

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

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Letteratura

(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.

Appendiċi 2

Manteniment ta' kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata

Kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata jistgħu jiġu miżmuma f'temperaturi iktar baxxi (4-10 °C) għal ħinijiet itwal mingħajr il-bżonn li jerġgħu jsiru mill-ġdid. Il-midjum ta' tkabbir ta' Lemna jista' jkun l-istess bħal dak użat għal ittestjar iżda midja oħra rikka fin-nutrijenti tista' tintuża għal kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata.

Kull tant żmien, għadd ta' pjanti żgħar ta' lewn aħdar ċar jitpoġġew f'kontenituri ġodda ta' kultura li fihom ikun hemm midjum ġdid b'teknika asettika. Skont il-kundizzjonijiet iktar kesħin irrakkomandati hawn, sub-kultura tista' ssir f'intervalli ta' massimu ta' tliet xhur.

Kontenituri tal-ħġieġ ta' kultura li huma kimikament nodfa (maħsulin bl-aċidu) u sterili għandhom jintużaw u tekniki asettiċi ta' maneġġjar għandhom jiġu implimentati. F'każ ta' kontaminazzjoni ta' kultura b'konċentrazzjoni standardizzata eż minn alga jew faqqiegħ, għandhom jittieħdu passi biex organiżmi ta' kontaminazzjoni jiġu eliminati. Fil-każ ta' alga u ħafna mill-organiżmi ta' kontaminazzjoni oħrajn, dan jista' jsir permezz ta' sterilizzazzjoni. Kampjun tal-materjal ta' pjanti kontaminat għandu jittieħed u l-għeruq jinqatgħu. Dan il-materjal jiġi mbagħad imlaħlaħ b'saħħa f'ilma nadif, u mbagħad mgħaddas ġo soluzzjoni 0,5 % (v/v) sodium hypochlorite għal bejn 30 sekonda u 5 minuti. Il-materjal ta' pjanti huwa mbagħad imlaħlaħ b'ilma sterili u trasferit, bħala għadd ta' lottijiet, f'kontenituri ta' kultura li fihom ikun hemm midjum ta' tkabbir frisk. Ħafna frondi jmutu bħala riżultat ta' dan it-trattament, speċjalment jekk jintużaw perjodi ta' espożizzjoni itwal, imma xi wħud minn dawk li jsalvaw ikunu ġeneralment ħielsa minn kontaminazzjoni. Dawn jistgħu mbagħad jintużaw biex jerġgħu jlaqqmu kulturi ġodda.

Appendiċi 3

Midja

Midja differenti ta' tkabbir huma rrakkomandati għal *L. minor u L. gibba*. Għal *L. minor*, midjum ta' Standard Svediż (SIS) modifikat huwa rrakkomandat waqt li għal *L. gibba*, midjum 20X AAP huwa rrakkomandat. Kompożizzjonijiet taż-żewġ midja huma mogħtija hawn taħt. Meta dawn il-midja jiġu ppreparati, reagent jew sustanzi kimiċi ta' grad analitiku u ilma dejonizzat għandhom jintużaw.

Standard Svediż (SIS) midjum ta' tkabbir ta' Lemna

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata I-V huma sterilizzati b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15 minuti) jew b'tisfija minn membrana (b'daqs tal-pori ta' ċirka 0,2 m).

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata VI (u VII bħala għażla oħra) huma sterilizzati biss permezz ta' tisfija minn membrana; dawn ma għandhomx jiġu awtoklavati.

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata sterili għandhom jinħaznu f'kundizzjonijiet friski u mudlama. Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata I-V għandhom jintremew wara sitt xhur waqt li soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata VI (u VII bħala għażla oħra) jiskadu wara xahar.

Soluzzjoni B'konċentrazzjoni standardizzata Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata (g l^{-1})	Konċentrazzjoni fil-midjum ippreparat (mg l^{-1})	Midjum ippreparat	
				Element	Konċentrazzjoni (mg·l^{-1})
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffer)	490	490	—	—

— Sabiex tipprepara litru ta' midjum SIS, dawn li ġejjin jiżdiedu ma' 900 ml ta' ilma dejonizzat:

— 10 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata I

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata II

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata III

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata IV

— 1 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata V

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VI

— 1 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VII (jekk trid)

Nota: Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VII oħra (buffer MOPS) tista' tkun neċessarja għal ċerti sustanzi tat-test (ara l-aħħar paragrafu fit-taqsima 1.4).

— Il-pH huwa aġġustat għal 6,5 ± 0,2 b'0.1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b'ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir 20X AAP

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma ppreparati f'ilma sterili distillat jew dejonizzat.

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata sterili għandhom jinħaznu f'kundizzjonijiet friski u mudlama. F'dawn il-kundizzjonijiet is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata ma jiskadux qabel 6-8 ġimgħat.

Ħames soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata ta' nutrijent (A1, A2, A3, B and C) huma ppreparati għal midjum 20X — AAP, bl-użu ta' sustanżi kimiċi ta' grad reagent. 20 ml ta' kull soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ta' nutrijent huma miżjuda ma' ċirka 850 ml ta' ilma dejonizzat biex jiġi prodott il-midjum ta' tkabbir. Il-pH huwa aġġustat għal 7,5 ± 0,1 b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b'ilma dejonizzat. Il-midjum jiġi mbagħad imsaffi minn filtru ta' membrana ta' (ċirka) 0,2 µm għal ġo kontenitur sterili.

Il-midjum ta' tkabbir maħsub għal ittestjar għandu jkun ippreparat minn jum sa 2 qabel l-użu sabiex il-pH jilħaq joqgħod. Il-pH ta' midjum ta' tkabbir għandu dejjem jiġi kkontrollat qabel l-użu u aġġustat mill-ġdid, jekk neċessarju, biż-żieda ta' 0,1 jew 1 M NaOH jew HCl kif deskritt hawn fuq.

Soluzzjoni konċentrata Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata (g l^{-1}) (*)	Konċentrazzjoni fil-midjum ippreparat (mg l^{-1}) (*)	Midjum ippreparat	
				Element	Konċentrazzjoni (mg·l^{-1}) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg·l^{-1}	66 µg·l^{-1}	Zn	31 µg·l^{-1}
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg·l^{-1}	29 µg·l^{-1}	Co	7,1 µg·l^{-1}
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg·l^{-1}	145 µg·l^{-1}	Mo	58 µg·l^{-1}
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg·l^{-1}	0,24 µg·l^{-1}	Cu	0,080 µg·l^{-1}
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Sakemm mhux indikat

Nota: Il-konċentrazzjoni finali ta' bikarbonat teoretikament tajba (li tevita aġġustament ta' pH notevoli) hija ta' 15 mg/l, mhux ta' 300 mg/l. Madankollu, l-użu storiku ta' midjum 20X-AAP, inkluż ir-ring test għal dan il-metodu, huwa bbażat fuq 300 mg/l. (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.

Midjum STEINBERG (skont l-ISO 20079)

Konċentrazzjonijiet u soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata

— Il-midjum Steinberg modifikat huwa użat fl-ISO 20079 għal *Lemna minor* waħedha (għaliex *Lemna minor* biss hija permessa f'dan l-istandard) iżda testijiet urew li riżultati tajbin jistgħu jinkisbu b'*Lemna gibba* wkoll.

— Meta dan il-midjum jiġi ppreparat, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi reagent jew sustanzi kimiċi ta' grad analitiku u ilma dejonizzat.

— Ipprepara l-midjum ta' nutrijent minn soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata jew il-midjum b'konċentrazzjoni standardizzata għal 10 darbiet li jippermetti konċentrazzjoni massima tal-midjum mingħajr preċipitazzjoni.

Tabella 1

Midjum STEINBERG b'pH stabilizzata (modifikat skont Altenburger)

Sustanza		Midjum ta' nutrijenti	
Makroelementi	piż mol	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelementi	piż mol	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA Disodium-dihydrate	372,24	1 500,00	4,03

Tabella 2

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata (Makroelementi)

1. **Makroelementi (b'konċentrazzjoni standardizzata 50 darba)**	g/l
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata (Mikroelementi)

2. **Mikroelementi (b'konċentrazzjoni standardizzata 1 000 darba)**	mg/l
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA Disodium-dihydrate	1 500,00

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 2 u 3 u separatament 4 u 7 jistgħu jinġabru flimkien (b'kunsiderazzjoni għal-konċentrazzjonijiet rikjesti).

— Biex ittawwal id-data ta' skadenza, ittratta is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata f'awtoklavi f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min jew inkella għamel tisfija sterili (0,2 µm). Għal soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8, tisfija sterili (0,2 µm) hija rrakkomandata ħafna.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni finali ta' midjum STEINBERG (modifikat)

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 1, 2 u 3 (ara tabella 2) ma' ċirka 900 ml ta' ilma dejonizzat sabiex tevita li sseħħ preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 4, 5, 6, 7 u 8 (ara tabella 3).

— Il-pH irid ikun 5,5 ± 0,2 (aġġusta billi żżid volum minimizzat ta' soluzzjoni NaOH jew HCl)

— Aġġusta bl-ilma għal 1 000 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma sterilizzati u ilma tajjeb huwa użat ma hemm bżonn l-ebda sterilizzazzjoni oħra. Jekk sterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, is-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8 għandha tiżdied wara awtoklavazzjoni (f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min).

Preparazzjoni ta' midjum STEIBERG (modifikat) 10 darbiet b'konċentrazzjoni standardizzata għal ħażna intermedja

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata nri 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' ċirka 30 ml ta' ilma sabiex tevita li sseħħ preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml tas-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata nri 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3). Aġġusta bl-ilma għal 100 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma sterilizzati u ilma tajjeb huwa użat ma hemm bżonn l-ebda sterilizzazzjoni oħra. Jekk sterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, is-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata nru 8 għandha tiżdied wara l-awtoklavazzjoni (f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min).

— Il-pH tal-midjum (konċentrazzjoni finali) għandha tkun 5,5 ± 0,2.