II

(Atti mhux leġiżlattivi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) 2016/266

tas-7 ta' Diċembru 2015

li jemenda, għall-finijiet tal-adattament tiegħu 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'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

Wara li kkunsidrat it-Trattat dwar il-Funzjonament tal-Unjoni 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 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 ([1]), u b'mod partikolari l-Artikolu 13(2) tiegħu,

Billi:

(1) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 ([2]) fih il-metodi ta' ttestjar għall-finijiet tad-determinazzjoni tal-karatteristiċi fiżikokimiċi, it-tossiċità u l-ekotossiċità ta' sustanzi kimiċi li għandhom jiġu applikati għall-finijiet tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006.

(2) Hemm il-ħtieġa li r-Regolament (KE) Nru 440/2008 jiġi aġġornat biex jinkludi metodi ġodda u aġġornati ta' ttestjar adottati dan l-aħħar mill-OECD sabiex jitqies il-progress tekniku, u biex jiġi żgurat it-tnaqqis fl-għadd ta' annimali li jintużaw għal skopijiet sperimentali, b'konformità mad-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill ([3]). Il-partijiet interessati ġew ikkonsultati dwar dan l-abbozz.

(3) L-adattament fih għoxrin metodu ta' ttestjar, metodu wieħed ġdid għad-determinazzjoni ta' karatteristika fiżikokimika, ħdax-il metodu ġdid ta' ttestjar u tliet metodi aġġornati ta' ttestjar għall-valutazzjoni tal-ekotossiċità, u ħames metodi ġodda ta' ttestjar għall-valutazzjoni tad-destin u l-imġiba ambjentali.

(4) Għalhekk, ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 għandu jiġi emendat skont dan.

(5) Il-miżuri previsti f'dan ir-Regolament huma konformi mal-opinjoni tal-Kumitat imwaqqaf skont l-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

([1]) ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

([2]) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 tat-30 ta' Mejju 2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skond 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) (ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1).

([3]) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat- 22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

L-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008 huwa emendat skont l-Anness għal dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Dan ir-Regolament għandu jidħol fis-seħħ fit-tielet jum wara dak tal-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, is-7 ta' Diċembru 2015.

Għall-Kummissjoni

Il-President

Jean-Claude JUNCKER

ANNESS

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

(1) Hija mdaħħla nota fil-bidu tal-Anness, qabel il-Parti A:

"Nota:

Qabel ma jintuża xi wieħed mill-metodi ta' ttestjar li ġejjin biex tiġi ttestjata sustanza multikostitwenti (MCS), sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodott ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku (UVCB), jew taħlita u fejn l-applikabbiltà tiegħu għall-ittestjar ta' MCS, UVCB jew taħlitiet ma tkunx indikata fil-medtodu tal-ittestjar rispettiv, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-metodu huwiex xieraq għall-finijiet regolatorji maħsuba.

Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' MCS, UVCB jew taħlita, għandha titqiegħed kemm jista' jkun disponibbli biżżejjed informazzjoni dwar il-kompożizzjoni tagħha, eż. mill-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva tagħhom, u l-proprjetajiet rilevanti tal-kostitwenti tagħha."

(2) Huwa miżjud il-Kapitolu A.24:

"A.24. **KOEFFIĊJENT TA' PARTIZZJONI (N-OTTANOL/ILMA), METODU TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA BI PRESTAZZJONI GĦOLJA (HPLC)**

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar tal-OECD (TG) 117 (2004)

1. Il-koeffiċjent ta' partizzjoni (P) huwa ddefinit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet tal-ekwlibriju ta' sustanza maħlula f'sistema b'żewġ fażijiet li tikkonsisti f'żewġ solventi li fil-parti l-kbira ma jistgħux jithalltu. Fil-każ ta' n-ottanol u ilma,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \ octanol}{C_{\ water}}$$

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni li huwa l-kwozjent ta' żewġ konċentrazzjonijiet, huwa mingħajr dimensjoni u normalment jingħata fil-forma tal-logaritma tiegħu għal bażi ta' għaxra.

2. P_{ow} huwa paremetru ewlieni fl-istudji tad-destin ambjentali tas-sustanzi kimiċi. Intweriet relazzjoni sinifikanti ħafna bejn il-P_{ow} ta' forma mhux jonizzata ta' sustanzi u l-bijoakkumulazzjoni tagħhom fil-ħut. Intwera wkoll li P_{ow} huwa parametru utli fit-tbassir tal-adsorbiment fil-ħamrija u n-naqal u għall-istabbiliment ta' relazzjonijiet bejn l-istruttura u l-attività kwantitattivi għal firxa wiesgħa ta' effetti bijoloġiċi.

3. Il-proposta oriġinali għal dan il-metodu ta' ttestjar kienet ibbażata fuq artiklu minn C.V. Eadsforth u P. Moser (1). L-iżvilupp tal-metodu ta' ttestjar u test ta' tqabbil bejn il-laboratorji tal-OECD kienu kkoordinati mill-Umweltbundesamt tar-Repubblika Federali tal-Ġermanja matul l-1986 (2).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

4. Valuri log P_{ow} fil-medda – 2 sa 4 (xi drabi sa 5 u iktar) ([1]) jistgħu jiġu determinati b'mod sperimentali bil-metodu Flask tat-Theżżiż (Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Linja Gwida tat-Test 107 tal-OECD). Il-metodu HPLC ikopri log P_{ow} fil-medda ta' 0 sa 6 (1)(2)(3)(4)(5). Dan il-metodu jaf ikun jeħtieġ stima tal-P_{ow} biex jassenja s-sustanzi ta' referenza xierqa u jappoġġja kwalunkwe konklużjoni maħruġa mid-dejta ġġenerata mit-test. Il-metodi ta' kalkolu huma diskussi fil-qosor fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-modalità ta' operazzjoni HPLC hija isokratika.

5. Il-valuri tal-P_{ow} jiddependu mill-kundizzjonijiet ambjentali bħat-temperatura, il-pH, is-saħħa jonika eċċ, u dawn għandhom jiġu ddefiniti fl-esperiment għall-interpretazzjoni korretta tad-dejta dwar il-P_{ow}. Għal sustanzi jonizzabbli, metodu ieħor (eż. abbozz tal-linja gwida tal-OECD dwar il-metodu metriku tal-pH għal sustanzi jonizzati (6)) jista' jsir disponibbli u jista' jintuża bħala metodu alternattiv. Għalkemm dan l-abbozz tal-lingwa gwida tal-OECD jaf ikun xieraq biex jiġi ddeterminat il-P_{ow} għal dawn is-sustanzi jonizzabbli, f'xi każijiet huwa iktar xieraq li jintuża l-metodu HPLC f'pH ambjentalment rilevanti (ara l-paragrafu 9).

([1]) Jingħata limitu superjuri minħabba l-ħtieġa li tintlaħaq fażi ta' separazzjoni kompleta wara l-aġġustamenti tal-ekwilibriju tal-partizzjoni u qabel jittiehdu kampjuni għal analiżijiet kwantitattivi. Jekk tingħata attenzjoni xierqa, il-limitu superjuri jista' jiġi estiż għal valuri ogħla ta' P_{ow}

PRINĊIPJU TAL-METODU

6. Titwettaq HPLC f'fażi inversa fuq kolonni analitiċi ppakkjati b'fażi solida kummerċjalment disponibbli li fihom ktajjen tal-idrokarburi twal (eż. C_8, C_{18}) magħqud kimikament mas-siliċju.

7. Sustanza kimika injettata f'tali partizzjonijiet tal-kolonna bejn il-fażi tas-solvent mobbli u l-fażi stazzjonarja tal-idrokarbouri hekk kif tiġi ttrasportata tul il-kolonna mill-fażi mobbli. Is-sustanzi jinżammu fi proporzjon tal-koeffiċjent ta' partizzjoni idrokarbur/ilma tagħhom, b'sustanzi idrofiliċi elwiti l-ewwel u sustanzi lipofiliċi l-aħħar. Il-ħin ta' żamma huwa deskritt mill-fattur ta' kapaċità k ikkalkolat bl-espressjoni:

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

fejn t_R huwa l-ħin ta' żamma tas-sustanza tat-test, u t_0 huwa l-ħin mejjet, jiġifieri l-ħin medju li molekula tas-solvent teħtieġ biex tgħaddi mill-kolonna. Mhumiex meħtieġa metodi analitiċi kwantitattivi u hija meħtieġa biss id-determinazzjoni tal-ħinijiet ta' żamma.

8. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ottanol/ilma ta' sustanza tat-test jista' jiġi kkalkolat billi jiġi ddeterminat b'mod sperimentali l-fattur tal-kapaċità k tiegħu fejn imbagħad jiddaħħal k fl-ekwazzjoni li ġejja:

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

fejn

a, b = koeffiċjenti ta' rigressjoni lineari.

L-ekwazzjoni ta' hawn fuq tista' tinkiseb bir-rigressjoni lineari tal-log tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanzi ta' referenza kontra l-log tal-fatturi ta' kapaċità tas-sustanzi ta' referenza.

9. Il-metodu HPLC f'fażi inversa jippermetti li jiġu stmati l-koeffiċjenti ta' partizzjoni fil-medda tal-log P_{ow} bejn 0 u 6, iżda jista' jiġi estiż biex ikopri l-medda tal-log P_{ow} bejn 6 u 10 f'każijiet eċċezzjonali. Dan jaf ikun jeħtieġ li tiġi mmodifikata l-fażi mobbli (3). Il-metodu mhuwiex applikabbli għal aċidi u bażijiet b'saħħithom, kumplessi tal-metalli, sustanzi li jkollhom reazzjoni mal-elwent, jew aġenti tensjoattivi. Il-miżuri jistgħu jitwettqu fuq sustanzi jonizzabbli fil-forma mhux jonizzata tagħhom (aċidu ħieles jew bażi ħielsa) biss permezz ta' bafer xieraq b'pH taħt il-pK_a għal aċidu ħieles jew iktar mill-pK_a għal bażi ħielsa. Inkella, il-metodu metriku tal-pH għall-ittestjar ta' sustanzi jonizzabbli (6) jista' jitqiegħed għad-dispożizzjoni u jista' jintuża bħala metodu alternattiv (6). Jekk il-valur tal-log P_{ow} jiġi ddeterminat għall-użu fi klassifikazzjoni tal-perikli tal-ambjent jew f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali, it-test għandu jitwettaq fil-medda ta' pH rilevanti għall-ambjent naturali, jiġifieri fil-medda tal-pH ta' 5,0 - 9.

10. F'xi każijiet, l-impuritajiet jistgħu jagħmlu l-interpretazzjoni tar-riżultati diffiċli minħabba l-inċertezza fl-assenjazzjonijiet tal-ogħla livelli. Għal taħlitiet li jirriżultaw f'faxxa mhux riżolta, għandhom jiġu rrapportati l-limiti superjuri u inferjuri tal-log P_{ow}, u l- % taż-żona tal-ogħla livelli tal-log P_{ow} kollha. Għal taħlitiet li huma gruppi ta' omologi, għandu jiġi ddikjarat ukoll il-log P_{ow} medju ppeżat (7), ikkalkolat abbażi ta' valuri P_{ow} uniċi u l-valuri korrispondenti tal- % taż-żona (8). L-ogħla livelli kollha li jikkontribwixxu għal żona ta' 5 % jew iktar għaż-żona totali tal-ogħla livell għandhom jitqiesu fil-kalkolu (9):

$$\textit{weighted average} \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\textit{area}\ \%)}{\textit{total peak area}\ \%} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\textit{area}\ \%_i)}{\sum_i \textit{area}\ \%}$$

Il-log P_{ow} medju mwieżen huwa validu biss għal sustanzi jew taħlitiet (eż. żjut twal) li jikkonsistu f'omologi (eż. serje ta' alkani). It-taħlitiet jistgħu jitkejlu b'riżultati sinifikanti, sakemm ir-rilevatur analitiku użat ikollu l-istess sensittività għas-sustanzi kollha fit-taħlita u jistgħu jiġu riżolti b'mod adegwat.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

11. Il-kostant ta' dissoċjazzjoni, il-formula strutturali, u s-solubbiltà fil-fażi mobbli għandhom ikunu magħrufin qabel jintuża l-metodu. Barra minn hekk, informazzjoni dwar l-idrolożi tkun utli.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

12. Sabiex tiżdied il-kunfidenza fil-kejl, għandhom isiru determinazzjonijiet doppji.

— Ripetibbiltà: Il-valur tal-log P_{ow} minn kejliet ripetuti li jittieħdu f'kundizzjonijiet identiċi u permezz tal-istess sett ta' sustanzi ta' referenza għandu jaqa' fi ħdan medda ta' ± 0,1 tal-unitajiet tal-log.

— Riproduċibbiltà: Jekk il-kejliet jiġu ripetuti b'sett ta' sustanzi ta' referenza differenti, ir-riżultati jaf ivarjaw. Ġeneralment, il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni R għar-relazzjoni bejn il-log k u l-log P_{ow} għal sett ta' sustanzi tat-test huwa ta' madwar 0,9, li jikkorrispondi għal koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tal-log P_{ow} ± 0,5 unitajiet tal-log.

13. It-test tal-tqabbil bejn il-laboratorji wera li bil-metodu HPLC, il-valuri tal-log P_{ow} jistgħu jinkisbu sa fi ħdan ± 0,5 unitajiet tal-valuri tal-Flask tat-Theżżiż (2). Paraguni oħra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (4)(5)(10)(11)(12). Graffs ta' korrelazzjoni bbażati fuq sustanzi ta' referenza strutturalment relatati jagħtu l-iktar riżultati preċiżi (13).

SUSTANZI TA' REFERENZA

14. Sabiex il-fattur tal-kapaċità k imkejjel jiġi kkorrelat mal-P_{ow} tiegħu, irid jiġi stabbilit graff ta' kalibrazzjoni permezz ta' mill-anqas 6 punti (ara l-paragrafu 24). Huwa f'idejn l-utent li jagħżel is-sustanzi ta' referenza xierqa. Normalment is-sustanzi ta' referenza għandu jkollhom valuri tal-log P_{ow} li jinkludu l-log P_{ow} tas-sustanza tat-test, jiġifieri tal-inqas sustanza ta' referenza waħda għandu jkollha P_{ow} ogħla minn dak tas-sustanza tat-test, u oħra P_{ow} inqas minn dak tas-sustanza tat-test. L-estrapolazzjoni għandha tintuża biss f'każijiet eċċezzjonali. Idealment dawn is-sustanzi ta' referenza jkunu strutturalment relatati mas-sustanza tat-test. Il-valuri tal-log P_{ow} tas-sustanzi ta' referenza użati għall-kalibrazzjoni għandhom ikunu bbażati fuq dejta sperimentali affidabbli. Madankollu, għal sustanzi b'log P_{ow} għoli (ġeneralment iktar minn 4), jistgħu jintużaw il-valuri kkalkolati sakemm ma tkunx disponibbli dejta sperimentali affidabbli. Jekk jintużaw valuri estrapolati, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.

15. Huma disponibbli listi estensivi ta' valuri tal-log P_{ow} għal ħafna gruppi ta' sustanzi kimiċi (14)(15). Jekk dejta dwar il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanzi strutturalment relatati ma tkunx disponibbli, tista' tintuża kalibrazzjoni iktar ġenerali, stabbilita b'sustanzi ta' referenza oħra. Sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-valuri P_{ow} tagħhom huma elenkati fit-Tabella 1. Għal sustanzi jonizzabbli, il-valuri mogħtija japplikaw għall-forma mhux jonizzata. Il-valuri kienu ċċekkjati għall-plawżibbiltà u l-kwalità matul it-test ta' tqabbil bejn il-laboratorji.

Tabella 1

Sustanzi ta' referenza rakkomandati

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Metiletilketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Aċetilpiridina	0,5	
3	62-53-3	Anilinea	0,9	
4	103-84-4	Aċetanilid	1,0	
5	100-51-6	Alkoħol benżiliku	1,1	
6	150-76-5	4-Metossifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Aċidu fenossiaċetiku	1,4	pKa = 3,12

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benżonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenilaċetonitril	1,6	
12	589-18-4	Alkoħol 4-metilbenzil	1,6	
13	98-86-2	Aċetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Aċidu 3-nitrobenżojku	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Kloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenżen	1,9	
18	104-54-1	Alkoħol taċ-ċinnamil (Alkoħol ċinnamiku)	1,9	
19	65-85-0	Aċidu benżojku	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Kreżol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Aċidu ċinnamiku	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Aniżol	2,1	
23	93-58-3	Metilbenżoat	2,1	
24	71-43-2	Benżen	2,1	
25	99-04-7	Aċidu 3-metilbenżojku	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	Atrażina	2,6	
29	93-89-0	Benżoat tal-etil	2,6	
30	1194-65-6	2,6-Diklorobenżonitril	2,6	
31	535-80-8	Aċidu 3-klorobenżojku	2,7	pKa = 3,82

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluwen	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dikloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Klorobenżen	2,8	
36	1746-13-0	Eter tal-fenil tal-allil	2,9	
37	108-86-1	Bromobenżen	3,0	
38	100-41-4	Etilbenżen	3,2	
39	119-61-9	Benżofenon	3,2	
40	92-69-3	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Diklorobenżen	3,4	
43	122-39-4	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenilbenżoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropilbenżen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benżilbenżoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Triklorobenżen	4,2	
52	143-07-7	Aċidu dodekanojku	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Etere tad-difenil	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-Butilbenżen	4,6	

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P_{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenżil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenilpiridina	4,9	
58	206-44-0	Fluworanten	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Stima preliminari tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni

16. Jekk ikun hemm bżonn, il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanza tat-test jista' jiġi stmat idealment permezz ta' metodu ta' kalkolu (ara l-Appendiċi, jew fejn ikun xieraq, permezz tal-proporzjon tas-solubbiltà tas-sustanza tat-test fis-solventi puri.

Apparat

17. Huwa meħtieġ kromatografu b'fażi likwida mgħammar b'pompa b'ritmu baxx u sistema ta' detezzjoni xierqa. Huwa applikabbli rilevatur tal-UV, li juża tul ta' mewġa ta' 210 nm, jew rilevatur tal-RI għal varjetà wiesgħa ta' gruppi ta' sustanzi kimiċi. Il-preżenza ta' gruppi polari fil-fażi stazzjonarja tista' serjament ixxekkel il-prestazzjoni tal-kolonna HPLC. Għalhekk, il-fażijiet stazzjonarji għandu jkollhom perċentwal minimu ta' gruppi polari (16). Jista' jintuża ppakkjar f'fażi inversa tal-mikropartikulati kummerċjali jew kolonni ppakkjati bil-lest. Tista' titqiegħed kolonna ta' lqugħ bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika.

Fażi mobbli

18. Jintużaw metanol tal-grad HPLC u ilma dejonizzat jew distillat biex jitħejja s-solvent ta' elużjoni, li jitneħħielu l-gass qabel jintuża. Għandha tintuża elużjoni isokratika. Għandhom jintużaw proporzjonijiet ta' metanol/ilma b'kontenut minimu ta' ilma ta' 25 %. Ġeneralment taħlita ta' 3:1 (v/v) metanol/ilma hija sodisfaċenti għall-elużjoni ta' sustanzi b'log P ta' 6 fi żmien siegħa, b'rata ta' fluss ta' 1 ml/min. Għal sustanzi b'log P ikbar minn 6, jaf ikun hemm bżonn li jitqassar il-ħin ta' elużjoni (u dawk tas-sustanzi ta' referenza) billi titnaqqas il-polarità tal-fażi mobbli jew it-tul tal-kolonna.

19. Is-sustanza tat-test u s-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu solubbli fil-fażi mobbli f'konċentrazzjoni suffiċjenti li tippermetti d-detezzjoni tagħhom. Jistgħu jintużaw addittivi mat-taħlita ta' metanol/ilma f'każijiet eċċezzjonali biss, peress li dawn jibdlu l-proprjetajiet tal-kolonna. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi kkonfermat li l-ħin ta' żamma tas-sustanzi tat-test u ta' referenza mhumiex influwenzati. Jekk it-taħlita ta' metanol/ilma ma tkunx xierqa, jistgħu jintużaw taħlitiet ta' solvent/ilma organiċi oħrajn, eż. etanol/ilma, aċetonitril/ilma jew isopropil alkoħol (2-propanol)/ilma.

20. Il-pH tal-elwent huwa essenzjali għal sustanzi jonizzabbli. Għandu jkun fi ħdan il-medda pH operattiva tal-kolonna, ġeneralment bejn 2 u 8. Huwa rakkomandat ibbaferjar. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati preċipitazzjoni tal-melħ u tgħarriq tal-kolonna li jseħħu b'xi taħlitiet tal-fażi/bafer organiċi. Il-kejliet tal-HPLC b'fażijiet stazzjonari bbażati fuq is-siliċju b'pH ogħla minn 8 normalment mhumiex rakkomandati peress li l-użu ta' fażi mobbli alkalina tista' tikkawża tgħarriq fil-prestazzjoni tal-kolonna.

Soluti

21. Is-sustanzi tat-test u ta' referenza għandhom ikunu kemm jista' jkun puri biżżejjed sabiex jiġu assenjati l-ogħla livelli fil-kromatogrammi għas-sustanzi rispettivi. Is-sustanzi li għandhom jintużaw għall-finijiet tal-ittestjar jew il-kalibrazzjoni jinħallu fil-fażi mobbli jekk ikun possibbli. Jekk solvent minbarra l-fażi mobbli jintuża biex iħoll is-sustanzi tat-test u ta' referenza, il-fażi mobbli għandha tintuza għad-dilwizzjoni finali qabel l-injezzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test

22. It-temperatura matul il-kejl ma għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C.

Determinazzjoni tal-ħin mejjet t_o

23. Il-ħin mejjet t_0 jista' jitkejjel permezz ta' sustanzi organiċi mhux miżmuma (eż. tjourea jew formamid). Jista' jiġi derivat ħin mejjet iktar preċiż mill-ħinijiet ta' żamma mkejla jew sett ta' madwar seba' membri ta' serje omologa (eż. n-alkil metil ketoni) (17). Il-ħinijiet ta' żamma t_R (n_C + 1) jiġu pplottjati mat-t_R (n_C), fejn n_C huwa n-numru ta' atomi tal-karbonju. Tinkiseb linja dritta, $t_R (n_C + 1) = A\ t_R (n_C) + (1 - A)t_0$, meta A, li tirrappreżenta $k(n_C + 1)/k(n_C)$, tkun kostanti. Il-ħin mejjet t_0 jinkiseb mill-interċett $(1 - A)t_0$ u l-gradjent A.

Ekwazzjoni ta' Rigressjoni

24. Il-pass li jmiss huwa li tiġi pplottjata korrelazzjoni ta' log k ma' log P għal sustanzi ta' referenza xierqa b'valuri log P qrib il-valur mistenni għas-sustanza tat-test. Fil-prattika, jiġu injettati minn 6 sa 10 sustanzi ta' referenza fl-istess ħin. Il-perjodi ta' żamma huma ddeterminati, preferibbilment fuq integratur ta' reġistrazzjoni marbut mas-sistema ta' detezzjoni. Il-logaritmi korrispondenti tal-fatturi ta' kapaċità, log k, huma pplottjati bħala funzjoni ta' log P. L-ekwazzjoni ta' rigressjoni titwettaq f'intervalli regolari, tal-inqas darba kuljum, sabiex jittieħed kont tal-bidliet possibbli fil-prestazzjoni tal-kolonna.

DETERMINAZZJONI TAL-P_{OW} TAS-SUSTANZA TAT-TEST

25. Is-sustanza tat-test tiġi injettata fl-iżgħar kwantitajiet traċċabbli. Il-ħin ta' żamma huwa ddeterminat darbtejn. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tas-sustanza tat-test, jinkiseb bl-interpolazzjoni tal-fattur tal-kapaċità kkalkolat fuq il-graff tal-kalibrazzjoni. Għal koeffiċjenti ta' partizzjoni baxxi ħafna u għolja ħafna, hija meħtieġa estrapolazzjoni. Speċjalment f'dawn il-każijiet, għandha tingħata attenzjoni lil-limiti ta' kunfidenza tal-linja ta' rigressjoni. Jekk il-ħin ta' żamma tal-kampjun ma jaqax taħt il-medda tal-ħinijiet ta' żamma miksuba għall-istandards, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.

DEJTA U RAPPORTAR

Rapport tat-test

26. Dan li ġej għandu jiġi inkluż fir-rapport:

— jekk tkun iddeterminata, l-istima preliminari tal-koeffiċjent tal-partizzjoni, il-valuri stmati u l-metodu użat; u jekk intuża metodu ta' kalkolu, id-deskrizzjoni sħiħa tiegħu inkluż l-identfikazzjoni tal-bażi ta' dejta u informazzjoni ddettaljata dwar l-għażla tal-frammenti;

— is-sustanzi tat-test ta' referenza: il-purità, il-formula strutturali u n-numru CAS,

— deskrizzjoni tat-tagħmir u l-kundizzjonijiet operattivi: il-kolonna analitika, il-kolonna ta' lqugħ,

— il-fażi mobbli, il-mezzi ta' detezzjoni, il-medda tat-temperatura, il-pH;

— il-profili ta' elużjoni (kromatogrammi);

— il-ħin mejjet u kif tkejjel;

— id-dejta u d-dokumentazzjoni dwar iż-żamma tal-valuri tal-log P_{ow} għal sustanzi ta' referenza użati fil-kalibrazzjoni;

— dettalji dwar linja ta' rigressjoni mdaħħla (log k meta mqabbel ma' log P_{ow}) u l-koeffiċjent ta' korrelazzjoni tal-linja inklużi l-intervalli ta' kunfidenza;

— dejta ta' żamma medja u valur tal-log P_{ow} interpolat għas-sustanza tat-test;

— fil-każ ta' taħlita: il-kromatogramma tal-profil ta' elużjoni bil-valuri ta' limitu indikati;

— il-valuri tal-log P_{ow} relattivi għall- % taż-żona tal-ogħla livell ta' P_{ow};

— kalkolu permezz ta' linja ta' rigressjoni;

— valuri tal-log P_{ow} medji ppeżati kkalkolati, fejn ikun xieraq.

LETTERATURA

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). 'Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995', Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

Appendiċi

Metodi ta' kalkolu tal-P_{OW}

INTRODUZZJONI

1. Dan l-appendiċi jipprovdi introduzzjoni qasira għall-kalkolu tal-P_{ow}. Għal iktar informazzjoni, il-qarrej għandu jirreferi għall-kotba (1)(2).

2. Il-valuri kkalkolati tal-P_{ow} jintużaw għal:

— deċiżjoni dwar liema metodu sperimentali għandu jintuża: Metodu tal-Flask Mheżżeż għal log P_{ow} bejn – 2 u 4 u metodu HPLC għal log P_{ow} bejn 0 u 6;

— l-għażla tal-kundizzjonijiet li għandhom jintużaw fl-HPLC (sustanzi ta' referenza, proporzjon ta' metanol/ilma);

— il-verifika tal-plawżibbiltà tal-valuri miksuba permezz ta' metodi sperimentali;

— l-għoti ta' stima meta ma jkunux jistgħu applikati metodi sperimentali.

Prinċipju tal-metodi ta' kalkolu

3. Il-metodi ta' kalkolu ssuġġeriti hawnhekk huma bbażati fuq il-frammentazzjoni teoretika tal-molekula f'sottostrutturi xierqa għal liema huma magħrufin żidiet fil-log P_{ow} affidabbli. Il-log P_{ow} jinkiseb billi l-valuri tal-frammenti jiżdiedu mat-termini ta' korrezzjoni għall-interazzjonijiet intramolekulari. Huma disponibbli listi ta' kostanti frammentati u termini ta' korrezzjoni (1)(2)(3)(4)(5)(6). Xi wħud huma aġġornati regolarment (3).

Affidabbiltà tal-valuri kkalkolati

4. B'mod ġenerali, l-affidabbiltà tal-metodi ta' kalkolu tonqos hekk kif tiżdied il-kumplessità tas-sustanza studjata. Fil-każ ta' molekuli sempliċi b'piż molekulari baxx u b'grupp funzjonali wieħed jew tnejn, wieħed jista' jistenna devjazzjoni ta' 0,1 sa 0,3 unitajiet ta' log P_{ow} bejn ir-riżultati tal-metodi ta' frammentazzjoni differenti u l-valuri mkejla. Il-marġni ta' żball sejjer jiddependi fuq l-affidabbiltà tal-kostanti tal-frammenti użati, il-ħila li jingħarfu l-interazzjonijiet intramolekulari (eż. ir-rabtiet tal-idroġenu) u l-użu xieraq tat-termini ta' korrezzjoni. Fil-każ ta' sustanzi jonizzanti, iċ-ċarġ u l-grad ta' jonizzazzjoni għandhom jittieħdu inkunsiderazzjoni (10).

Metodu Fujita-Hansch π

5. Il-kostant tas-sostitwent idrofobiku, π, introdott oriġinarjament minn Fujita et al. (7) huwa ddefinit bħala:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

fejn PhX huwa derivattiv aromatiku u PhH huwa s-sustanza ewlenija.

$$\text{eż.}\quad {}^{\pi}Cl = \log Pow\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$\geq 0{,}71$$

Il-π-metodu huwa primarjament ta' interess għal sustanzi aromatiċi. Huma disponibbli valuri-π għal numru kbir ta' sostitwenti (4)(5).

Metodu Rekker

6. Permezz tal-metodu Rekker (8) il-valur tal-P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

$$Log\,P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j \text{(interaction terms)}$$

fejn a_i huwa n-numru ta' drabi li jseħħ framment partikolari fil-molekula u f_i huwa ż-żieda fil-P_{ow} tal-framment. It-termini ta' interazzjoni jistgħu jiġu espressi bħala multiplu integrali ta' kostanti wieħed C_m (l-hekk imsejjaħ 'kostanti maġiku'). Il-kostanti tal-framment f_i u C_m ġew iddeterminati minn lista ta' 1 054 valur P_{ow} sperimentali ta' 825 sustanza permezz ta' analiżi tar-rigressjoni tal-multipli (6)(8). Id-determinazzjoni tat-termini ta' interazzjoni ssir skont regoli stabbiliti (6)(8)(9).

Metodu Hansch-Leo

7. Permezz tal-metodu Hansh u Leo (4), il-valur tal-log P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

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

fejn f_i huwa kostant tal-framment, F_j terminu ta' korrezzjoni (fattur), a_i u b_j il-frekwenza korrispondenti tal-okkorrenza. Lista ta' valuri frammentali atomiċi u tal-grupp tat-termini ta' korrezzjoni F_j kienet idderivata b'approssimazzjoni minn valuri P_{ow} sperimentali. It-termini tal-korrezzjoni tqassmu f'diversi klassijiet differenti (1)(4). Il-pakketti tas-softwer ġew żviluppati biex iqisu r-regoli u t-termini ta' korrezzjoni kollha (3).

METODU KKOMBINAT

8. Il-kalkolu tal-log P_{ow} ta' molekuli kumplessi jista' jittejjeb b'mod konsiderevoli, jekk il-molekula tinqasam f'sottostrutturi ikbar għal liema jkunu disponibbli valuri log P_{ow} affidabbli mit-tabelli (3)(4) jew minn miżuri eżistenti. Imbagħad, it-tali frammenti (eż. eteroċikli, antrakinon, ażobenżen) jistgħu jiġu kkombinati mal-valuri Hansch π jew mal-kostanti tal-frammenti ta' Rekker jew Leo.

Rimarki

i) Il-metodi ta' kalkolu huma applikabbli biss ma' sustanzi parzjalment jew kompletament jonizzati meta jitqiesu l-fatturi ta' korrezzjoni meħtieġa.

ii) Jekk wieħed jista' jassumi l-eżistenza ta' rabtiet tal-idroġenu intramolekulari, għandhom jiżdiedu t-termini ta' korrezzjoni korrispondenti (madwar + 0,6 sa + 1,0 unitajiet ta' log P_{ow}) (1). Indikazzjonijiet dwar il-preżenza ta' tali rabtiet tista' tinkiseb minn mudelli tridimensjonali jew dejta spektroskopika.

iii) Jekk ikunu possibbli diversi forom tawtomeriċi, l-iktar forma probabbli għandha tintuża bħala l-bażi tal-kalkolu.

iv) Ir-reviżjonijiet tal-listi ta' kostanti frammentati għandhom jiġu segwiti b'attenzjoni.

LETTERATURA DWAR IL-METODI TA' KALKOLU

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984)."

(3) Il-Kapitolu C.3 huwa sostitwit ma' dan li ġej:

"C.3. **ALGA TAL-ILMA ĦELU U ĊJANOBATTERJI, TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 201 tal-OECD (2006, anness korrett fl-2011). Ġiet identifikata l-ħtieġa li jiġi estiż il-metodu ta' ttestjar biex jinkludi speċijiet addizzjonali u jiġi aġġornat biex jissodisfa r-rekwiżiti għal valutazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi. Din ir-reviżjoni tlestiet abbażi ta' esperjenza prattika estensiva, progress xjentifiku fil-qasam tal-istudji tat-tossiċità algali, u użu regolatorju estensiv, li seħħ mill-adozzjoni oriġinali.

2. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Il-fini ta' dan it-test huwa li jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq it-tkabbir tal-mikroalgi tal-ilma ħelu u/jew iċ-ċjanobatterji. Organiżmi tal-ittestjiar li qegħdin jikbru esponenzjalment huma esposti għas-sustanza kimika tat-test f'kulturi tal-lott fuq perjodu li normalment ikun ta' 72 siegħa. Minkejja d-durata relattivament qasira tat-test, l-effetti fuq diversi ġenerazzjonijiet jistgħu jiġu vvalutati.

4. Ir-rispons tas-sistema huwa t-tnaqqis fit-tkabbir f'serje ta' kulturi algali (unitajiet tal-ittestjar) esposti għal diversi konċentrazzjonijiet ta' sustanza kimika tat-test. Ir-rispons huwa evalwat bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni meta mqabbel mat-tkabbir medju tar-replikat, kulturi tal-kontroll mhux esposti. Għal espressjoni sħiħa tar-rispons tas-sistema għall-effetti tossiċi (sensittività ottimali), il-kulturi huma permessi tkabbir esponenzjali illimitat f'kundizzjonijiet ta' nutrijenti suffiċjenti u dawl kontinwu għal perjodu twil biżżejjed ta' żmien biex jitkejjel it-tnaqqis tar-rata ta' tkabbir speċifiku.

5. It-tkabbir u l-inibizzjoni tat-tkabbir huma kkwantifikati minn kejliet tal-bijomassa algali bħala funzjoni taż-żmien. Il-bijomassa algali hija ddefinita bħala l-piż xott skont il-volum, eż. algi/litri mg ta' soluzzjoni tat-test. Madankollu, il-piż xott huwa diffiċli biex jitkejjel u għalhekk jintużaw parametri sostituti. Minn dawn is-surrogati, ħafna drabi jintuża l-għadd taċ-ċelloli. Parametri ta' surrogati oħra jinkludu l-volum taċ-ċelloli, il-fluworexxenza, id-densità ottika, eċċ. Għandu jkun magħruf fattur ta' konverżjoni bejn il-parametru sostitut imkejjel u l-bijomassa.

6. Dan il-punt ta' tmiem l-ittestjar huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa (rata ta' tkabbir speċifika medja) 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}).

7. Rispons varjabbli addizzjonali użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun meħtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-bijomassa fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. 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}).

8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

9. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li jaf tkun siewja biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test inklużi l-formula strutturali, il-purità, l-istabbiltà fid-dawl, l-istabbiltà fil-kundizzjonijiet tat-test, il-proprjetajiet ta' assorbiment tad-dawl, il-pK_a, u r-riżultati tal-istudji tat-trasformazzjoni li jinkludu l-bijodegradabilità fl-ilma.

10. Is-solubbiltà fl-ilma, il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (P_{ow}) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun magħrufa u għandu jkun disponibbli metodu vvalidat għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test b'effiċjenza tal-irkupru rrapportata u limitu ta' detezzjoni.

VALIDITÀ TAT-TEST

11. Biex it-test ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin:

— Il-bijomassa fil-kulturi tal-kontroll għandhom ikunu żdiedu b'mod esponenzjali b'fattur ta' mill-anqas 16 fi żmien il-perjodu ta' ttestjar ta' 72 siegħa. Din tikkorrispondi għal rata ta' tkabbir speċifika ta' 0,92 ġurnata^{-1}. Għall-ispeċijiet użati l-iktar frekwentement, ir-rata ta' tkabbir ġeneralment tkun sostanzjalment ogħla (ara l-Appendiċi 2). Dan il-kriterju jaf ma jiġix sodisfatt meta jintużaw speċijiet li jikbru iktar bil-mod minn dawk elenkati fl-Appendiċi 2. F'dan il-każ, il-perjodu tal-ittestjar għandu jiġi estiż biex jinkiseb tal-inqas tkabbir 16-il darba ikbar fil-kulturi tal-kontroll, filwaqt li t-tkabbir għandu jkun esponenzjali matul il-perjodu tal-ittestjar. Il-perjodu tal-ittestjar jista' jitqassar għal tal-inqas 48 siegħa biex jinżamm tkabbir illimitat u esponenzjali matul it-test sakemm jintlaħaq il-fattur ta' multiplikazzjoni minimu ta' 16.

— Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għal rati ta' tkabbir speċifiċi skont is-sezzjoni (jiem 0-1, 1-2 u 2-3, għal testijiet ta' 72 siegħa) fil-kulturi ta' kontroll (Ara l-Appendiċi 1 taħt 'koeffiċjent ta' varjazzjoni') ma għandux jaqbeż il-35 %. Ara l-paragrafu 49 għall-kalkolu tar-rata ta' tkabbir speċifika skont is-sezzjoni. Dan il-kriterju japplika għall-valur medju tal-koeffiċjenti ta' varjazzjoni kkalkolati għall-kulturi tal-kontroll irreplikati.

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rati ta' tkabbir speċifiċi medji matul il-perjodu tal-ittestjar kollu fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki ma għandux jaqbeż 7 % fit-testijiet b'Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus. Għal speċijiet oħrajn ittestjati inqas spiss, il-valur ma għandux jaqbeż l-10 %.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

12. Is-sustanza (jew sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ringtest internazzjonali (1), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' vverifikar tal-proċedura tal-ittestjar. Id-dikromat tal-potassju jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza għal alga ħadra wkoll. Idealment tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza mill-anqas darbtejn fis-sena.

APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

13. Dan il-metodu ta' ttestjar iktar faċli jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma li, fil-kundizzjonijiet tat-test, aktarx li jibqgħu fl-ilma. Għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi li huma volatili, adsorbenti ħafna, ikkuluriti, b'solubbiltà baxxa fl-ilma jew sustanzi kimiċi li jistgħu jaffettwaw id-disponibbiltà ta' nutrijenti jew minerali fil-midjum tat-test, jistgħu jkunu meħtieġa ċerti modifiki tal-proċedura deskritta (eż. sistema magħluqa, kundizzjonar tar-reċipjent tat-test). Hija pprovduta gwida dwar xi modifiki xierqa f'(2) (3) u (4).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

14. Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrin jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti għandhom jinħaslu sew biex jiġi żgurat li ebda kontaminant organiku jew inorganiku ma jinterferixxi mat-tkabbir tal-alga jew il-kompożizzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test.

15. Ir-reċipjenti tat-test normalment ikunu fliexken tal-ħġieġ b'qisien li jippermettu volum suffiċjenti ta' kultura għall-kejliet matul it-test u trasferiment suffiċjenti ta' massa ta' CO_2 mill-atmosfera (ara l-paragrafu 30). Ta' min jinnota li l-volum tal-likwidu għandu jkun biżżejjed għal determinazzjonijiet analitiċi (ara l-paragrafu 37).

16. Barra minn hekk, jaf ikun meħtieġ it-tagħmir li ġej jew kollu kemm hu:

— Apparat tal-kultura: huwa rakkomandat armadju jew kompartiment, fejn tista' tinżamm it-temperatura ta' inkubazzjoni magħżula fi ± 2 °C.

— Strumenti ta' kejl ħfief: ta' min jgħid li l-metodu ta' kejl tal-intensità tad-dawl, u b'mod partikolari t-tip ta' riċettur (kollettur), jista' jaffettwa l-valur imkejjel. Idealment, il-kejliet għandhom isiru permezz ta' riċettur (4 π) sferiku (li jirrispondi għal dawl dirett u rifless mill-angoli kollha 'l fuq u taħt il-pjan tal-kejl), jew riċettur π 2 (li jirrispondi għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan tal-kejl).

— Apparat biex tiġi ddeterminata l-bijomassa algali. L-għadd taċ-ċelloli, li huwa l-iktar parametru sostitut użat spiss għall-bijomassa algali, jista' jsir permezz ta' kontantur elettroniku tal-partiċelli, mikroskopju b'kompartiment tal-għadd, jew ċitometru tal-fluss. Surrogati tal-bijomassa oħrajn jistgħu jitkejlu permezz ta' ċitometru tal-fluss, fluworimetru, spettrofotometru jew kulurimetru. Fattur ta' konverżjoni li jirrelata l-għadd ta' ċelloli mal-piż xott huwa siewi għall-kalkolu. Sabiex jiġu pprovduti miżuri siewja f'konċentrazzjonijiet baxxi tal-bijomassa meta jintuża spettrofotometru, jaf ikun meħtieġ li jintużaw kuvetti b'passaġġ tad-dawl ta' mill-anqas 4 cm.

Organiżmi tat-test

17. Jistgħu jintużaw diversi speċijiet ta' mikroalgi li ma jaggregawx u ċjanobatterji. Intwera li r-razez elenkati fl-Appendiċi 2 huma xierqa bil-proċedura tal-ittestjar speċifikata f'dan il-metodu ta' ttestjar.

18. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn, għandha tiġi rrapportata r-razza u/jew l-oriġini. Ikkonferma li t-tkabbir esponenzjali tal-alga tat-test magħżula tista' tinżamm matul il-perjodu ta' ttestjar fil-kundizzjonijiet eżistenti.

Midjum ta' tkabbir

19. Huma rakkomandati żewġ midjums ta' tkabbir alternattivi, il-midjum tal-AAP u l-OECD u. Il-kompożizzjonijiet ta' dawn il-midjums huma indikati fl-Appendiċi 3. Kun af li l-valur tal-pH inizjali u l-kapaċità ta' bbaferjar (li tirregola ż-żieda fil-pH) taż-żewġ midjums huma differenti. Għalhekk, ir-riżultati tat-testijiet jaf ikunu differenti skont il-midjum użat, b'mod partikolari meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi jonizzanti.

20. Jaf tkun meħtieġa modifika tal-midjums ta' tkabbir għal ċerti finijiet, eż. meta jiġu ttestjati metalli u aġenti kelanti jew meta jsir ittestjar f'valuri tal-pH differenti. L-użu ta' midjum immodifikat għandu jiġi deskritt fid-dettall u ġġustifikat (3) (4).

Konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali

21. Il-bijomassa inizjali fil-kulturi tat-test għandha tkun l-istess fil-kulturi tat-test kollha u baxxa biżżejjed biex tippermetti tkabbir esponenzjali matul il-perjodu ta' inkubazzjoni kollu mingħajr ir-riskju ta' tnaqqis fin-nutrijenti. Il-bijomassa inizjali ma għandhiex taqbeż iż-0,5 mg/l bħala piż xott. Huma rakkomandati l-konċentrazzjonijiet ta' ċelloli inizjali li ġejjin:

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

Konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

22. Il-medda tal-konċentrazzjoni li fiha l-effetti x'aktarx li jseħħu hija determinata fuq il-bażi tar-riżultati mit-testijiet tas-sejbien tal-medda. Għat-test finali definittiv, għandhom jintgħażlu tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet, irranġati f'serje ġeometrika b'fattur li ma jaqbiżx it-3.2. Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru kurva konċentrazzjoni rispons stabbli, jista' jkun iġġustifikat fattur ogħla. Idealment, is-serje ta' konċentrazzjoni għandha tkopri l-medda li tikkawża inibizzjoni ta' 5-75 % tar-rata ta' tkabbir tal-alga.

Repliki u kontrolli

23. Id-disinn tat-test għandu jinkludu tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk ma jkunx meħtieġ li tiġi ddeterminata l-NOEC, id-disinn tat-test jista' jinbidel biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. In-numru ta' repliki tal-kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta, u idealment għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

24. Jista' jitħejja sett separat ta' soluzzjonijiet tat-test għal determinazzjonijiet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 36 u 38).

25. Meta jintuża solvent biex tinħall is-sustanza kimika tat-test, kontrolli addizzjonali li fihom is-solvent fl-istess konċentrazzjoni kif użat fil-kulturi tat-test għandhom jiġu inklużi fid-disinn tat-test.

Tħejjija tal-kultura tal-inokulu

26. Sabiex l-alga tal-ittestjar tiġi adattata għall-kundizzjonijiet tat-test u jiġi żgurat li l-algi huma f'fażi ta' tkabbir esponenzjali meta jintużaw biex jinokulaw is-soluzzjonijiet tat-test, titħejja kultura tal-inokulu fil-midjum tat-test bejn jumejn u 4 ijiem qabel jibda t-test. Il-bijomassa algali għandha tiġi aġġustata sabiex tippermetti li jkun hemm tkabbir esponenzjali fil-kultura tal-inokulu sakemm jibda t-test. Inkuba l-kultura tal-inokulu fl-istess kundizzjonijiet bħall-kulturi tat-test. Kejjel iż-żieda fil-bijomassa fil-kultura tal-inokulu biex tiżgura li t-tkabbir huwa fi ħdan il-medda normali għar-razza tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' kulturi. Eżempju tal-proċedura għall-kulturi algali huwa deskritt fl-Appendiċi 4. Biex jiġu evitati diviżjonijiet ta' ċelloli sinkroniċi matul it-test jaf ikun meħtieġ pass ieħor ta' propagazzjoni tal-kultura tal-inokulu.

Tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

27. Is-soluzzjonijiet tat-test kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjonijiet tal-midjum ta' tkabbir u l-bijomassa inizjali tal-alga tat-test. Is-soltu, is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jitħejjew billi titħallat soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test b'midjum ta' tkabbir u kultura tal-inokulu. Is-soluzzjonijiet ewlenin normalment jitħejjew billi s-sustanza kimika tithalla tinħall fil-midjum tat-test.

28. Jistgħu jintużaw solventi, bħal aċeton, alkoħol t-butil u dimetil formamid bħala portaturi sabiex jiżdiedu sustanzi kimiċi b'solubbiltà baxxa mal-midjum tat-test (2)(3). Il-konċentrazzjoni ta' solvent ma għandhiex taqbeż il-100 μl/l, u l-istess konċentrazzjoni ta' solvent għandha tiżdied mal-kulturi kollha (inkluż il-kontrolli) fis-serje tat-test.

Inkubazzjoni

29. Agħtti r-reċipjenti tat-test b'tappijiet li tgħaddi l-arja minnhom. Ir-reċipjenti jitħeżżu u jitqiegħdu fl-apparat tal-kulturi. Matul it-test huwa meħtieġ li l-algi jinżammu f'sospensjoni u sabiex tiffaċilita trasferiment ta' CO_2. Għal dan il-għan, għandek tħeżżeż jew tħawwad b'mod konsistenti. Il-kulturi għandhom jinżammu f'temperatura fil-medda ta' 21 sa 24 °C, ikkontrollati f'± 2 °C. Għal speċijiet għajr dawk elenkati fl-Appendiċi 2, eż. speċijiet tropikali, jaf ikunu xierqa temperaturi ogħla, sakemm jistgħu jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità. Huwa rakkomandat li l-flasks jitqiegħdu b'mod każwali u li jerġgħu jiġu pożizzjonati mill-ġdid kuljum fl-inkubatur.

30. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1,5 unitajiet matul it-test. Għal metalli u sustanzi kimiċi li parzjalment jonizzaw b'pH madwar il-pH tat-test, jista' jkun meħtieġ li jiġi limitat it-tifrix tal-pH biex jinkisbu riżultati riproduċibbli u ddefiniti 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.

31. Il-wiċċ fejn il-kulturi huma inkubati għandu jingħata illuminazzjoni fluworexxenti, uniformi, kontinwa, eż. tat-tip 'cool-white' jew 'daylight'. Razez ta' algi u ċjanobatterji jvarjaw fir-rekwiżiti tad-dawl tagħhom. L-intensità tad-dawl għandha tintgħażel biex taddatta għall-organiżmu tat-test użat. Għal speċijiet rakkomandati ta' algi ħodor, agħżel l-intensità tad-dawl fil-livell tas-soluzzjonijiet tat-test mill-medda ta' 60-120 µE · m^{-2} s^{-1} meta titkejjel fil-medda ta' tul ta' mewġa fotosintetikament effikaċi ta' 400 – 700 nm permezz ta' riċettur xieraq. Xi speċijiet, b'mod partikolari *Anabaena flos-aquae*, jikbru sew f'intensitajiet tad-dawl iktar baxxi u jaf issirilhom ħsara f'intensitajiet għolja. Għal dawn l-ispeċi għandha tintgħażel intensità ta' dawl medja fl-isfera ta' 40-60 µE · m^{-2} · s^{-1}. (Għal strumenti ta' kejl tad-dawl ikkalibrati fil-lux, medda ekwivalenti ta' 4 440 – 8 880 lux għal dawl cool white tikkorrispondi bejn wieħed u ieħor għall-intensità tad-dawl rakkomandata 60-120 µE · m^{-2} · s^{-1}). Żomm l-intensità tad-dawl fi ħdan ± 15 % mill-intensità tad-dawl medja fuq iż-żona tal-inkubazzjoni.

Durata tat-test

32. Normalment it-test jieħu 72 siegħa. Madankollu, jistgħu jintużaw durati tat-test iqsar jew itwal diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validita kollha fil-paragrafu 11.

Kejl u determinazzjonijiet analitiċi

33. Il-bijomassa algali f'kull flask hija ddeterminata tal-inqas kuljum matul il-perjodu tal-ittestjar. Jekk isiru miżuri fuq volumi żgħar imneħħija mis-soluzzjoni tat-test bil-pipetta, dawn ma għandhomx jiġu ssostitwiti.

34. Il-kejl tal-bijomassa jsir bl-għadd manwali taċ-ċelloli minn mikroskopju jew apparat elettroniku li jgħodd il-partiċelli (minn għadd taċ-ċelloli/jew bijovolum). Jistgħu jintużaw tekniki alternattivi, eż. ċitometrija tal-fluss, fluworexxenza klorofilljana *in vitro* jew *in vivo* (5) (6), jew densità ottika jekk tista' tintwera korrelazzjoni sodisfaċenti tul il-medda ta' bijomassa li sseħħ fit-test.

35. Kejjel il-pH tas-soluzzjonijiet fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

36. Sakemm tkun disponibbli proċedura analitika għad-determinazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-medda tal-konċentrazzjoni użata, is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu analizzati biex jiġu vverifikati l-konċentrazzjonijiet u ż-żamma inizjali tal-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni matul it-test.

37. 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. Hija rakkomandata analiżi tal-konċentrazzjonijiet tat-test kollha fil-bidu u fi tmiem tat-test, meta ma jkunx probabbli li l-konċentrazzjonijiet jibqgħu fi ħdan it-80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali. Għal sustanzi kimiċi tat-test volatili, mhux stabbli, adsorbenti ħafna huma rakkomandati kampjuni addizzjonali għall-analiżi f'intervalli ta' 24 siegħa matul il-perjodu ta' espożizzjoni sabiex jiġi ddefinit aħjar it-telf tas-sustanza kimika tat-test. Għal dawn is-sustanzi kimiċi, jaf ikunu meħtieġa repliki żejda. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test tista' titwettaq biss fuq reċipjent tar-repliki wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura mir-replikat).

38. Il-midjums tal-ittestjar imħejjija speċifikament għall-analiżi tal-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni matul it-test għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod bħal dawk użati għall-ittestjar, jiġifieri għandhom jiġu inokulati b'algi u inkubatur fl-istess kundizzjonijiet. Jekk tkun meħtieġa analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula, jaf tkun meħtieġa separazzjoni tal-alga mill-midjum. Idealment, is-seperazzjoni għandha issir b'ċentrifugazzjoni b'forza-g baxxa, suffiċjenti biex tissettja l-alga.

39. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla ma tkunx fi ħdan il-medda ta' ± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew fuq il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (3) (7).

40. It-test ta' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga huwa sistema ta' ttestjar iktar dinamiku mill-biċċa l-kbira tat-testijiet tat-tossiċità akkwatika għal terminu qasir l-oħrajn. Bħala konsegwenza, jaf ikun diffiċli tiddefinixxi

l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni attwali, speċjalment għall-adsorbiment ta' sustanzi kimiċi ttestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. F'tali każijiet, l-għajbien tas-sustanza kimika tat-test mis-soluzzjoni b'adsorbiment mal-bijomassa algali li dejjem tiżdied ma jfissirx li din tintilef mis-sistema tat-test. Meta jiġi analizzat ir-riżultat tat-test, għandu jiġi ċċekkjat jekk tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test matul it-test huwiex akkumpanjat minn tnaqqis fl-inibizzjoni tat-tkabbir. Jekk dan ikun il-każ, tista' tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' mudell xieraq li jiddeskrivi t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (7). Jekk le, jaf ikun xieraq li tibbaża l-analiżi tar-riżultati fuq il-konċentrazzjonijiet (nominali jew imkejla) inizjali.

Osservazzjonijiet oħra

41. Għandha titwettaq osservazzjoni mikroskopika biex tiġi vverifikata dehra normali u sana ta' kultura tal-inokulu u biex tiġi osservata kwalunkwe dehra anormali tal-alga (peress li jaf tkun ikkawżata mill-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test) fi tmiem it-test.

Test tal-limitu

42. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew konċentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat ħafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw kull kundizzjoni tat-test u kriterju ta' validità deskritti preċedentement għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom ikunu tal-inqas sitta. Il-varjabbli tar-rispons fil-grupp ta' kontroll u trattament jistgħu jiġu analizzati permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-medji, eż. Test-t ta' Student. Jekk il-varjanzi taż-żewġ gruppi ma jkunux l-istess, għandu jsir test-t aġġustat għal varjanzi mhux indaqs.

DEJTA U RAPPORTAR

Ipplottjar tal-kurvi tat-tkabbir

43. Il-bijomassa fir-reċipjenti tat-test, tista' tiġi espressa f'unitajiet tal-parametru sostitut użat għall-kejl (eż. in-numru ta' ċelloli, fluworexxenza).

44. Indika l-konċentrazzjoni ta' bijomassa stmata fil-kulturi tat-test u l-kontrolli flimkien mal-konċentrazzjonijiet tal-materjal tat-test u l-ħinijiet tal-kejl, irreġistrata b'riżoluzzjoni ta' mill-anqas sigħat sħaħ, biex jiġu prodotti plottijiet ta' kurvi ta' tkabbir. Kemm l-iskali logaritmiċi kif ukoll l-iskali lineari jistgħu jkunu utli f'dan l-istadju, iżda l-iskali logaritmiċi huma obbligatorji u ġeneralment jagħtu preżentazzjoni aħjar tal-varjazzjonijiet fil-mudell ta' tkabbir matul il-perjodu tal-ittestjar. Ta' min jinnota li tkabbir esponenzjali jipproduċi linja dritta meta jiġi pplottjat fuq skala logaritmika, u inklinazzjoni tal-linja (gradjent) tindika r-rata ta' tkabbir speċifika.

45. Permezz tal-plottijiet, eżamina jekk il-kulturi ta' kontroll jikbrux b'mod esponenzjali bir-rata mistennija matul it-test kollu. Eżamina l-punti ta' dejta kollha u d-dehra tal-graffs b'mod kritiku u ċċekkja d-dejta mhux ipproċessata u l-proċeduri għall-iżbalji possibbli. Iċċekkja b'mod partikolari kwalunkwe punt ta' dejta li jidher li jiddevja bi żball sistematiku. Jekk ikun ovvju li l-iżbalji proċedurali jistgħu jiġu identifikati u/jew jitqiesu probabbli ħafna, il-punt ta' dejta speċifiku huwa mmarkat minn outlier u mhuwiex inkluż f'analiżi statistika sussegwenti. (Konċentrazzjoni algali żero f'wieħed miż-żewġ jew tliet reċipjenti tar-repliki tista' tindika li r-reċipjent ma kienx inokulat b'mod korrett, jew tnaddaf b'mod mhux xieraq). Iddikjara r-raġunijiet għar-rifjut ta' punt ta' dejta bħala outlier fir-rapport tat-test. Ir-raġunijiet aċċettati huma biss żbalji proċedurali (rari) u mhux sempliċi preċiżjoni ħażina. Il-proċeduri tal-istatistika għall-identifikazzjoni tal-outlier huma ta' użu limitat għal din it-tip ta' problema u ma jistgħux jieħdu post il-ġudizzju tal-esperti. Idealment l-outliers (immarkati bħala tali) għandhom jinżammu fost il-punti ta' dejta murija fi kwalunkwe preżentazzjoni ta' dejta grafika jew tabulari sussegwenti.

Varjabbli ta' rispons

46. L-iskop tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir tal-alga. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, peress li ġurisidizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u ħtiġijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisdizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) Rata ta' tkabbir speċifika medja: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat abbażi taż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu tal-ittestjar, espressa għal kull jum

(b) Rendiment: dan il-varjabbli tar-rispons huwa l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu.

47. Ta' min jinnota li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. 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 jiġi interpretat bħala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda sempliċement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kunċett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tal-alga f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-gradjent tal-kurva konċentrazzjoni rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendimentjiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra kollha. 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 ir-rispons varjabblima għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' algi jew anki razez differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika medja għall-istima tat-tossiċità huwa ppreferut xjentifikament, l-istimi tat-tossiċità ibbażati fuq ir-rendimenthuma inklużi wkoll f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti regolatorji attwali f'xi pajjiżi.

Rata ta' tkabbir medja

48. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa mill-ekwazzjoni għal kull reċipjenti uniku tal-kontrolli u t-trattamenti [1]:

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

fejn:

μ_{i-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 kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

49. Ikkalkola r-rata ta' tkabbir speċifika medja matul id-durata kollha tat-test (normalment 0-3 ijiem), permezz tal-bijomassa inokulata nominalment bħala l-valur tal-bidu iktar minn valur tal-bidu mkejjel, peress li b'dan il-mod, normalment tinkiseb iktar preċiżjoni. Jekk it-tagħmir użat għall-kejl tal-bijomassa jippermetti determinazzjoni preċiża biżżejjed tal-bijomassa tal-inokulu (eż. citometru tal-fluss) allura tista' tintuża l-konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali mkejla. Ivvaluta wkoll ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni, ikkalkolata bħala r-rati ta' tkabbir speċifiċi għal kull jum matul il-kors tat-test (0-1, 1-2 u 2-3 jiem) u eżamina jekk ir-rata ta' tkabbir tal-kontroll tibqax kostanti (ara l-kriterji tal-validità, paragrafu 11). Rata ta' tkabbir speċifika sinifikament inqas fl-ewwel jum mir-rata ta' tkabbir speċifika medja totali tista' tindika fażi latenti. Filwaqt li fażi latenti tista' titnaqqas u prattikament tiġi eliminata f'kulturi tal-kontroll bi propagazzjoni xierqa tal-prekultura, fażi latenti f'kulturi esposti tista' tindika rkupru wara stress tossiku inizjali jew tnaqqis fl-espożizzjoni minħabba telf ta' sustanza kimika tat-test (inkluż sorbiment fil-bijomassa algali) wara l-espożizzjoni inizjali. Għalhekk ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni tista' tiġi vvalutata sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu fil-perjodu ta' espożizzjoni. Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir.

50. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali tar-rata ta' tkabbir għal kull replikat ta' trattament mill-ekwazzjoni [2]:

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

fejn:

$\%I_r$ = inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;

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;

51. Meta biex jitħejjew is-soluzzjonijiet tat-test jintużaw solventi, għandhom jintużaw il-kontrolli bis-solventi u mhux ili l-kontrolli bla solventi fil-kalkolu ta' inibizzjoni perċentwali.

Rendiment

52. Ir-rendiment huwa kkalkolat bħala l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għal kull reċipjent uniku ta' kontrolli u trattamenti. Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. Il-persentaġġ ta' inibizzjoni fil-prodott ($\%I_y$) jista' jiġi kkalkulat għal kull replika ta' trattament kif ġej:

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

fejn:

$\% I_y$ = inibizzjoni perċentwali tar-rendiment;

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

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

Ipplottjar tal-kurva konċentrazzjoni rispons

53. Ipplottja l-perċentwali tal-inibizzjoni mal-logaritma tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u eżamina l-plott bir-reqqa, filwaqt li tinjora kwalunkwe tali punt ta' dejta li ġie individwat bħala outlier fl-ewwel fażi. Għaddi linja ċara mill-punti ta' dejta b'għajnejk jew b'interpolazzjoni bil-kompjuter biex tieħu idea tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons, u mbagħad kompli b'metodu iktar iddettaljat, idealment metodu statistiku kompjuterizzat. 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 validi biex ma jintużax metodu statistiku jistgħu jinkludu:

— Id-dejta mhijiex xierqa għal metodi kompjuterizzati biex jipproduċu xi riżultat affidabbli ieħor apparti dawk li jistgħu jinkisbu b'ġudizzju espert — f'tali sitwazzjonijiet xi programmi tal-kompjuter jistgħu anki jonqsu milli jipproduċu soluzzjoni affidabbli (ir-rikorrenzi jaf ma jaqblux, eċċ.)

— Ir-risponsi għal tkabbir stimulatorju ma jistgħux jiġu indirizzati b'mod adegwat permezz tal-programmi tal-kompjuter disponibbli (ara hawn taħt).

Proċeduri statistiċi

54. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppeżata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — pereżempju f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (8), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli ta' dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet bla intoppi. Meta jkunu viċin inibizzjoni żero jew totali, tali irregolaritajiet jistgħu jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (8). Ta' min jinnota li metodi standard ta' analiżi bl-użu ta' trasformati ta' probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u jridu jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar it-tkabbir jew il-bijomassa. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinstabu f'(9), (10), u (11). L-użu ta' analiżi tar-rigressjoni mhux lineari huwa ddettaljat iktar fl-Appendiċi 5.

55. 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 ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqgħod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament. Jekk, madankollu, ma jkunx faċli li tintuża kurva mhux lineari huwa diffiċli jew ma jirnexxiex minħabba dispersjoni kbira wisq fid-dejta, il-problema tista' tiġi evitata billi ssir ir-rigressjoni fuq il-medji tal-grupp bħala mod prattiku ta' tnaqqis fl-influwenza ta' outliers suspettati. L-użu ta' din l-għażla għandu jiġi identifikat fir-rapport tat-test bħala devjazzjoni mill-proċedura normali peress li l-interpolazzjoni ta' kurva b'repliki individwali ma pproduċietx riżultat tajjeb.

56. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (13), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-data.

57. Għal stima tal-LOEC u, għalhekk, l-NOEC, għal effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-rata ta' tkabbir, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji tat-trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Imbagħad il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha titqabbel mal-medja tal-kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test tat-tendenza. It-test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun siewi (12)(14)(15)(16)(17). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treġġix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (17). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. Fi (11) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

58. 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 it-test algali. Sfera ta' 10 sa 20 % tidher li hija xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment kemm l-EC_{10} u EC_{20} għandhom jiġu rrappurtati.

Stimulazzjoni tat-tkabbir

59. Xi drabi hija osservata stimulazzjoni tat-tkabbir (inibizzjoni negattiva) f'konċentrazzjonijiet baxxi. Dan jista' jirriżulta minn ormeżi ('stimulazzjoni tossika') jew miż-żieda ta' fatturi ta' tkabbir ta' stimulazzjoni bil-materjal tat-test sal-midjum minimu użat. Ta' min jinnota li ż-żieda ta' nutrijenti inorganiċi ma għandu jkollha ebda effett dirett peress li l-midjum tat-test għandu jżomm eċċess 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. Jekk ikun possibbli għandu jiġi evitat tħassir ta' risponsi stimulatorji mill-analiżi tad-dejta, u jekk is-softwer li jadatta l-kurva ma jistax jaċċetta stimulazzjoni minuri, tista' tintuża interpolazzjoni lineari b'bootstrapping. Jekk l-istimulazzjoni tkun estrema, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-mudell tal-ormesi (18).

Inibizzjoni tat-tkabbir mhux tossiku

60. Materjali tal-ittestjar li jassorbu d-dawl jistgħu jagħtu lok għal tnaqqis fir-rata ta' tkabbir peress li d-dellijiet inaqqsu l-ammont ta' dawl disponibbli. Tali tipi fiżiċi ta' effetti għandhom jiġu sseparati minn effetti tossiċi billi jiġu mmodifikati l-kundizzjonijiet tat-test u dawn tal-aħħar għandhom jiġu rrapportati b'mod separat. Fi (2) u (3) tista' tinstab gwida.

RAPPORT TAL-ITTESTJAR

61. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

— natura fiżika u proprjetajiet fiżiċi u kimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluża l-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

— ir-razza, il-fornitur jew is-sors u l-kundizzjonijiet tal-kulturi użati.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;

— deskrizzjoni tad-disinn tal-ittestjar, reċipjenti tat-test, volumi tal-kultura, densità tal-bijomassa fil-bidu tat-test;

— il-komposizzjoni tal-midjum;

— il-konċentrazzjoni tat-test u r-repliki (eż. numru ta' repliki, numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test u l-progress ġeometriku użat);

— deskrizzjoni tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, inkluż l-użu ta' solventi eċċ.

— apparat tal-kulturi;

— l-intensità u l-kwalità tad-dawl (sors, omoġenità);

— it-temperatura;

— konċentrazzjonijiet ittestjati: il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u kwalunkwe riżultat tal-analiżijiet biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandha tiġi rrapportata l-effiċjenza fl-irkupru tal-metodu u l-limitu tal-kwantifikazzjoni fil-matriċi tal-ittestjar;

— id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar;

— il-metodu għad-determinazzjoni tal-bijomassa u l-evidenza tal-korrelazzjoni bejn il-parametru mkejjel u l-piż xott;

Riżultati:

— valuri tal-pH fil-bidu u fi tmiem it-test fit-trattamenti kollha;

— il-bijomassa għal kull flask f'kull punt ta' kejl u l-metodu għall-kejl tal-bijomassa;

— kurvi ta' tkabbir (plott tal-bijomassa mal-ħin);

— il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;

— preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-l-konċentrazzjoni u l-effett;

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

— jekk tintuża ANOVA, 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-alga;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.

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

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

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

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.

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

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

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

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

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

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

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

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet li ġejjin jintużaw għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar:

Il-**bijomassa** hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni espressa f'termini ta' volum partikolari; eż. mg soluzzjoni ta' algi/litri. Ġeneralment il-'bijomassa' hija ddefinita bħala l-massa, iżda f'dan it-test, din il-kelma tintuża biex tirreferi għall-massa skont il-volum. Barra minn hekk f'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-għadd taċ-ċelloli, il-fluworexxenza, eċċ. ġeneralment jitkejlu u l-użu tat-terminu 'bijomassa' għalhekk jirreferi wkoll għal dawn il-miżuri surrogati.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita

Koeffiċjent ta' varjazzjoni hija miżura mingħajr dimensjoni tal-varjabbiltà ta' parametru, iddefinit bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni standard mill-medja. Dan jista' jiġi wkoll espress bħala valur perċentwali. Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika medja fil-kulturi ta' kontroll tar-replikat għandu jiġi kkontrollat kif ġej:

1. Ikkalkola % CV tar-rata ta' tkabbir speċifika medja mir-rati ta' tkabbir kuljum/skont is-sezzjoni għar-replikat rispettiv;

2. Ikkalkola l-valur medju mill-valuri kollha kkalkolati skont il-punt 1 biex tikseb il-koeffiċjenti medju tal-varjazzjoni tar-rata tkabbir ta' kuljum/skont is-sezzjoni fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki.

EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-midjum tat-test li tirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal-organiżmu tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissemma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew prodott, is-simbolu 'E_rC' huwa użat għar-rata ta' tkabbir u 'E_yC' huwa użat għall-prodott.

Midjum ta' tkabbir huwa l-midjum tal-kultura sintetiku komplut li fih tikber l-alga tat-test meta tiġi esposta għas-sustanza kimika tat-test. Normalment is-sustanza kimika tat-test tinħall fil-midjum tat-test.

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

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'p < 0,05) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżatt taħt l-LOEC.

Il-varjabbli ta' rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivata minn parametri mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-bijomassa ta' kejl direttament jew kwalunkwe wieħed mis-surrogati msemmija.

Rata ta' tkabbir speċifika hija varjabbli ta' rispons iddefinit bħala l-kwozjent tad-differenza tal-logaritmi naturali ta' parametru ta' osservazzjoni (f'dan il-metodu ta' ttestjar, il-bijomassa) u l-perjodu ta' żmien rispettiv.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli tal-kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-valur tal-varjabbli tal-kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni biex tiġi espressa ż-żieda fil-bijomassa matul it-test.

Appendiċi 2

Razez murija li huma xierqa għat-test

Alga ħadra

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

Desmodesmus subspicatus (li qabel kienet magħrufa bħala *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Dijatomi

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Ċjanobatterji

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sorsi ta' Razez

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

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

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

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nickolausberger Weg 18
37073 Göttingen
GERMANY

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

Dehra u karatteristiċi tal-ispeċijiet rakkomandati

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Dehra	Ċelloli uniċi mgħawġin u milwijin	Ċelloli ovali fil-biċċa l-kbira uniċi	Vireg	Ktajjen ta' ċelloli ovali	Vireg
Qies (T × W) μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volum ta' ċelloli (μm (3)/ċellola)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Piż xott taċ-ċelloli (mg/ċellola)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Rata ta' tkabbir (3) (jum^{-1})	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Imkejla b'kontatur tal-partiċelli elettroniku

(2) Ikkalkolata mill-qies

(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 dwar il-Kulturi u l-Immaniġġar tal-Ispeċijiet tal-Ittestjar Rakkomandati

Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus

Ġeneralment faċli żżomm dawn l-algi ħodor f'diversi midjums ta' kulturi. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Iċ-ċelloli ġeneralment huma solitarji, u l-kejliet tad-densità taċ-ċelloli jistgħu jsiru faċilment permezz ta' kontatur tal-frak elettroniku jew mikroskopju.

Anabaena flos-aquae

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Huwa partikolarment importanti li jiġi evitat milli l-kultura tal-lott tgħaddi l-fażi ta' tkabbir taz-zokk meta tiġġedded, l-irkupru huwa diffiċli f'dan il-punt.

Anabaena flos-aquae tiżvilupppa aggregati ta' ktajjen ta' ċelloli mbejta. Id-daqs ta' dawn l-aggregati jista' jvarja skont il-kundizzjonijiet tal-kulturi. Jaf ikun meħtieġ li dawn l-aggregati jitqassmu meta l-għadd tal-mikroskopju jew kontatur tal-frak elettroniku jintuża għad-determinazzjoni tal-bijomassa.

Is-sonikazzjoni tas-sottokampjuni tista' tintuża biex jinkisru l-ktajjen biex titnaqqas il-varjabbiltà tal-għadd. Sonikazzjoni itwal milli meħtieġ sabiex jinkisru l-ktajjen f'tulijiet iqsar tista' teqred iċ-ċelloli. L-intensità u d-durata tas-sonikazzjoni għandhom ikunu l-istess għal kull trattament.

Għodd biżżejjed oqsma fuq l-emoċitometru (tal-inqas 400 ċellola) biex tgħin tikkumpensa għall-varjabbiltà. Dan sejjer itejjeb l-affidabbiltà tad-determinazzjonijiet tad-densità mikroskopika.

Jista' jintuża kontatur elettroniku tal-partiċelli għad-determinazzjoni tal-volum ta' ċelloli totali ta' Anabaena wara t-tkissir tal-ktajjen taċ-ċelloli b'sonifikazzjoni b'attenzjoni. L-enerġija ta' sonifikazzjoni għandha tiġi aġġustata biex jiġi evitat it-txifkil taċ-ċelloli.

Uża mikser b'vortiċi jew metodu xieraq simili biex tiżgura li s-sospensjoni tal-alga użata biex tinokula r-reċipjenti tat-test titħallat sew u tkun omoġenja.

Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqiegħdu fuq mejda b'mikser orbitali jew reċiprokat b'madwar 150 rivoluzzjoni fil-minuta. Inkella, jistgħu jiġu aġitati b'mod intermittenti biex titnaqqas it-tendenza ta' Anabaena li tifforma ċapep. Jekk ikun hemm ċapep, għandha tingħata attenzjoni biex jintlaħqu kampjuni rappreżentattivi għall-kejliet tal-bijomassa. Jaf tkun hemm bżonn ta' aġitazzjoni qawwija qabel il-kampjunar biex jiġu diżintegrati ċ-ċapep ta' alga.

Synechococcus leopoliensis

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi.

Synechococcus leopoliensis tikber bħala ċelloli f'forma ta' vireg solitarji. Iċ-ċelloli huma żgħar ħafna, u dan jikkomplika l-użu ta' għadd mikroskopiku għall-kejliet tal-bijomassa. Kontaturi elettroniċi tal-partiċelli mgħammra għall-għadd ta' partiċelli sa daqs ta' madwar 1 μm huma siewja. Kejliet fluworometriċi in vitro huma applikabbli wkoll.

Navicula pelliculosa

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Kun af li f'dan il-midjum huwa meħtieġ is-silikat.

Navicula pelliculosa tista' tifforma aggregati f'ċerti kundizzjonijiet ta' tkabbir. Minħabba l-produzzjoni ta' lipidi, iċ-ċelloli algali għandhom it-tendenza li kultant jakkumulaw fir-rita tal-wiċċ. F'ċerti ċirkostanzi jridu jittieħdu miżuri speċjali meta jittieħdu sottokampjuni għad-determinazzjoni tal-bijomassa sabiex jinkisbu kampjuni rappreżentattivi. Jaf ikun meħtieġ tħawwid bis-saħħa, eż. permezz ta' mikser b'vortiċi.

Appendiċi 3

Idjums tat-tkabbir

Jista' jintuża wieħed miż-żewġ midjums tat-tkabbir li ġejjin:

— Midjum tal-OECD: Midjum oriġinali tat-TG 201 tal-OECD, skont l-ISO 8692 ukoll

— US. AAP tal-midjum tal-EPA, skont l-ASTM ukoll.

Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reaġent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

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

Komponent	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_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
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Il-proporzjon ta' molari ta' EDTA mal-ħadid taqbeż bi ftit l-unità. Dan jevita l-preċipitazzjoni tal-ħadid u fl-istess ħin, il-kelazzjoni ta' jonji tal-metall tqil tiġi 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. Relazzjoni approssimattiva bejn il-pH f'25 °C u l-konċentrazzjoni ta' bikarbonanat molari hija:

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

B'15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (midjum tal-EPA tal-Istati Uniti) u b'50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (midjum ta' OECD).

Kompożizzjoni tal-elementi tal-midjums tat-test

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparazzjoni tal-midjum OECD

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
Soluzzjoni ewlenija 1: makro nutrijenti	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Soluzzjoni ewlenija 2: ħadid	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
Soluzzjoni ewlenija 3:	
elementi tat-traċċi	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Soluzzjoni ewlenija 4:	
bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Sterilizza s-soluzzjoni ewlenija b'filtrazzjoni tal-membrana (dijametru medju tal-pori ta' 0,2 µm) jew b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15 min). Aħżen is-soluzzjonijiet fid-dlam f'4 °C.

Tagħmilx awtoklavazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 4, iżda sterilizzahom b'filtrazzjoni tal-membrana.

Ipprepara midjum tat-tkabbir billi żżid volum xieraq tas-soluzzjonijiet elwenin 1-4 mal-ilma:

Żid 500 ml ilma sterelizzat:

10 ml soluzzjoni ewlenija 1

1 ml soluzzjoni ewlenija 2

1 ml soluzzjoni ewlenija 3

1 ml soluzzjoni ewlenija 4

Żid sakemm isiru 1 000 ml bl-ilma sterilizzat.

Ħalli biżżejjed ħin biex tekwilibrija l-midjum mas-CO2 atmosferiku, jekk ikun meħtieġ billi ddaħħal bżieżaq tal-arja sterili u ffiltrati għal xi sigħat.

Preparazzjoni tal-midjum EPA tal-Istat Uniti

1. Żid 1 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija f'*2.1-2.7* għal madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat u mbagħad ħallat sa litru (1).

2. Is-soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti jiġu prodotti billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Ir-reaġenti *2.1, 2.2, 2.3,* u *2.4* jistgħu jiġu kkombinati f'soluzzjoni ewlenija waħda.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.

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

2.4 Soluzzjoni Ewlenija tal-Mikronutrijenti (ara 3).

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

2.6 K_2HPO_4 0,522 g.

2.7 $NaHCO_3$ 7,500 g.

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

Nota 1: Uża għal speċijiet tat-test tad-dijatoma biss. Tista' tiżdied direttament (202,4 mg) jew permezz ta' soluzzjoni ewlenija biex tingħata konċentrazzjoni ta' 20 mg/l Si fil-midjum.

3. Is-soluzzjoni ewlenija tal-mikronutrijenti tiġi prodotta billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat:

3.1 H_3BO_3 92,760 mg.

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

3.3 $ZnCl_2$ 1,635 mg.

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

3.5 CoCl2·6H2O 0,714 mg.

3.6 $Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 3,630 mg.

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

3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 150,000 mg. [Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].

3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ 0,005 mg Ara n-Nota 2.

Nota 2: Uża biss f'midjum għall-kulturi ewlenin tal-ispeċijiet ta' dijatomi.

4. Aġġusta l-pH għal 7,5 ± 0,1 b'0,1 *N* jew 1,0 *N* NaOH jew HCl.

5. Iffiltra l-midjums f'kontenitur sterili jew permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,22 µm jekk ser jintuża kontatur tal-partiċelli jew filtru ta' 0,45 µm jekk mhux ser jintuża kontatur tal-partiċelli.

6. Aħżen il-midjum fid-dlam f'madwar 4 °C sakemm jintuża.

Appendiċi 4

Eżempju ta' proċedura għall-kulturi tal-algi

Osservazzjonijiet ġenerali

Il-fini tal-kulturi abbażi tal-proċedura li ġejja huwa li jinkisbu kulturi algali għat-testijiet tat-tossiċità.

Uża metodi xierqa biex tiżgura li l-kulturi algali mhumiex infettati b'batterji. Il-kulturi akseniċi jistgħu jkunu rakkomandabbli iżda għandhom jiġu stabbiliti u użati kulturi unialgali.

L-operazzjonijiet kollha għandhom jitwettqu f'kundizzjonijiet sterili sabiex tiġi evitata kontaminazzjoni b'batterji u algi oħra.

Tagħmir u materjali

Ara taħt il-metodu ta' ttestjar: Apparat.

Proċeduri għall-kisba ta' kulturi algali

Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tan-nutrijenti (midjums):

Il-melħ kollu tan-nutrijenti tal-midjum huwa ppreparat bħala soluzzjonijiet ewlenin ikkonċentrati u maħżuna fid-dlam u l-kesħa. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati b'filtrazzjoni jew b'awtoklavazzjoni.

Il-midjum jitħejja billi jiżdied l-ammont xieraq tas-soluzzjoni ewlenija biex jiġi sterilizzat l-ilma distillat, filwaqt li tingħata attenzjoni li ma sseħħ ebda infezzjoni. Għal midjum solidu, jiżdied 0,8 fil-mija ta' agar.

Kultura ewlenija:

Il-kulturi ewlenin huma kulturi algali li huma ttrasferiti b'mod regolari lejn midjum ġdid biex jaġixxu bħala materjal tat-test inizjali. Jekk il-kulturi ma jintużawx b'mod regolari, dawn jitferrxu f'tubi agari mżerżqa. Dawn huma ttrasferiti lejn midjum ġdid tal-inqas darba kull xahrejn.

Il-kulturi ewlenin jitkabbru fi flasks konikali li fihom l-midjum xieraq (volum ta' madwar 100 ml). Meta l-algi jkunu inkubati f'20 °C b'illuminazzjoni kontinwa, huwa meħtieġ trasferiment kull ġimgħa.

Matul it-trasferiment, ammont ta' kultura 'qadima' huwa ttrasferit b'pipetti sterili fi flixkun ta' midjum ġdid, biex b'hekk bl-ispeċijiet li jikbru malajr, il-konċentrazzjoni inizjali hija madwar 100 darba iżgħar mill-kultura l-qadima.

Ir-rata ta' tkabbir ta' speċi tista' tiġi ddeterminata mill-kurva tat-tkabbir. Jekk dan ikun magħruf, huwa possibbli li tiġi stmata d-densità li biha għandha tiġi ttrasferita fil-midjum il-ġdid. Dan għandu jsir qabel ma l-kultura tilħaq il-fażi tal-mewt.

Prekultura:

Il-prekultura hija maħsuba biex tagħti ammont ta' algi xierqa għall-inokulazzjoni tal-kulturi tat-test. Il-prekultura hija inkubatur fil-kundizzjonijiet tat-test u użata meta tkun qiegħda tikber b'mod esponenzjali, normalment wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 2 sa 4 ijiem. Meta l-kulturi algali jkun fihom ċelloli deformati jew anormali, dawn għandhom jiġu skartati.

Appendiċi 5

Analiżi tad-dejta skont ir-rigressjoni nonlineari

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Ir-rispons f'testijiet algali u testijiet tat-tkabbir mikrobjali oħra — tkabbir tal-bijomassa — huwa min-natura tiegħu varjabbli kontinwu jew metriku — rata ta' proċess jekk tintuża rata ta' tkabbir u huwa integrali maż-żmien jekk tintgħażel il-bijomassa. It-tnejn huma referenzjati għar-rispons medju korrispondenti tal-kontrolli mhux esposti tar-repliki li juru rispons massimu għall-kundizzjonijiet imposti — b'dawl u temperatura bħala fatturi determinanti prinċipali tat-test algali. Is-sistema hija distribwita jew omoġenja u l-bijomassa tista' tidher bħala kontinwazzjoni mingħajr konsiderazzjoni taċ-ċelloli individwali. Id-distribuzzjoni tal-varjanza tat-tip ta' rispons għal tali sistema hija relatata unikament mal-fatturi sperimentali (ġeneralment deskritti mil-log-normali jew distribuzzjonijiet normali tal-iżball). Dan b'kuntrast għar-risponsi tal-bijomassa tipiċi b'dejta kwantali għal liema t-tolleranza (ġeneralment iddistribwita b'mod binomjali) tal-organiżmi individwali li ħafna drabi huma supponuti li huma komponent tal-varjanza dominanti. Hawnhekk ir-risponsi tal-kontroll huma żero jew fil-livell ta' sfond.

Fis-sitwazzjoni mhux ikkumplikata, ir-rispons normalizzat jew relattiv, r, jonqos monotonikament minn 1 (l-ebda inibizzjoni) sa 0 (inibizzjoni ta' 100 fil-mija). Wieħed għandu jinnota li r-risponsi kollha għandhom żball assoċjat magħhom u li l-inibizzjonijiet negattivi evidenti jistgħu jiġu kkalkolati bħala riżultat ta' żball każwali biss.

Analiżi ta' rigressjoni

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 matematiċi funzjonali sempliċi taw prova li jiddeskrivu b'suċċess ir-relazzjonijiet bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons miksuba fit-testijiet tal' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga. Il-funzjonijiet jinkludu eż. l-ekwazzjoni loġistika, l-ekwazzjoni asimettrika ta' Weibull u l-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log, li huma kollha kurvi ta' sigmoid li asimptotikalment joqorbu lejn iż-żero għal C → 0 u waħda għall-infinit ta' C →.

L-użu tal-mudelli tal-funzjoni tal-livell limitu kontinwu (eż. il-mudell ta' Kooijman 'għall-inibizzjoni tat-tkabbir tal-popolazzjoni' Kooijman et al. 1996) ġie propost dan l-aħħar jew alternattiv għall-mudelli asintotiċi. Dan il-mudell jassumi xejn effetti f'konċentrazzjonijiet taħt ċertu livell, EC_0+, 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.

Kun af li l-analiżi tista' tkun sempliċi minimizzazzjoni tas-somom tal-kwadri residwi (jekk tiġi supponuta varjanza kostanti) jew kwadri ppeżati jekk l-eteroġenità tal-varjanza tiġi kkumpensata.

Proċedura

Il-proċedura tista' tiġi deskritta kif ġej: Agħżel ekwazjoni funzjonali xierqa, Y = f(C), u adattaha għad-dejta permezz ta' rigressjoni nonlineari. Idealment għandek tuża l-kejliet minn kull flask individwali iktar milli l-medji tar-repliki, sabiex testratta kemm jista' jkun informazzjoni mid-dejta. Jekk il-varjanza tkun għolja, min-naħa l-oħra, l-esperjenza prattika tissuġġerixxi li l-medji tar-repliki jistgħu jipprovdu stima matematika iktar robusta li hija inqas influwenzata minn żbalji sistematiċi fid-dejta, milli b'kull punt ta' dejta individwali miżmum.

Ipplottja l-kurva mdaħħla u d-dejta mkejla u eżamina jekk il-kurva mdaħħla hijiex xierqa. Analiżi tar-residwi tista' tkun għodda partikolarment utli għal dan il-għan. Jekk ir-relazzjoni funzjonali magħżula biex jiddaħħal ir-rispons tal-konċentrazzjoni ma tiddeskrivix sew il-kurva kollha jew xi parti essenzjali tagħha, bħar-rispons f'konċentrazzjonijiet baxxi, agħżel opzjoni ta' dħul tal-kurva oħra — eż. kurva mhux asimettrika bħall-funzjoni ta' Weibul minflok waħda simettrika. L-inibizzjonijiet negattivi jistgħu jkunu problema, pereżempju bil-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log li bl-istess mod titlob funzjoni tar-rigressjoni alternattiva. Mhuwiex rakkomandat li tassenja valur

żero jew pożittiv żgħir għal tali valuri negattivi peress li dan ifixkel 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 $EC_{lowx.}$ 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 $EC_{low\ x}$. L-esperjenza mill-ittestjar prattiku wriet li l-preċiżjoni tat-test algali normalment tippermetti stima raġonevolment preċiża fil-livell tal-inibizzjoni ta' 10 % jekk il-punti ta' dejta jkunu suffiċjenti — sakemm ikun hemm stimulazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxa bħala fattur ta' konfużjoni. 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' ppeżar

Il-varjanza sperimentali, ġeneralment mhijiex konsistenti u ġeneralment tinkludi komponenti proporzjonali, u għalhekk normalment titwettaq rigressjoni ppeżata b'mod vantaġġjuż. Il-fatturi ta' ppeżar għal tali analiżi, normalment huma preżunti bħala proporzjonalment inversi għall-varjanza:

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

Ħafna programmi ta' rigressjoni jippermettu l-opzjoni ta' analiżi ta' rigressjoni ppeżata b'fatturi ta' ponderazzjoni elenkati f'tabella. B'mod konvenjenti l-fatturi ta' ppeżar għandhom jiġu normalizzati billi dawn jiġu mmoltiplikati $b'n/\Sigma\ w_i$ (n huwa n-numru ta' punti ta' dejta) biex b'hekk it-total tagħhom ikun wieħed.

Risponsi normalizzanti

In-normalizzazzjoni permezz tar-rispons ta' kontroll medju twassal għal xi problemi ewlenin u tagħti lok għal struttura ta' varjanza pjuttost ikkumplikata. Meta wieħed jaqsam ir-risponsi bir-rispons ta' kontroll medju għall-kisba tal-perċentwal ta' inibizzjoni, jintroduċi żball addizzjonali kkawżat mill-iżball fil-medja tal-kontroll. Sakemm dan l-iżball ma jkunx negliġibbilment żgħir, il-fatturi ta' ppeżar fil-limiti ta' rigressjoni u kunfidenza għandhom jiġu korretti għall-kovarjanza mal-kontroll (Draper u Smith, 1981). Kun af li l-preċiżjoni għolja fuq ir-rispons ta' kontroll medju stmat huwa importanti sabiex titnaqqas il-varjanza globali għar-rispons relattiv. Din il-varjanza hija kif ġej:

(Is-sottoskritt i jirreferi għal-livell ta' konċentrazzjoni u s-sottoskritt 0 għall-kontrolli)

$$Yi = \text{Rispons relattiv} = ri/r0 = 1 - I = f(C_i)$$

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

u għax $(\partial Y_i/ \partial r_i) = 1/r_0$ 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:

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

L-iżball fil-medja tal-kontroll huwa proporzjonat b'mod invers għall-għerq kwadrat tan-numru tar-repliki tal-kontroll bħala medja, u xi drabi jista' jkun iġġustifikat biex jinkludi dejta storika u b'dan il-mod inaqqas bil-qawwi l-iżball. Proċedura alternattiva mhijiex dik li tiġi nnormalizzata d-dejta u jitqiegħdu risponsi assoluti inkluża d-dejta tar-rispons ta' kontroll iżda li jiġi introdott valur tar-rispons ta' kontroll bħala parametru addizzjonali li għandu jiddaħħal b'rigressjoni nonlineari. B'ekwazzjoni tar-rigressjoni b'2 parametri tas-soltu, dan il-metodu jeħtieġ li jiddaħħlu 3 parametri u, għalhekk, jirrekjedi iktar punti ta' dejta minn rigressjoni nonlineari fuq id-dejta li hi normalizzata permezz ta' rispons predeterminat ta' kontroll.

Intervalli ta' kunfidenza inversi

Il-kalkolu tal-intervalli ta' kunfidenza tar-rigressjoni mhux lineari minn stima inversa huwa pjuttost kumpless u mhux opzjoni standard disponibbi f'pakketti ta' programmi statistiċi tal-kompjuter ordinarji. 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 uża r-relazzjonijiet tad-definizzjoni f (α, β, EC_{10}) = 0,1 u f (α, β, EC_{50}) = 0,5 għas-sostitut 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.

Dan l-aħħar il-'metodi boot strap' saru popolari. Tali metodi jużaw id-dejta mkejla u kampjunar mill-ġdid frekwenti mmexxi minn ġeneratur tan-numri każwali biex tiġi stmata d-distribuzzjoni tal-varjanza empirika.

REFERENZI

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

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

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

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

(4) Il-Kapitolu C.11 huwa sostitwit ma' dan li ġej:

"C.11. **ĦAMA ATTIVATA, TEST TAL-INIBIZZJONI RESPIRATORJA (KARBONJU U OSSIDAZZJONI TAL-AMMONIJAKA)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 209 tal-OECD (2010) Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu biex jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq il-mikro-organiżmi minn ħama attivata (fil-biċċa l-kbira batterji) billi titkejjel ir-rata ta' respirazzjoni tagħhom (karbonju u/jew ossidazzjoni tal-ammonju) f'kundizzjonijiet iddefiniti fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test. Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq it-test ETAD (1) (2) (Assoċjazzjoni Ekoloġika u Tossikoloġika tal-industrija tal-Manifattura tas-Sustanżi taż-Żebgħa), fuq l-OECD TG 209 preċedenti (3) u fuq l-Istandard ISO rivedut 8192 (4). L-iskop tat-test huwa li jipprovdi metodu ta' skrinjar rapidu biex jivvaluta l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq il-mikro-organiżmi tal-ħama attivata tal-istadju (aerobiku) bijoloġiku tal-impjanti tat-trattament tal-ilma mormi. Ir-riżultati tat-test jistgħu jservu wkoll bħala indikatur ta' konċentrazzjonijiet mhux inibitorji xierqa tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bijodegradabilità (perżempju Kapitoli C.4 A-F, C.9, C.10, C12 u C.29 ta' dan l-Anness, OECD TG302C). F'dan il-każ, it-test jista' jitwettaq bħala test tal-iskrinjar, b'mod simili għas-sejba tal-medda jew it-test tal-limitu (ara l-paragrafu 39), li jikkunsidra r-respirazzjoni globali biss. Madankollu, din l-informazzjoni għandha titqies b'attenzjoni għal testijiet tal-bijodegradabbiltà lesti (Kapitolu C.4 A-F u C.29 ta' dan l-Anness) għal liema l-konċentrazzjoni tal-inokulu hija sinifikament inqas minn dik użata f'dan il-metodu ta' ttestjar. Fil-fatt, nuqqas ta' inibizzjoni f'dan it-test tar-respirazzjoni mhux bilfors jirriżulta f'kudizzjonijiet mhux inibitorji fit-test tal-bijodegradabilità faċli tal-Kapitoli C.4 A-F jew C.29 ta' dan l-Anness.

2. B'mod ġenerali, l-inibizzjoni tar-respirazzjoni tidher li ġiet applikata b'suċċess minn mindu ġiet applikata l-ewwel, iżda f'xi okkażjonijiet ġew irrapportati riżultati foloz, eż. (2) (4) (5). Kurvi ta' respirazzjoni relatati mal-konċentrazzjoni xi drabi jkunu maqsumin f'żewġ fażijiet, il-plotts ta' doża-rispons tgħawġu u l-valuri EC_{50} kienu baxxi b'mod mhux mistenni (5). L-investigazzjonijiet urew li tali riżultati jinkisbu meta l-ħama attivata użata fit-test tinnitrifika b'mod sinifikanti u s-sustanza kimika tat-test għandha effett ikbar fuq l-ossidazzjoni tal-ammonju milli fuq l-ossidazzjoni eterotrofika ġenerali. Għalhekk, dawn ir-riżultati foloz jistgħu jingħelbu billi jsir ittestjar addizzjonali permezz ta' inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni. Bil-kejl tar-rati ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza u n-nuqqas ta' tali inibitur, eż. N-alliltjourea (ATU), jistgħu jiġu kkalkolati r-rati ta' teħid tal-ossiġenu eterotrofiku u ta' nitrifikazzjoni separat totali (4) (7) (8). Għalhekk, l-effetti inibitorji ta' sustanza kimika tat-test fuq iż-żewġ proċessi jistgħu jiġu ddeterminati u l-valuri EC_{50} kemm għall-ossidazzjoni tal-karbonju organiku (eterotrofika) kif ukoll l-ossidazzjoni tal-ammonijaka (nitrifikazzjoni) jistgħu jiġu kkalkolati bħas-soltu. Ta' min jinnota li f'xi każijiet rari, l-effett inibitorju ta' N-alliltjourea jista' jitħassar parzjalment jew kompletament bħala riżultat tal-kumplessazzjoni mas-sustanzi kimiċi tat-test jew is-supplimenti tal-midjum, eż. joni Cu^{++} (6). Il-joni Cu^{++} huma essenzjali għal *Nitrosomonas*, iżda huma tossiċi f'konċentrazzjoni ogħla.

3. Il-ħtieġa għal nitrifikazzjoni fit-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, bħala pass meħtieġ fil-proċess ta' tneħħija tal-komposti tan-nitroġenu mill-ilmijiet mormija b'denitrifikazzjoni għall-prodotti gassużi, saret urġenti b'mod partikolari fil-pajjiżi Ewropej; l-UE issa stabbilixxiet limiti iktar baxxi għall-konċentrazzjoni ta' nitroġenu fl-effluwenti trattati skarikati fl-ilmijiet riċeventi. ([1]).

4. Għall-biċċa l-kbira tal-każijiet, il-metodu biex jiġi vvalutat l-effett fuq il-proċessi ta' ossidazzjoni tal-karbonju organiku waħdu huwa biżżejjed. Madankollu, f'xi każijiet tkun meħtieġa eżaminazzjoni tal-effett fuq in-nitrifikazzjoni waħedha, jew kemm fuq in-nitrifikazzjoni kif ukoll fuq l-ossidazzjoni tal-karbonju organiku b'mod separat, għall-interpretazzjoni tar-riżultati u l-fehim tal-effetti.

PRINCIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Ir-rati ta' respirazzjoni tal-kampjuni ta' ħama attivata mogħtija drenaġġ sintetiku jitkejlu f'ċellola magħluqa li fiha elettrodu tal-ossiġenu wara ħin ta' kuntatt ta' 3 sigħat. B'kunsiderazzjoni tax-xenarju ta' espożizzjoni realistiku, jaf ikunu xierqa żminijiet ta' kuntatt itwal. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi degradata malajr, eż. b'mod abjotiku permezz ta' idrolisi, jew hija volatili u l-konċentrazzjoni ma tistax tinżamm b'mod adegwat, jista' jintuża perjodu ta' espożizzjoni addizzjonali iqsar ta' eż. 30 minuta. Is-sensittività ta' kull lott ta' ħama attivata għandha tiġi vverifikata b'sustanza kimika ta' referenza xierqa fil-jum tal-espożizzjoni. It-test ġeneralment jintuża biex jiddetermina l-EC_x (eż. EC_{50}) tas-sustanza kimika tat-test u/jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

6. L-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu minn mikro-organiżmi li jossidaw il-karbonju organiku tista' tkun espressa b'mod separat minn dik minn mikro-organiżmi li jossidaw l-ammonju permezz tal-kejl tar-rati ta' teħid ta' ossiġenu fin-nuqqas u l-preżenza ta' N-alliltjourea, inibitur speċifiku tal-ossidazzjoni tal-ammonju għan-nitrit mill-batterji nitrifikanti tal-ewwel stadju. F'dan il-każ, il-perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' teħid ta' ossiġenu huwa kkalkolat bi tqabbil tar-rata ta' teħid ta' ossiġenu fil-preżenza ta' sustanza kimika tat-test bir-rata ta' teħid tal-ossiġenu medja tal-kontrolli korrispondenti li ma fihom ebda sustanza kimika tat-test, kemm fil-preżenza kif ukoll fin-nuqqas tal-inibitur speċifiku, N-alliltjourea.

7. Kwalunkwe teħid ta' ossiġenu li jirriżulta minn proċessi abijotiċi jista' jiġi skopert billi tiġi ddeterminata r-rata fit-taħlitiet tas-sustanza kimika tat-test, il-midjum tad-drenaġġ sintetiku u l-ilma, filwaqt li titħalla barra l-ħama attivata.

INFORMAZZJONI TAS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

8. L-identifikazzjoni (idealment in-numru CAS), l-isem (IUPAC), il-purita, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-volatilità u l-karatteristiċi tal-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu magħrufa biex issir l-interpretazzjoni korretta tar-riżultati. Normalment, is-sustanzi kimiki volatili ma jistgħux jiġu ttestjati b'mod adegwat sakemm ma jittiħdux prekawzzjonijiet speċjali (ara l-paragrafu 21).

([1]) Id-Direttiva tal-Kunsill 91/271/KEE tal-21 ta' Mejju 1991 dwar it-trattament ta' l-ilma urban mormi. ĠU L 135, 30.5.1991, p. 40

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma, li ma tantx jinħallu u sustanzi kimiċi volatili. Madankollu, mhux dejjem jaf ikun possibbli li jinkisbu valuri EC_{50} b'sustanzi kimiċi ta' solubbiltà limitata u riżultati validi b'sustanzi kimiċi volatili jistgħu jinkisbu biss sakemm il-biċċa l-kbira (xi > 80 %) tas-sustanza kimika tat-test tibqa' fit-taħlita tar-reazzjoni fi tmiem il-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni. Għandha tiġi sottomessa dejta ta' appoġġ analitika addizzjonali biex tiġi rfinata l-konċentrazzjoni EC_x meta jkun hemm xi inċertezza dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test jew il-volatilità tagħha.

SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA

10. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza għandhom jiġu ttestjati perjodikament sabiex jiġi żgurat li l-metodu ta' ttestjar u l-kundizzjonijiet tat-test huma affidabbli, u biex tiġi ċċekkjata s-sensittività ta' kull lott ta' ħama attivata użata bħala inokulu mikrobjali dakinhar tal-espożizzjoni. Is-sustanza kimika 3,5-diklorofenol (3,5-DCP) hija rakkomandata bħala s-sustanza kimika inibitorja ta' referenza, peress li hija inibitur magħruf tar-respirazzjoni u tintuża f'diversi tipi ta' test għal inibizzjoni/tossiċità (4). Jista' jintuża wkoll sulfat tar-ram (II) pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza għall-inibizzjoni tar-respirazzjoni totali (9). N-metilanilina tista' tintuża bħala inibitur ta' nitrifikazzjoni ta' referenza speċifiku (4).

KRITERJI TA' VALIDITÀ U RIPRODUĊIBBILTÀ

11. Ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu b'kontrolli inbjank (mingħajr is-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza kimika ta' referenza) ma għandhiex tkun inqas minn 20 mg ossiġenu għal kull gramma ħama attivata (piż xott ta' solidi sospiżi) f'siegħa. Jekk ir-rata hija inqas, it-test għandu jiġi ripetut b'ħama attivata maħsula jew mill-ħama minn sors ieħor. Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu fir-repliki ta' kontroll ma għandux ikun iktar ta' 30 % fi tmiem it-test finali.

12. F'ring test internazzjonali tal-2004 organizzat mill-ISO (4) permezz ta' ħama attivata derivata minn drenaġġ domestiku, instab li l-EC_{50} ta' 3,5-DCP hija fil-medda ta' 2 mg/l sa 25 mg/l għar-respirazzjoni totali, 5 mg/l sa 40 mg/l għal respirazzjoni eterotropika u 0,1 mg/l sa 10 mg/l għal respirazzjoni ta' nitrifikazzjoni. Jekk l-EC_{50} ta' 3,5-DCP ma taqax fil-medda mistennija, it-test għandu jiġi ripetut b'ħama attivata minn sors ieħor. L-EC_{50} ta' sulfat tar-ram (II) pentaidrat għandha taqa' fil-medda ta' 53-155 mg/l għar-respirazzjoni totali (9).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Reċipjenti u apparat tal-ittestjar

13. Għandu jintuża t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:

(a) Reċipjenti tat-test — pereżempju, bekkijiet ta' 1 000 ml biex ikun fihom 500 ml taħlita ta' reazzjoni (ara 5 f'Fig.1);

(b) Ċelloli u aċċessorji għall-kejl ta' konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt; elettrodu tal-ossiġenu xieraq; ċellola magħluqa biex tinkludi l-kampjun mingħajr ebda spazju vojt fuqani u reġistratur (eż. 7, 8, 9 f'Fig.1 tal-Appendiċi 2); inkella, jista' jintuża flixkun BOD bi sleeve adaptor xieraq għall-issiġillar tal-elettrodu tal-ossiġenu mal-għonq tal-flixkun (ara Fig. 2 tal-Appendiċi 3). Biex jiġi evitat it-telf ta' likwidu spostat mal-inserzjoni tal-elettrodu tal-ossiġenu, huwa rakkomandat li l-ewwel jiddaħħal lembut jew tubu tal-ħġieġ mis-sleeve, jew li jintużaw reċipjenti b'rimmijiet flared-out. Fiż-żewġ każijiet għandu jintuża ħawwad manjetiku jew metodu ta' tħawwid alternattiv, eż. sonda awtomatika ta' taħwid;

(c) Ħawwada manjetiċi u segwituri, mgħottijin b'materjali inerti, għall-użu f'kompartiment tal-kejl u/jew fir-reċipjenti tat-test;

(d) Apparat ta' arjazzjoni: jekk ikun meħtieġ, għandha tingħadda arja kumpressa permezz ta' filtru xieraq biex jitneħħa t-trab u ż-żejt u permezz ta' fliexken tal-ħasil li fihom l-ilma biex tiġi umidifikata l-arja. Il-kontenuti tar-reċipjenti għandhom jiġu arjati b'pipetti tal-Pasteur, jew apparat ta' arjazzjoni ieħor, li ma jassorbix sustanzi kimiċi. Ħawwad orbitali mħaddem f'veloċitajiet orbitanti bejn 150 u 250 rpm bi flasks pereżempju, b'kapaċità ta' 2 000 ml, jistgħu jintużaw biex jissodisfaw id-domanda ta' ossiġenu għall-ħama u jingħelbu d-diffikultajiet bis-sustanzi kimiċi li jipproduċu ragħwa eċċessiva, huma volatili u għalhekk jintilfu, jew huma diffiċli biex tferrixhom meta jiġu arjati bi sparging tal-arja. Is-sistema tat-test hija ġeneralment ta' bekkijiet arjati kontinwament u sekwenzjalment stabbiliti (eż. f'intervalli ta' madwar 10 — 15-il minuta), imbagħad analizzati b'mod sekwenzali. Tista' tintuża wkoll strumentazzjoni vvalidata li tippermetti l-arjazzjoni simultanja u l-kejl tar-rata ta' konsum tal-ossiġenu fit-taħlitiet;

(e) miter tal-pH;

(f) Iċċentrifuga, ċentrifuga ġenerali ta' fuq il-bank għal ħama b'kapaċità ta' 10 000 m/s².

Reaġenti

14. Għandhom jintużaw biss reaġenti bi grad analitiku l-ħin kollu.

Ilma

15. Għandu jintuża ilma distillat jew dejonizzat, li fih inqas minn 1 mg/l DOC, ħlief meta jkun speċifikat ilma tal-vit mingħajr klorin.

Għalf minn drenaġġ sintetiku

16. Il-midjum għandu jitħejja biex ikun fih il-kostitwenti li ġejjin fl-ammonti ddikjarati:

— pepton	16 g
— estratt tal-laħam (jew estratt tal-ħxejjex paragunabbli)	11 g
— urea	3 g
— klorur tas-sodju (NaCl)	0,7 g
— diidrat tal-klorur tal-kalċju ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— anhydrous potassium monohydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2,8g
— ilma distillat jew dejonizzat sa litru	

17. Il-pH ta' din is-soluzzjoni għandu jkun ta' 7,5 ± 0,5. Jekk il-midjum imħejji ma jintużax mill-ewwel, dan għandu jinħażen fid-dlam f'0 °C sa 4 °C, għal mhux iktar minn ġimgħa jew f'kundizzjonijiet, li ma jibdlux il-kompożizzjoni tiegħu. Ta' min jinnota li dan id-drenaġġ sintetiku huwa konċentrat ta' 100 darba ta' dak deskritt fir-Rapport Tekniku tal-OECD 'Metodu propost għad-determinazzjoni tal-bijodegradabbiltà tas-surfetanti użati fid-deterġenti sintentiċi' 11 ta' Ġunju 1976, b'żieda ta' fosfat tal-idroġenu tad-dipotassju wkoll.

18. Inkella, il-komponenti tal-midjum jistgħu jiġi sterilizzati individwalment qabel il-ħżin, jew il-pepton u l-estratt tal-laħam jistgħu jiżdiedu ftit qabel ma jsir it-test. Qabel l-użu, il-midjum għandu jitħallat sew u l-pH aġġustat jekk ikun meħtieġ għal pH 7,5 ± 0,5.

Sustanza kimika tat-test

19. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija għal sustanzi tat-test li jinħallu fl-ilma mill-ewwel sas-solubbiltà massima tal-ilma biss (preċipitazzjonijiet mhumiex aċċettabbli). Sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma, it-taħlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu pponderati direttament fir-reċipjenti tat-test. F'dawn il-każijiet, l-użu ta' soluzzjonijiet ewlenin jaf ikun alternattiva jekk il-konċentrazzjonijiet maħlula tas-sustanzi kimiċi tat-test huma analitikament determinati fir-reċipjenti tat-test (qabel tiżdied ħama attivata). Jekk jiġu ppreparati frazzjonijiet akkomodati bl-ilma (WAFs), hija essenzjali wkoll determinazzjoni analitika tal-konċentrazzjonijiet maħlula tas-sustanzi kimiċi tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' solventi organiċi, aġenti dispersivi/emulsifikanti biex tittejjeb is-solubbiltà. Ultrasonikazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u sospensjonijiet ta' qabel it-taħlit, eż. ta' matul il-lejl, huwa possibbli meta jkun hemm informazzjoni adegwata disponibbli dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test f'tali kundizzjonijiet.

20. Is-sustanza kimika tat-test tista' taffettwa ħażin il-pH fi ħdan is-sistema tal-ittestjar. Il-pH tat-taħlitiet ittrattati bis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat qabel il-konfigurazzjoni tat-test, fi prova preliminari, biex jiġi aċċertat jekk ikunx meħtieġ aġġustament tal-pH qabel it-test ewlieni u anki dakinhar tat-test ewlieni. Soluzzjonijiet/sospensjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma għandhom jiġu newtralizzati qabel iż-żieda tal-inokulu, jekk ikun meħtieġ. Madankollu, peress li n-newtralizzazzjoni tista' tibdel il-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika, jista' jsir iktar ittestjar, skont il-finijiet tal-istudju, biex jiġi vvalutat l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq il-ħama mingħajr l-aġġustament tal-pH.

21. L-effetti tossiċi tas-sustanzi kimiċi volatili, speċjalment fit-testijiet li fihom l-arja tgħaddi effervexxentement mis-sistema, jistgħu jirriżultaw f'livelli ta' effett varjabbli minħabba t-telf tas-sustanza matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Għandha tiġi eżerċitata kawtela b'tali sustanzi billi ssir analiżi speċifika għas-sustanza tat-taħlitiet ta' kontroll li fihom is-sustanza u jiġi mmodifikat ir-reġim ta' arjazzjoni.

Sustanza kimika ta' referenza

22. Jekk 3,5-diklorofenol jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza, għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ta' 1,00 g ta' 3,5-diklorofenol f'1 000 ml ilma (15). Għandu jintuża ilma sħun u/jew ultrasonifikazzjoni biex jiġi aċċellerat ix-xoljiment u biex is-soluzzjoni tilħaq il-volum meta titkessaħ għat-temperatura tal-kamra. Madankollu, għandu jiġi żgurat li s-sustanza kimika ta' referenza ma tinbidilx strutturalment. Il-pH tas-soluzzjoni għandu jiġi ċċekkjat u aġġustat, jekk ikun meħtieġ, b'NaOH jew H_2SO_4 sa pH 7 — 8.

23. Jekk jintuża sulfat tar-ram(II)pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza, jintużaw konċentrazzjonijiet ta' 58 mg/l, 100 mg/l u 180 mg/l (fattur ta' 1,8). Is-sustanza tiġi ponderata dirrettament fir-reċipjenti tat-test (29 — 50 — 90 mg għal volum totali ta' 500 ml). Imbagħad tinħall b'234 ml ta' ilma tal-vit awtoklavat. Is-sulfat tar-ram(II)pentaidrat jinħall faċilment. Meta jinbeda t-test, jiżdiedu 16-il ml drenaġġ sintetiku u 250 ml ħama miżjuda.

Inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni

24. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija ta' 2,32 g/l N-alliltjourea (ATU). Iż-żieda ta' 2,5 ml ta' din is-soluzzjoni ewlenija ma' taħlita ta' inkubazzjoni ta' volum finali ta' riżultati ta' 500 ml f'konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l) li hija magħrufa bħala suffiċjenti (4) biex tikkawża inibizzjoni ta' 100 % f'ħama attivata nitrifikanti li fiha 1,5 g/l solidi sospiżi.

Kontroll abjotiku

25. F'ċerti kundizzjonijiet rari, sustanza kimika tat-test bi proprjetajiet riduċenti qawwija jistgħu jikkawżaw konsum ta' ossiġenu abjotiku li jista' jitkejjel. F'tali każijiet, huma meħtieġa kontrolli abjotiċi biex issir diskriminazzjoni bejn it-teħid ta' ossiġenu abjotiku mis-sustanza kimika tat-test u r-respirazzjoni mikrobjali. Jistgħu jiġu ppreparati kontrolli abjotiċi billi l-inokulu jitħalla barra mit-taħlitiet tat-test. B'mod simili, kontrolli abjotiċi mingħajr inokulu jistgħu jiġu inklużi meta jitwettqu miżuri analitiċi biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni milħuqa matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-ittestjar, eż. meta jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti. F'każijiet speċifiċi, jaf ikun meħtieġ li jithejja kontroll abjotiku b'inokulu sterilizzat (eż. bl-awtoklavazzjoni jew iż-żieda ta' tossikanti sterilizzati). Xi sustanzi kimiċi jafu jipproduċu jew jikkunsmaw ossiġenu biss jekk l-erja tal-wiċċ hija kbira biżżejjed għal reazzjoni, anki jekk normalment iridu temperatura jew pressjoni ferm ogħla biex jagħmlu hekk. F'dan ir-rigward, għandha tingħata attenzjoni speċjali lis-sustanzi perossidiċi. Inokulu sterilizzat jipprovdi erja tal-wiċċ kbira.

Inokulu

26. Għal użu ġenerali, għandha tinġabar ħama attivata mill-ħruġ tat-tank ta' arjazzjoni, jew qrib il-ħruġ mit-tank, ta' impjant ta' trattament tal-ilma mormi operat sew li jirċievi fil-biċċa l-kbira drenaġġ domestiku. Skont il-fini tat-test, tipi jew sorsi oħra adegwata ta' ħama attivata, eż. ħama mkabbra fil-laboratorju, tista' tintuża f'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi xierqa ta' 2 g/l sa 4 g/l. Madankollu, il-ħama minn impjanti ta' trattament differenti x'aktarx li tesebixxi karatteristiċi u sensittivitajiet differenti.

27. Il-ħama tista' tintuża kif miġbura iżda l-frak oħxon għandu jitneħħa billi jitħalla joqgħod għal perjodu qasir, eż. 5 sa 15-il minuta, u bid-dekantazzjoni tas-saff ta' fuq ta' solidi rqaq jew billi jingħadda minn passatur (eż. malja ta' 1 mm^2). Inkella, il-ħama tista' tiġi omoġenizzata f'mikser għal madwar 15-il sekonda jew iktar, iżda hija meħtieġa kawtela fir-rigward tal-forzi laterali u l-bidla fit-temperatura li tista' sseħħ għal perjodi twal ta' taħlit.

28. Ħafna drabi huwa meħtieġ il-ħasil tal-ħamrija, eż. jekk ir-rata ta' respirazzjoni endoġena tkun baxxa. Il-ħama għandha l-ewwel tiġi ċentrifugata għal perjodu biex jiġi prodott supernatant u gerbub ta' solidi tad-drenaġġ, eż. 10 minuti f'madwar 10 000 m/s². Il-likwidu supernatanti għandu jintrema' u l-ħama għandha tiġi sospiża mill-ġdid f'ilma tal-vit mingħajr kloru, billi tithawwad, u l-ilma tal-ħasil imbagħad għandu jitneħħa b'ċentrifugazzjoni mill-ġdid u billi jerġa' jitneħħa. Il-proċess tal-ħasil u ċ-ċentrifugazzjoni għandu jiġi ripetut, jekk ikun meħtieġ. Il-massa xotta ta' volum magħruf ta' ħama sospiża mill-ġdid għandha tiġi ddeterminata u l-ħama tiġi kkonċentrata billi jitneħħa l-likur jew tiġi dilwita iktar f'ilma tal-vit mingħajr kloru biex jinkisbu l-konċentrazzjonijiet ta' solidi tal-ħama meħtieġa ta' 3 g/l. Il-ħama attivata għandha tiġi arjata kontinwament (eż. 2 l/minuta) fit-temperatura tal-ittestjar u, fejn ikun possibbli tintuża fil-jum tal-ġbir. Jekk dan ma jkunx possibbli, il-ħama kuljum għandha tingħata drenaġġ sintetiku (50 ml ħama attivata mdaħħla/l ta' drenaġġ sintetiku) għal jumejn oħra. Imbagħad il-ħama tintuża għat-test u r-riżultati jiġu aċċettati bħala validi, sakemm ma tkun seħħet ebda bidla sinifikanti fl-attività tagħha, ivvalutata mir-rata ta' respirazzjoni eterotropika u ta' nitrifikazzjoni endoġena.

29. Jistgħu jinqalgħu diffikultajiet jekk ikun hemm ragħwa matul l-inkubazzjoni sal-punt li r-ragħwa u s-solidi tal-ħama li jinġarru magħha, jinħarġu mir-reċipjenti tal-arjazzjoni. Xi drabi, ir-ragħwa tista' sempliċement tirriżulta mill-preżenta tad-drenaġġ sintetiku, iżda wieħed għandu jantiċipa l-formazzjoni rar-ragħwa jekk is-sustanza kimika tat-test hija, jew fiha, aġent tensjoattiv. Telf ta' solidi tal-ħama mit-taħlitiet tal-ittestjar sejjer jirriżulta f'rati ta' respirazzjoni artifiċjalment inqas li bi żball jistgħu jiġu interpretati bħala riżultat tal-inibizzjoni. Barra minn hekk, l-arjazzjoni ta' soluzzjoni ta' aġent tensjoattiv tikkonċentra l-aġent tensjoattiv fis-saff tar-ragħwa; telf tar-ragħwa mis-sistema tal-ittestjar sejjer ibaxxi l-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni. Ir-ragħwa tista' sempliċement tiġi kkontrollata b'metodi mekkaniċi sempliċi (eż. billi xi drabi tithawwad manwalment permezz ta' virga tal-ħġieġ) jew biż-żieda ta' aġent kontra r-ragħwa b'emulsjoni tas-siliċju mingħajr aġenti tensjoattivi u/jew bl-użu tal-metodu ta' arjazzjoni tat-tħawwid tal-flask. Jekk il-problema hija assoċjata mal-preżenza tad-drenaġġ sintetiku, il-kompożizzjoni tad-drenaġġ għandha tiġi mmodifikata billi jiġi inkluż reaġent kontra r-ragħwa b'rata ta' eż. 50 μl/l. Jekk ir-ragħwa hija kkawżata mis-sustanza kimika tat-test, il-kwantità meħtieġa għat-tnaqqis għandha tiġi ddeterminata fil-konċentrazzjoni tat-test massima, u mbagħad ir-reċipjenti ta' arjazzjoni individwali kollha għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluż dawk, eż. kontrolli inbjanki u r-reċipjenti ta' referenza fejn ma jkunx hemm ragħwa). Jekk jintużaw aġenti kontra r-ragħwa, ma għandu jkun hemm ebda interazzjoni mal-inokulu u/jew is-sustanza kimika tat-test.

PROĊEDURA TAT-TEST

30. L-inibizzjoni ta' tliet drabi differenti ta' teħid ta' ossiġenu tista' tkun determinata, totali, eterotropatika biss u dan minħabba n-nitrifikazzjoni. Normalment, il-kejl tal-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu totali għandu jkun adegwat. L-effetti fuq it-teħid tal-ossiġenu eterotropatiku mill-ossidazzjoni tal-karbonju organiku, u minħabba l-ossidazzjoni tal-ammonijaka huma meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit speċifiku għal tali żewġ punti ta' tmiem separati għal sustanza kimika partikolari jew (b'mod fakultattiv) biex jiġu spjegati kurvi ta' doża-rispons atipiċi mill-inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossiġenu.

Kundizzjonijiet tat-test

31. It-test għandu jitwettaq f'temperatura fi ħdan il-medda ta' 20 ± 2 °C.

Taħlitiet tat-test

32. Għandhom jiġu ppreparati t-taħtliet tal-ittestjar (F_T bħal fit-Tabella 1) li fihom l-ilma, għalf tad-drenaġġ sintetiku u s-sustanza kimika tat-test biex jinkisbu konċentrazzjonijiet nominali differenti tas-sustanza kimika tat-test (Ara t-Tabella 1 għal eżempji tal-volumi tal-kostitwenti). Il-pH għandu jiġi aġġustat għal 7,5 ± 0,5, jekk ikun meħtieġ, it-taħlitiet għandhom jitħalltu bl-ilma u l-inokulu miżjud biex jinkisbu volumi finali ugwali fir-reċipjenti u biex tinbeda l-arjazzjoni.

Taħlitiet ta' referenza

33. It-taħlitiet (F_R) għandhom jiġu ppreparati bis-sustanza kimika ta' referenza, eż. 3,5-diklorofenol, minflok is-sustanza kimika tat-test bl-istess mod bħat-taħlitiet tal-ittestjar.

Kontrolli inbjank

34. Fil-bidu (F_B) u fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni fit-testijiet li fihom il-bekkijiet jiġu kkonfigurati sekwenzjalment f'intervalli għandhom jiġu ppreparati kontrolli inbjanki (FB). Fit-testijiet imwettqa permezz ta' tagħmir li jippermetti li jsiru kejliet simultanji tal-konsum tal-ossiġenu, għandhom tal-inqas jiġu inklużi żewġ kontrolli inbjanki f'kull lott ta' analiżi simultanja. Il-kontrolli inbjank li fihom volum ugwali ta' ħama attivata u midjum sintetiku iżda mhux sustanza kimika tat-test jew ta' referenza. Dawn għandhom jitħalltu mal-ilma sal-istess volum bħat-taħlitiet tat-test u ta' referenza.

Kontroll abjotiku

35. Jekk ikun meħtieġ, pereżempju jekk sustanza kimika tat-test hija magħrufa jew suspettata li għandha proprjetajiet riduċenti qawwija, għandha tiġi pprepata taħlita F_A biex jitkejjel il-konsum tal-ossiġenu abjotiku. It-taħlita għandu jkollha l-istess ammonti ta' sustanza kimika tat-test, għalf tad-drenaġġ sintetiku u l-istess volum bħat-taħlitiet tat-test, iżda ebda ħama attivata.

Proċedura u kejliet ġenerali

36. It-taħlitiet tat-test, it-taħlitiet ta' referenza u l-kontrolli inbjank u abijotiċi huma inkubati fit-temperatura tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' arjazzjoni sfurzata (0,5 sa 1 l/min) biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul tinżamm 'il fuq minn 60 % — 70 % saturazzjoni u biex il-frak tal-ħama jinżamm f'sospensjoni. Huwa meħtieġ ukoll li l-kulturi jitħawdu biex il-frak tal-ħama jinżamm f'sospensjoni. L-inkubazzjoni hija kkunsidrata mibdija mal-kuntatt inizjali tal-inokulu tal-ħama attivata ma' kosistwenti oħra tat-taħlita finali. Fi tmiem l-inkubazzjoni, wara l-ħinijiet ta' espożizzjoni speċifikati li s-soltu jkunu ta' 3 sigħat, il-kampjuni jiġu rtirati biex titkejjel ir-rata ta' tnaqqis tal-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt fiċ-ċellola ddisinjata għal dan il-għan (Fig.2 tal-Appendiċi 3) jew fi flixkun BOD mimli kollu. Il-mod li bih jinbdew l-inkubazzjonijiet jiddependi fuq il-kapaċità tat-tagħmir użat biex ikejjel ir-rati ta' konsum tal-ossiġenu. Pereżempju, jekk jinkludi sonda tal-ossiġenu waħda, il-kejliet isiru b'mod individwali. F'dan il-każ, id-diversi taħlitiet meħtieġa għat-test fid-drenaġġ sintetiku għandhom jiġu ppreparati iżda l-inokulu għandu jinżamm, u l-porzjonijiet meħtieġa ta' ħama għandhom jiżdiedu ma' kull reċipjent tas-serje. Kull inkubazzjoni għandha tinbeda sussegwentement, f'intervalli konvenjentement puntwali ta' eż. 10 sa 15-il minuta. Inkella, is-sistema ta' kejl tista' tinkludi diversi sondi li jiffaċilitaw kejliet multiplu simultanji; f'dan il-każ, l-inokulu jista' jiżdied fl-istess ħin ma' gruppi ta' reċipjenti xierqa.

37. Il-konċentrazzjoni tal-ħama attivata fit-taħlitiet tal-ittestjar, ta' referenza u inbjank kollha (iżda mhux ta' kontroll abijotiku) hija nominalment 1,5 g/l ta' solidi suspiżi. Il-konsum ta' ossiġenu għandu jitkejjel wara 3 sigħat ta' espożizzjoni. Għandhom isiru kejliet addizzjonali tal-espożizzjoni ta' 30 minuta kif xieraq u kif deskritt preċedentement fil-paragrafu 5.

Potenzjal ta' nitrifikazzjoni tal-ħama

38. Sabiex jiġi deċiż jekk il-ħama tinitrifikax u, jekk iva, b'liema rata, għandhom jiġu ppreparati taħlitiet (F_B) bħal fit-taħlitiet ta' kontroll inbjank u ta' 'kontroll' addizzjonali (F_N) li iżda fihom ukoll N-alliltjourea f'11,6 mg/l. It-taħlitiet għandhom jiġu arjati u inkubati f'20° ± 2 °C għal 3 sigħat. Imbagħad għandhom jitkejlu r-rata ta' teħid tal-ossiġenu u għandha tiġi kkalkolata r-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni.

Disinji tat-test

Test tas-sejba tal-medda

39. Meta jkun meħtieġ jintuża test preliminari, biex tiġi stmata l-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa f'test finali għad-determinazzjoni tal-inibizzjoni tal-konsum tal-ossiġenu. Inkella, in-nuqqas ta' inibizzjoni tal-konsum tal-ossiġenu mis-sustanza kimika tat-test f'test preliminarji jista' juri li test finali mhuwiex meħtieġ, iżda għandhom jiġu inklużi triplikati fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata tat-test preliminari (ġeneralment 1 000 mg/l, iżda li jiddependu fuq ir-rekwiżit tad-dejta).

Tabella 1

Eżempji ta' taħlitiet għat-test preliminari

Reaġent	Konċentrazzjoni Oriġinali				
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test	10 g/l				
Soluzzjoni ewlenija tal-midjum sintetiku	Ara l-paragrafu 16				
Sospensjoni ewlenija tal-ħama attivata	3 g/l solidi suspiżi				
Komponenti tat-taħlita	Dożaġġ f'reċipjenti tat-test ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml) (paragrafi 19 sa 21)	0,5	5	50	0	50
Soluzzjoni ewlenija tal-għalf ta' drenaġġ sintetiku (ml) (paragrafu 16)	16	16	16	16	16
Sospensjoni ta' ħama attivata (ml) (paragrafi 26 sa 29)	250	250	250	250	250
Ilma (paragrafu 15)	233,5	229	184	234	434
Volum totali tat-taħlitiet (ml)	500	500	500	500	500
Konċentrazzjonijiet fit-taħlita					
Sospensjoni tal-ittestjar (mg/l) Ħama attivata	10	100	1 000	0	1 000
(solidi sospiżi) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) L-istess proċedura għandha tiġi segwita għas-sustanza kimika ta' referenza, biex jiġu kkalkolati flasks F_{R1-3}

40. It-test għandu jitwettaq tal-inqas permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, pereżempju, 10 mg/l, 100 mg/l u 1 000 mg/l b'kontroll inbjank u, jekk ikun hemm bżonn, tal-inqas tliet kontrolli abjotiċi bl-ogħla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test (ara bħala eżempju t-Tabella 1). Idealment l-inqas konċentrazzjoni ma għandu jkollha l-ebda effett fuq il-konsum tal-ossiġenu. Għandhom jiġu kkalkolati r-rati ta' teħid ta' ossiġenu u r-rata ta' nitrifikazzjoni, jekk ikunu rilevanti; imbagħad għandu jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' inibizzjoni. Skont l-iskop tat-test, huwa possibbli wkoll li sempliċement tiġi ddeterminata t-tossiċità ta' konċentrazzjoni limitu, pereżemju 1 000 mg/l. Jekk ma jseħħ ebda effett tossiku statistikament sinifikanti f'din il-konċentrazzjoni, mhuwiex meħtieġ ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet ogħla jew inqas. Għandu jiġi nnotat li sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma, taħlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu ponderati direttament fir-reċipjenti tat-test. F'dan il-każ, il-volum riservat għas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test għandu jiġi sostitwit b'ilma tat-taħlit.

Test finali

Inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossiġenu

41. It-test għandu jitwettaq permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni mnaqqsa mit-test preliminari. Sabiex jinkisbu kemm l-NOEC kif ukoll l-EC_x (eż. l-EC_{50}), fil-biċċa l-kbira tad-drabi huma rakkomandati sitt kontrolli u ħames konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika b'ħames repliki. Il-kontroll abjotiku ma għandux bżonn jiġi ripetut jekk ma kien hemm ebda teħid tal-ossiġenu fit-test preliminari, iżda jekk iseħħ teħid sinifikanti, għandhom jiġu inklużi kontrolli abijotiċi għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Is-sensittività tal-ħama għandha tiġi vverifikata permezz tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol. Is-sensittività tal-ħama għandha tiġi vverifikata għal kull serje ta' testijiet, peress li s-sensittività hija magħrufa li tvarja. Fil-każijiet kollha, il-kampjuni huma rtirati mir-reċipjenti tat-test wara 3 sigħat, u 30 minuta addizzjonali jekk ikun meħtieġ, għall-kejl tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu fiċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossiġenu. Mid-dejta miġbura, jiġu kkalkolati r-rati ta' respirazzjoni speċifiċi tat-taħlitiet ta' kontroll u tal-ittestjar; imbagħad il-perċentwal tal-inibizzjoni jiġi kkalkolat mill-ekwazzjoni 7, hawn taħt.

Distinzjoni bejn inibizzjoni ta' respirazzjoni eterotropika u nitrifikazzjoni

42. L-użu ta' inibitur ta' nitrifikazzjoni speċifku, ATU, jippermetti l-valutazzjoni diretta tal-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq l-ossidazzjoni eterotropika, u billi titnaqqas ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza tal-ATU mir-rata ta' teħid totali (l-ebda ATU preżenti), jistgħu jiġu kkalkolati l-effetti fuq ir-rata ta' nitrifikazzjoni. Għandhom jiġu ppreparati żewġ settijiet ta' taħlitiet ta' reazzjoni skont id-disinji tal-ittestjar għall-EC_x jew l-NOEC deskritti fil-paragrafu 41, iżda barra minn hekk, l-ATU għandu jiżdied ma' kull taħlita ta' sett wieħed fil-konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg/l, li ntweriet li tinibixxi kompletament in-nitrifikazzjoni fil-ħama b'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi sa 3 000 mg/l (4). Ir-rati ta' teħid ta' ossiġenu għandhom jitkejlu wara l-perjodu ta' espożizzjoni; dawn il-valuri diretti jirrappreżentaw ir-respirazzjoni eterotropika biss, u d-differenzi bejn dawn ir-rati ta' respirazzjoni u dawk totali korrispondenti jirrappreżentaw in-nitrifikazzjoni. Imbagħad jiġu kkalkolati d-diversi gradi ta' inibizzjoni.

Kejl

43. Wara l-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni, għandu jiġi ttrasferit kampjun mill-ewwel reċipjent ta' arjazzjoni lejn iċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossiġenu (Fig. 1 tal-Appendiċi 2) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlula għandha titkejjel minnufih. Jekk tkun disponibbli sistema tal-elettrodi multipla, allura l-kejliet jistgħu jsiru b'mod simultanju. It-taħwid (permezz ta' kalamita mgħottija) huwa essenzjali fl-istess rata bħal meta l-elettrodu jiġi kkalibrat biex jiżgura li s-sonda tirrispondi b'dewmien minimu għall-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu li jinbidlu, u biex ikun jista' jitkejjel l-ossiġenu regolari u riproduċibbli fir-reċipjent tal-kejl. Ġeneralment, is-sistema tas-sonda li titħawwad awtomatikament ta' xi elettrodi tal-ossiġenu hija adegwata. Iċ-ċellola għandha titlaħlaħ bl-ilma bejn kull kejl. Inkella, il-kampjun jista' jintuża biex jimla flixkun BOD (Fig. 2 tal-Appendiċi 3) mgħammar b'ħawwad manjetiku. Imbagħad għandha tiddaħħal sonda tal-ossiġenu bi sleeve adaptor fl-għonq tal-flixkun u l-ħawwad manjetiku għandu jiġi attivat. Fiż-żewġ każijiet, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha titkejjel b'mod kontinwu u rreġistrata għal perjodu, ġeneralment 5 sa 10 minuti jew sakemm il-konċentrazzjoni taqa' taħt iż-2 mg/l. L-elettrodu għandu jitneħħa, it-taħlita terġa' titpoġġa fir-reċipjent tal-arjazzjoni u għandhom jitkomplew l-arjazzjoni u t-taħwid, jekk ikun meħtieġ kejl wara perjodi ta' espożizzjoni twal.

Verifika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

44. Għal xi finijiet, jaf ikun meħtieġ li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Wieħed għandu jinnota li jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta':

— sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma,

— taħlitiet b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti, jew

— sustanzi b'solubbiltà fl-ilma tajba, iżda fejn il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija tqarreb is-solubbiltà fl-ilma massima,

jintuża, il-parti maħlula hija magħrufa, u l-konċentrazzjoni reali tas-sustanza kimika tat-test li hija ttrasferita fir-reċipjenti tat-test mhijiex magħrufa. Sabiex tiġi kkaratterizzata l-espożizzjoni, hija meħtieġa stima analitika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Biex jiġu simplifikati l-kwistjonijiet, għandha ssir stima analitika qabel iż-żieda tal-inokulu. Minħabba l-fatt li l-frazzjonijiet maħlula biss sejrin jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla jistgħu jkunu baxxi ħafna.

45. Sabiex tiġi evitata analitika li tieħu l-ħin u li tiswa ħafna flus, huwa rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tiġi sempliċement ppeżata fir-reċipjenti tat-test u li ssir referenza għall-konċentrazzjoni nominali ponderata inizjali għal kalkoli sussegwenti. Mhijiex meħtieġa distinzjoni bejn frazzjonijiet maħlula, mhux maħlula jew adsorbiti tas-sustanza kimika tat-test peress li dawn il-frazzjonijiet kollha jidhru f'kundizzjonijiet reali f'impjant ta' trattament tal-ilma mormi bl-istess mod, u dawn il-frazzjonijiet jista' jvarjaw skont il-kompożizzjoni tad-drenaġġ. L-għan tal-metodu ta' ttestjar huwa li jagħti stima realistika tal-konċentrazzjoni inibitorja u mhuwiex xieraq biex jinvestiga fid-dettall liema frazzjonijiet jagħmlu kontribuzzjoni għall-inibizzjoni tal-organiżmi tal-ħama attivata. Fl-aħħar nett, is-sustanzi adsorbivi għandhom jintiżnu direttament ukoll fir-reċipjenti tat-test; u r-reċipjenti għandhom jiġu silanizzati biex jitnaqqas it-telf permezz ta' adsorbiment.

DEJTA U RAPPORTAR

Kalkolu tar-rati ta' teħid tal-ossiġenu

46. Ir-rati ta' teħid tal-ossiġenu għandhom jiġu kkalkolati mill-medja tal-valuri mkejla, perżempju minn parti lineari tal-graffs tal-konċentrazzjoni tal-ossiġenu meta mqabbel mal-ħin, billi jiġu limitati l-kalkoli tal-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu bejn 2,0 mg/l u 7,0 mg/l, peress li konċentrazzjonijiet ogħla u inqas jistgħu huma stess jinfluwenzaw ir-rati ta' konsum. Devjazzjoni minn dawn il-faxex ta' konċentrazzjoni taħt jew 'il fuq minn dawn il-valuri hija xi drabi inevitabbli u meħtieġa, pereżempju, meta r-respirazzjoni tkun imrażżna ħafna u konsegwentement bil-mod ħafna, jew jekk xi ħama attivata partikolari jkollha respirazzjoni mgħaġġla ħafna. Dan huwa aċċettabbli sakemm is-sezzjonijiet estiżi tal-graff tat-teħid huma dritti u l-gradjenti tagħhom ma jinbidlux peress li jgħaddu mil-limiti ta' 2,0 mg/l jew 7,0 mg/l O_2. Kwalunkwe sezzjoni mgħawġa tal-graff tindika li s-sistema ta' kejl qiegħda tistabbilizza jew ir-rata ta' teħid qiegħda tinbidel u ma għandhiex tintuża għall-kalkolu tar-rati ta' respirazzjoni. Ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu għandha tiġi espressa f'milligrammi għal kull litru fis-siegħa (mg/lh) jew milligrammi għall kull gramma ħama xotta fis-siegħa (mg/gh). Ir-rata ta' konsum tal-ossiġenu, R, f'mg/lh, tista' tiġi kkalkolata jew interpolata mill-parti lineari tal-graff ta' tnaqqis tal-ossiġenu rreġistrata skont l-Ekwazzjoni 1:

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

fejn:

Q_1 hija l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu fil-bidu tas-sezzjoni magħżula tal-fażi lineari (mg/l);

Q_2 hija l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu fi tmiem is-sezzjoni magħżula tal-fażi lineari (mg/l);

Δ_t huwa l-intervall ta' ħin bejn dawn iż-żewġ kejliet (min.).

47. Ir-rata ta' respirazzjoni speċifika (R_s) hija espressa bħala l-ammont ta' ossiġenu kkunsmat għal kull gramma ta' piż xott ta' ħama fis-siegħa (mg/gh) skont l-Ekwazzjoni 2:

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

fejn SS hija l-konċentrazzjoni tas-solidi suspiżi fit-taħlita tal-ittestjar (g/l).

48. L-indiċijiet differenti ta' R li jistgħu jingħaqdu flimkien huma:

S rata speċifika

T rata ta' respirazzjoni totali

N rata minħabba respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni

H rata minħabba respirazzjoni eterotropika

A rata minħabba l-proċessi abijotiċi

B rata bbażata fuq l-assaġġi inbjank (medja)

Kalkolu tar-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni

49. Ir-relazzjoni bejn ir-respirazzjoni totali (R_T), ir-respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni (R_N) u r-respirazzjoni eterotropika (R_H) tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 3:

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

fejn:

R_N hija r-rata ta' teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (mg/lh);

R_T hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu mill-kontroll inbjank (l-ebda ATU; F_B) (mg/lh).

R_H hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu tal-kontroll inbjank b'ATU miżjud (F_N) (mg/lh).

50. Din ir-relazzjoni hija valida għal valuri vojta (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), kontrolli abjotiċi (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) u assaġġi b'kimiċi ta' prova (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Rati ta' respirazzjoni speċifiċi huma kkalkolati minn:

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

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

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

51. Jekk R_N hija insinifikanti (eż. < 5 % ta' R_T f'kontrolli inbjanki) f'test preliminari, wieħed jista' jassumi li t-teħid tal-ossiġenu eterotrofiku huwa ugwali għat-teħid totali u li mhi qiegħda sseħħ ebda nitrifikazzjoni. Ikun meħtieġ sors alternattiv ta' ħama attivata, jekk it-testijiet kellhom jikkunsidraw l-effetti fuq il-mikro-organiżmi eterotrofiċi u nitrifikanti. Test finali jitwettaq jekk ikun hemm evidenza ta' rati ta' teħid tal-ossiġenu suppressi b'konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test differenti.

Kalkolu tal-perċentwal tal-inibizzjoni

52. Il-perċentwal tal-inibizzjoni, I_T, tal-konsum tal-ossiġenu totali f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 7:

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

53. Bl-istess mod, il-perċentwal ta' inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu eterotrofiku, I_H, f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 8:

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

54. Fl-aħħar nett, l-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni, I_N, f'kull konċentrazzjoni, tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 9:

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

55. Il-perċentwal tal-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu għandu jiġi pplottjat mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (kurva ta' inibizzjoni, ara Fig.3 tal-Appendiċi 4). Il-kurvi ta' inibizzjoni jiġu pplottjati għal kull perjodu ta' arjazzjoni ta' 3 sigħat jew addizzjonalment wara 30 minuta. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi t-teħid tal-ossiġenu sa 50 % (EC_{50}) għandha tiġi kkalkolata jew interpolata mill-graff. Jekk tkun disponibbli dejta xierqa, il-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % ta' EC_{50}, il-gradjent tal-kurva, jistgħu jiġu kkalkolati jew interpolati l-valuri xierqa biex jiġi mmarkat il-bidu tal-inibizzjoni (pereżempju, EC_{10} jew EC_{20}) u t-tmiem tal-medda ta' inibizzjoni (eż., EC_{80} jew EC_{90}).

56. Għandu jiġi nnotat li fid-dawl tal-varjabbiltà li ħafna drabi tiġi osservata fir-riżultati, f'ħafna każijiet jaf ikun suffiċjenti li r-riżultati jiġu espressi skont id-daqs, pereżempju:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l sa 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l sa 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Interpretazzjoni tar-riżultati

EC_x

57. Il-valuri EC_x inkluż il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi (11)). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

Stima NOEC

58. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tiddetermina l-NOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni (11). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'$p \leq 0{,}05$.

Rapport tal-ittestjar

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

Sustanza kimika tat-test

— isem komuni, isem is-sustanza kimika, numru CAS, purità;

— il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow}, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni possibbli dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, eż. adsorbiment mal-ħama attivata);

Sistema tat-test

— sors, kundizzjonijiet ta' operazzjoni tal-impjant ta' trattament tal-ilma mormi u l-influwent li jirċievi, il-konċentrazzjoni, it-trattament minn qabel u ż-żamma tal-ħama attivata;

Kundizzjonijiet tat-test

— it-temperatura tal-ittestjar, il-pH matul l-ittestjar u d-durata tal-fażi(jiet) ta' espożizzjoni;

Riżultati

— konsum speċifiku tal-ossiġenu tal-kontrolli (mg O_2/(g × h ta' ħama);

— id-dejta mkejla, il-kurva(i) ta' inibizzjoni u l-metodu għall-kalkolu ta' EC_{50};

— EC_{50} u, jekk ikun possibbli, 95 fil-mija tal-limiti ta' kunfidenza, possibbilment EC_{20}, EC_{80}; possibbilment NOEC u l-metodi statistiċi użati, jekk EC_{50} ma jistax jiġi ddeterminat;

— ir-riżultati għall-inibizzjoni totali, u jekk tkun meħtieġa eterotrofika u nitrifikanti;

— teħid ta' ossiġenu abijotiku fil-kontroll fiżikokimiku (jekk jintuża);

— l-isem tas-sustanza kimika ta' referenza u r-riżultati b'din is-sustanza kimika;

— l-osservazzjonijiet u d-devjazzjonijiet kollha mill-proċedura standard, li setgħu jinfluwenzaw ir-riżultat.

LETTERATURA

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

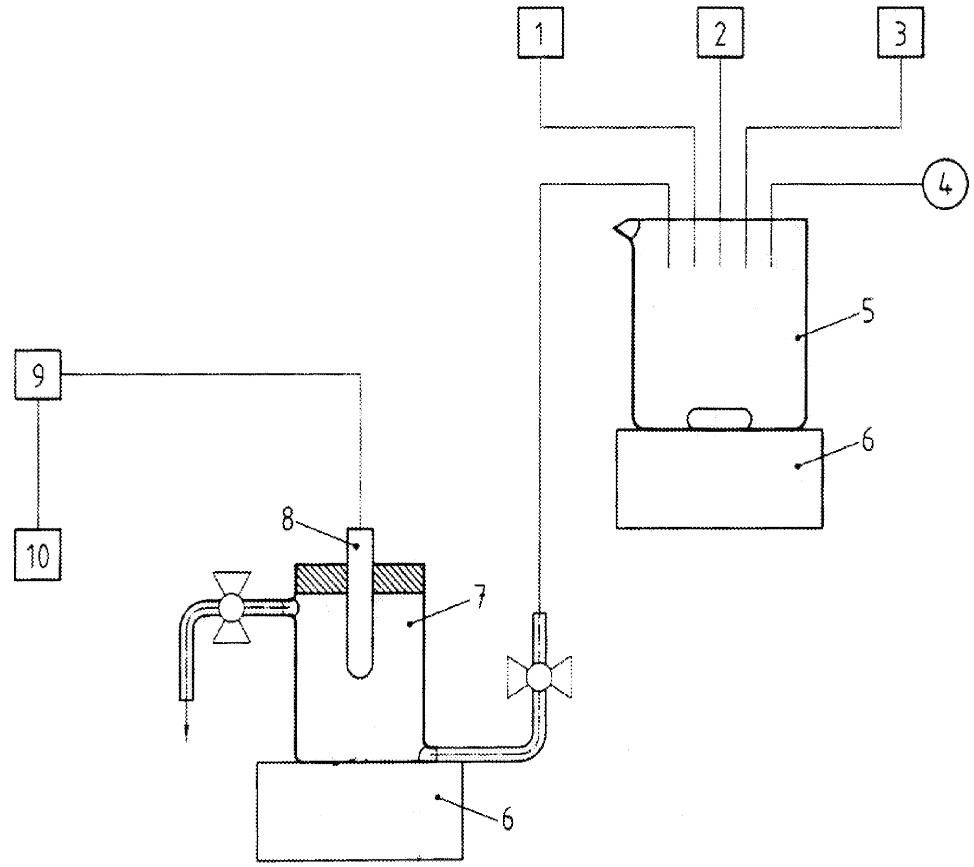
EC_x (**Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %**) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Fig. 1: **Eżempji għall-kejl tal-unità**

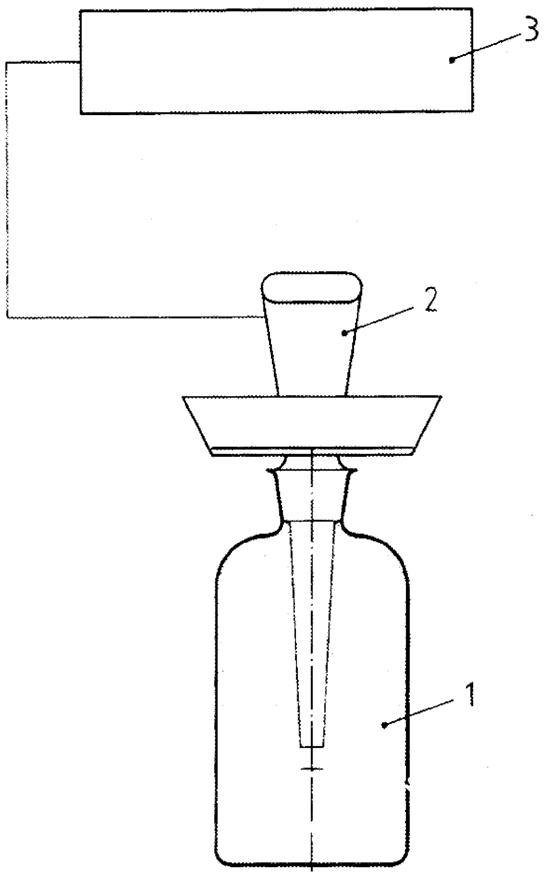


Spjega

1	ħama attivata	6	ħawwad manjetiku
2	midjum sintetiku	7	ċellola li tkejjel l-ossiġenu
3	sustanza kimika tat-test	8	elettrodu tal-ossiġenu
4	arja	9	strument li jkejjel l-ossiġenu
5	reċipjent tat-taħlit	10	reġistratur

Appendiċi 3

Fig. 2: **Eżempju tal-unità tal-kejl, permezz ta' flixkun BOD**



Spjega

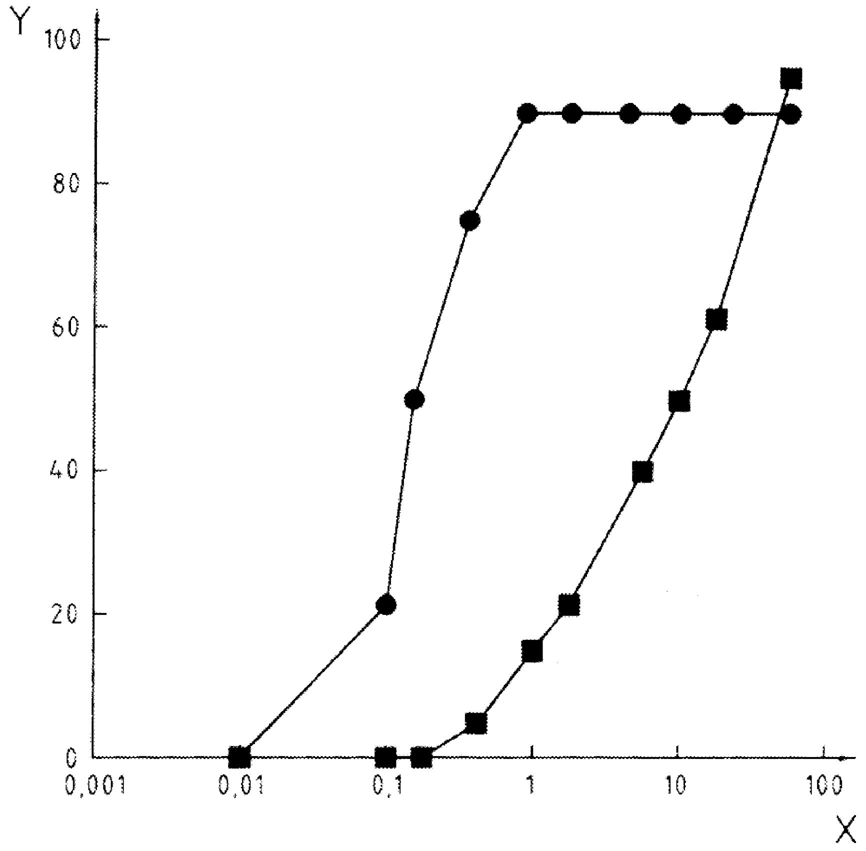
1 Reċipjent tal-ittestjar

2 elettrodu tal-ossiġenu

3 strument li jkejjel l-ossiġenu

Appendiċi 4

Fig. 3: **Eżempji ta' kurvi tal-inibizzjoni**



Spjega

X kronċentrazzjoni ta' 3,5-dichlorophenol (mg/l)

Y Inibizzjoni (%)

■ respirazzjoni eterotrofika tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti

● nitrifikazzjoni tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti"

(5) Il-Kapitolu C.26 huwa sostitwit ma' dan li ġej:

"C.26 **TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR TAL-ISPEĊI LEMNA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 221 tal-OECD (2006). Huwa maħsub biex jivvaluta t-tossiċità tas-sustanzi kimiċi lill-pjanti akkwatiċi tal-ilma ħelu tal-ġeneru *Lemna* (duckweed). Huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6) iżda jinkludi modifikazzjonijiet ta' dawn il-metodi biex tiġi riflessa r-riċerka riċenti u l-konsultazzjoni fuq għadd ta' kwistjonijiet ewlenin. Dan il-Metodu ta' Ttestjar ġie vvalidat minn ring test internazzjonali (7).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar tat-tossiċità permezz ta' *Lemna gibba* u *Lemna minor*, li t-tnejn intużaw b'mod estensiv u huma s-suġġett tal-istandards imsemmija hawn fuq. It-tassonomija ta' *Lemna* spp. hija diffiċli, peress li hija kkumplikata bl-eżistenza ta' firxa wiesgħa ta' fenotipi. Għalkemm tista' sseħħ varjabbiltà ġenetika fir-rispons għat-tossikanti b'*Lemna*, bħalissa hemm dejta insuffiċjenti dwar dan is-sors ta' varjabbiltà biex jiġi rakkomandat klonu speċifiku għall-użu ma' dan il-metodu ta' ttestjar. Ta' min jinnota li t-test ma jitwettaqx b'mod akseniku, iżda jittieħdu passi fi stadji matul il-proċedura tal-ittestjar biex il-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra tinżamm kemm jista' jkun baxxa.

3. Huma deskritti d-dettalji tal-ittestjar b'tiġdid (semistatiku u bi fluss kontinwu) u mingħajr tiġdid (statiku) tas-soluzzjoni tat-test. Skont l-objettivi tal-ittestjar u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' metodi semistatiċi u bi fluss kontinwu, eż. għal sustanzi kimiċi li jintilfu rapidament minn soluzzjoni bħala riżultat ta' volatilizzazzjoni, fotodegradazzjoni, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. F'(8) tingħata gwida ulterjuri.

4. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

5. Kulturi ta' pjanti li jikbru b'mod esponenzjali tal-ġeneru *Lemna* jistgħu jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test f'perjodu ta' sebat ijiem. L-objettiv tal-ittestjar huwa li jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi fuq it-tkabbir veġettativ matul dan il-perjodu abbażi ta' valutazzjonijiet tal-varjabbli ta' kejl magħżula. L-għadd ta' frondi huwa l-varjabbli ta' kejl primarju. Tal-inqas jitkejjel ukoll varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk), peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl oħra ħafna iktar mill-għadd ta' frondi. 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})

6. Dan il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli ta' kejl (rata ta' tkabbir speċifika medja) 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}).

7. Rispons varjabbli addizzjonali li jintuża f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun meħtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-varjabbli ta' kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitneħħa l-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. 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}).

8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

9. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku, b'sensittività adegwata għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-midjum tat-test.

10. Informazzjoni fuq is-sustanza kimika 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-solubbiltà fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-kostanti ta' Henry's Law, li sejrin jindikaw jekk huwiex probabbli telf sinifikanti fis-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tal-ittestjar. Dan sejjer jgħin biex jindika jekk għandhomx jittieħdu passi partikolari biex jiġi kkontrollat tali telf. Fejn l-informazzjoni dwar is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test mhijiex ċerta, huwa rakkomandat li dawn jiġu vvalutati fil-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri l-midjum tat-tkabbir, it-temperatura, ir-reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test.

11. Meta l-kontroll tal-pH tal-midjum tat-test ikun partikolarment importanti, eż. meta l-metalli jew is-sustanzi kimiċi tat-test li huma idrolitikament instabbli, hija rakkomandata żieda ta' bafer mal-midjum tat-tkabbir (ara paragrafu 21). Hija pprovduta gwida ulterjuri għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċli biex jiġu ttestjati fi (8).

VALIDITÀ TAT-TEST

12. Biex it-test ikun validu, iż-żmien tal-irdoppjar tal-għadd ta' frondi fil-kontroll għandu jkun inqas minn 2,5 jiem (60 siegħa), li jikkorrispondu għal żieda ta' bejn wieħed u ieħor seba' darbiet f'sebat ijiem u rata ta' tkabbir speċifika medja ta' 0,275 d^{-1}. Permezz tal-midjums u l-kundizzjonijiet tat-test deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, dan il-kriterju jista' jinkiseb permezz ta' reġim tal-ittestjar statiku (5). Huwa antiċipat ukoll li dan il-kriterju sejjer jintlaħaq f'kundizzjonijiet tat-test semistatiċi u bi fluss kontinwu. Il-kalkolu tal-ħin għall-irdoppjar huwa indikat fil-paragrafu 49.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

13. Is-sustanza (sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ring test internazzjonali (7), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' vverifikar tal-proċedura tat-test. Huwa rakkomandat li tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza tal-inqas darbtejn f'sena jew, fejn jitwettaq ittestjar bi frekwenza inqas, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

14. It-tagħmir kollu f'kuntatt mal-midjums tat-test għandu jkun magħmul mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti tal-ħġieġ li jintużaw għal finijiet ta' kulturi u ttestjar għandhom jitnaddfu minn kontaminanti kimiċi li jistgħu jinfiltraw fil-midjum tat-test u għandhom ikunu sterili. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu wisgħin biżżejjed għall-frondi ta' kolonji differenti fir-reċipjenti ta' kontroll biex jikbru mingħajr ma jikkoinċidu fi tmiem it-test. Ma tagħmilx differenza jekk l-għeruq imissx mal-qiegħan tar-reċipjenti tat-test, iżda huwa rakkomandat fond minimu ta' 20 mm u volum minimu ta' 100 mL f'kull reċipjent tat-test. L-għażla tar-reċipjenti tat-test mhijiex kritika sakemm jiġu sodisfatti dawn ir-rekwiżiti. Il-bekkijiet tal-ħġieġ, id-dixxijiet kristalizzanti jew id-dixxijiet tal-ħġieġ petri b'dimensjonijiet xierqa kollha rriżultaw adegwati. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew biex titnaqqas l-evaporazzjoni u l-kontaminazzjoni aċċidentali, filwaqt li jippermettu l-bdil tal-arja meħtieġ. Reċipjenti tal-ittestjar xierqa, u b'mod partikolari l-għotjien, għandhom jevitaw id-dell jew bidliet fil-karatteristiċi spettrali tad-dawl.

15. Il-kulturi u r-reċipjenti tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan jintlaħaq bl-aħjar mod permezz ta' kompartimenti, inkubaturi, jew kmamar ta' tkabbir ambjentali separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu kontrollabbli u miżmuma f'livell kostanti (ara l-paragrafi 35-36).

Organiżmu tat-test

16. L-organiżmu użat għal dan it-test huwa *Lemna gibba* jew *Lemna minor*. Fl-Appendiċi 2 jingħataw deskrizzjonijiet fil-qosor tal-ispeċijiet ta' duckweed li ntużaw għall-ittestjar tat-tossiċità. Il-materjal tal-pjanti jista' jinkiseb minn ġabra tal-kultura, laboratorju ieħor jew minn fuq il-post. Jekk jinġabru minn fuq il-post, l-impjanti għandhom jinżammu f'kultura fl-istess midjum kif użat għall-ittestjar għal minimu ta' tmien ġimgħat qabel l-użu. Is-siti tal-oqsma użati għall-ġbir tal-kulturi tal-bidu għandhom ikunu mingħajr sorsi ovvji ta' kontaminazzjoni. Jekk jinkisbu minn laboratorju jew ġbir ta' kultura ieħor, għandhom jinżammu bl-istess mod għal minimu ta' tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti l-ispeċi u l-klonu (jekk ikunu magħrufa) użati għall-ittestjar għandhom dejjem jiġu rrapportati.

17. Għandhom jintużaw monokulturi, li huma viżibbilment mingħajr kontaminazzjoni minn organiżmi oħra bħal algi u protozoa. Pjanti b'saħħithom ta' *L. minor* sejrin jikkonsistu minn kolonji li jinkludu bejn żewġ frondi u ħamsa filwaqt li kolonji b'saħħithom ta' *L. gibba* jista' jkun fihom sa seba' frondi.

18. Il-kwalità u l-unformità tal-pjanti użati għall-ittestjar sejjer ikollhom influwenza sinifikanti fuq l-eżitu tal-ittestjar u għandhom għalhekk jintgħażlu b'attenzjoni. Għandhom jintużaw pjanti żgħar li jikbru rapidament mingħajr leżjonijiet jew diskolorazzjoni (klorożi) evidenti. Kulturi ta' kwalità tajba huma indikati minn inċidenza għolja ta' kolonji li jinkludu tal-inqas żewġ frondi. Numru kbir ta' frondi uniċi huwa indikattiv ta' stress ambjentali, eż. limitazzjoni ta' nutrijenti, u ma għandux jintuża materjal ta' pjanti minn tali kulturi għall-ittestjar.

Kultivazzjoni

19. Biex titnaqqas il-frekwenza taż-żamma tal-kultura (eż. meta jkunu ppjanati testjiet ta' *Lemna* għal perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu f'illuminazzjoni u temperatura mnaqqsin (4 — 10 °C). Dettalji tal-kulturi jingħataw fl-Appendiċi 3. Sinjali ovvji ta' kontaminazzjoni minn algi jew organiżmi oħra jaf ikunu jeħtieġu sterilizzazzjoni tal-wiċċ ta' sottokampjun ta' frondi ta' *Lemna*, segwita minn trasferiment għal midjum ġdid (ara l-Appendiċi 3). F'din l-eventwalità, il-kultura kontaminata li jifdal għandha tintrema.

20. Tal-inqas sebat ijiem qabel l-ittestjar, biżżejjed kolonji jiġu ttrasferiti b'mod asettiku f'midjum sterili ġdid u kkulturati għal 7 — 10 ijiem f'kundizzjonijiet tat-test.

Midjum tat-test

21. Huma rakkomandati midjums differenti għal *Lemna minor* u *Lemna gibba*, kif deskritt hawn taħt. Għandha tingħata kunsiderazzjoni b'attenzjoni ta' bafer ta' pH fil-midjum tat-test (MOPS (aċidu sulfoniku ta' 4-morfolina-propan, Nru CAS: 1132-61-2) fil-midjum *L. minor* u $NaHCO_3$ fil-midjum *L. gibba*) meta jkun suspettat li dan jista' jkollu reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test u jinfluwenza l-espressjoni tat-tossiċità tagħha. Il-Midjum ta' Steinberg (9) huwa aċċettabbli wkoll sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

22. Hija rakkomandata modifikazzjoni tal-midjum ta' tkabbir Lemna tal-istandard Svediż (SIS) għall-kulturi u l-ittestjar b'L. minor. Fl-Appendiċi 4 tingħata l-kompożizzjoni ta' dan il-midjum.

23. Huwa rakkomandat il-midjum tat-tkabbir, 20X — AAP, kif deskritt fl-Appendiċi 4, għall-kulturi u l-ittestjar b'*L. gibba*.

24. Il-midjum Steinberg, kif deskritt fl-Appendiċi 4, huwa xieraq ukoll għal *L. minor*, iżda jista' jintuża wkoll għal *L. gibba* sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

Soluzzjonijiet tal-ittestjar

25. Is-soluzzjonjiet tal-ittestjar, ġeneralment jiġu ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test normalment jiġu ppreparati billi tinħall is-sustanza kimika fil-midjum tat-tkabbir.

26. Il-konċentrazzjoni l-iktar ogħla ttestjata tas-sustanza kimika tat-test ma għandhiex normalment taqbeż is-solubbiltà fl-ilma tas-sustanza kimika f'kundizzjonijiet tat-test. Madankollu għandu jiġi nnotat li *Lemna* spp. jżommu f'wiċċ l-ilma u jaf ikunu esposti għal sustanzi kimiċi li jinġabru bejn l-ilma u l-arja (eż. sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma jew idrofobiċi jew sustanzi kimiċi tensjoattivi). F'tali ċirkostanzi, sejjer ikun hemm espożizzjoni mill-materjal minbarra fis-soluzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu, skont il-karatteristiċi tas-sustanza kimika tat-test, jaqbżu, is-solubbiltà fl-ilma. Għas-sustanzi kimiċi tat-test ta' solubbiltà fl-ilma baxxa, jaf ikun meħtieġ li tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija kkonċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika permezz ta' solvent organiku jew aġent dispersiv sabiex tiġi ffaċilitata ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test mal-midjum tat-test u tiġi megħjuna fid-dispersjoni u x-xoljiment tagħha. Għandu jsir kull sforz possibbli biex jiġi evitat l-użu ta' tali materjali. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossiċità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 μl//l jinkludu aċetun u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv, għandha tiġi rrapportata l-konċentrazzjoni finali tiegħu li għandha tinżamm kemm jista' jkun baxxa (≤ 100 μl/l), u t-trattamenti u l-kontrolli kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv. F'(8) ingħatat gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi.

Gruppi tat-test u ta' kontroll

27. Għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lemna*, eż. minn test tas-sejba tal-medda, sejjer jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa. Fit-test finali tat-tossiċità, normalment għandu jkun hemm tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje ġeometrika. Preferibbilment il-fattur ta' separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma għandhomx ikunu ikbar minn 3,2, iżda jista' jintuża valur ikbar fejn il-kurva tal-konċentrazzjoni/rispons hija dritta. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Għandhom jintużaw tal-inqas tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test.

28. Fl-istabbiliment tal-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (għas-sejba tal-medda u/jew għat-test finali tat-tossiċità), għandu jiġi kkunsidrat li ġej:

— 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 stmati l-LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ma jkunx sinifikatament iktar baxx minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ikun ferm inqas milli fil-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-ogħla konċentrazzjoni tkun fil-limitu tas-solubbiltà jew il-konċentrazzjoni limitu meħtieġa massima, eż. 100 mg/l).

29. Kull test għandu jinkludi kontrolli li jikkonsistu mill-istess midjum ta' nutrijenti, in-numru ta' frondi u kolonji, il-kundizzjonijiet ambjentali u l-proċeduri bħar-reċipjenti tat-test iżda mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv awżiljari, għandu jiġi inkluż trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/aġent dispersiv preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħar-reċipjenti bis-sustanza kimika tat-test. In-numru ta' repliki tar-reċipjenti ta' kontroll (u r-reċipjenti tas-solventi, jekk ikun applikabbli) għandu tal-inqas ikun l-istess, u idealment darbtejn, in-numru ta' reċipjenti użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

30. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. Madankollu, in-numru ta' repliki ta' kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta.

Espożizzjoni

31. Kolonji li jikkonsistu minn 2 sa 4 frondi viżibbli huma ttrasferiti mill-kultura tal-inokulu u jiġu assenjati b'mod każwali għar-reċipjenti tat-test f'kundizzjonijiet asettiċi. Kull reċipjent tat-test għandu jkun fih total ta' 9 sa 12-il frond. In-numru ta' frondi u kolonji għandu jkun l-istess f'kull reċipjent tat-test. L-esperjenza miksuba b'dan il-metodu u d-dejta tar-ring test indikaw li l-użu ta' tliet repliki għal kull trattament, b'kull replikat li fil-bidu jkun fih 9 sa 12-il frond, huwa biżżejjed biex jiġu skoperti differenzi fit-tkabbir ta' madwar 4 sa 7 % tal-inibizzjoni kkalkolata mir-rata ta' tkabbir (10 sa 15 % ikkalkolata mir-rendiment) bejn it-trattamenti (7).

32. Huwa meħtieġ disinn aleatorju għal-lokazzjoni tar-reċipjenti tat-test fl-inkubatur biex titnaqqas l-influwenza tad-differenzi spazjali fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Huma meħtieġ ukoll disinn ibblokkjat jew ripożizzjonament każwali tar-reċipjenti meta jsiru l-osservazzjonijiet (jew ripożizzjonament iktar frekwenti).

33. Jekk test tal-istabbiltà preliminari juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tistax tinżamm (jiġifieri l-konċentrazzjoni mkejla taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) matul id-durata tat-test (7 ijiem), huwa rakkomandat reġim tal-ittestjar semistatiku. F'dan il-każ, il-kolonji għandhom ikunu esposti għal testijiet li għadhom kif jiġu ppreparati u s-soluzzjonijiet ta' kontroll f'tal-anqas żewġ okkażjonijiet matul it-test (eż. il-jiem 3 u 5). Il-frekwenza ta' espożizzjoni għal midjum ġdid sejra tiddependi fuq l-istabbilità tas-sustanza kimika tat-test; frekwenza ogħla jaf tkun meħtieġa biex jinżammu konċentrazzjonijiet viċin għall-kostanti ta' sustanzi kimiċi volatili u mhux stabbli ħafna. F'xi ċirkostanzi, jaf tkun meħtieġa proċedura bi fluss kontinwu (8)(10).

34. Ix-xenarju ta' espożizzjoni permezz ta' applikatur tal-weraq (sprej) mhuwiex kopert f'dan il-metodu ta' ttestjar; minflok, ara (11).

Kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni

35. Dawl kontinwu fluworexxenti sħun jew frisk għandu jintuża biex jipprovdi intensità tad-dawl magħżula minn għażla ta' 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ 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). Kwalunkwe differenza mill-intensità tad-dawl magħżula fl-erja tal-ittestjar ma għandhiex taqbeż il-medda ta' ± 15 %. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, sejjer jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taħt il-pjan ta' kejl) u s-sensers 'cosine' (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezzjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari ogħla, għal sors ta' dawl b'ħafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.

36. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' 24 ± 2 °C. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1 5 unitajiet matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' iktar minn 1,5 unità ma tinvalidax it-test meta jkun jista' jintwera li ġew sodisfatti l-kriterji ta' validità. Hija meħtieġa iktar attenzjoni f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux stabbli jew metalli. Ara (8) għal gwida ulterjuri.

Perjodu

37. It-test jintemm 7 ijiem wara li l-pjanti jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test.

Kejliet u determinazzjonijiet analitiċi

38. Fil-bidu tat-test, jingħadd u jiġi rreġistrat in-numru ta' frondi fir-reċipjenti tat-test, filwaqt li jiġi żgurat li jittieħed kont tal-frondi viżibbli b'mod evidenti li jisporġu 'l barra. In-numru ta' frondi li jidher normali jew anormali, jeħtieġ li jiġi ddeterminat fil-bidu tat-test, tal-inqas darba kull 3 ijiem matul il-perjodu ta' espożizzjoni (jiġifieri tal-inqas 2 okkażjonijiet matul il-perjodu ta' 7 ijiem) u fi tmiem ti-test. Għandhom jiġu nnotati l-bidliet fl-iżvilupp tal-impjant, eż. d-daqs tal-frond, id-dehra, l-indikazzjoni ta' nekrożi, klorożi jew gibbożità, it-tifrik ta' kolonja jew it-telf taż-żamma fil-wiċċ, u fit-tul u d-dehra tal-għeruq. Għandhom jiġu nnotati wkoll karatteristiċi sinifikanti tal-midjum tat-test (eż. preżenza ta' materjal mhux maħlul, tkabbir ta' algi fir-reċipjenti tat-test).

39. Minbarra d-determinazzjoni tan-numru ta' frondi matul it-test, huma vvalutati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq wieħed (jew iktar) mill-varjabbli ta' kejl li ġejjin:

(i) erja totali tal-frond,

(ii) piż xott,

(iii) piż frisk.

40. L-erja totali tal-frondi għandha vantaġġ, li tista' tiġi ddeterminata għal kull reċipjent tat-test u ta' kontroll fil-bidu, matul u fi tmiem it-test. Fil-bidu tal-ittestjar għandu jiġi ddeterminat il-piż xott jew frisk minn kampjun tal-kultura tal-inokulu li jirrappreżenta x'jintuża fil-bidu tat-test, u fi tmiem l-ittestjar bil-materjal tal-impjant minn reċipjent tat-test u ta' kontroll. Jekk ma titkejjilx l-erja tal-frond, il-piż xott huwa ppreferut mill-piż frisk.

41. L-erja totali tal-frond, il-piż xott u l-piż frisk jistgħu jiġu ddeterminati kif ġej:

(i) *Erja totali tal-frond*: L-erja totali tal-frond tal-kolonji kollha tista' tiġi ddeterminata b'analiżi tal-immaġnijiet. Tista' tittieħed il-forma tar-reċipjent tat-test u l-pjanti permezz ta' kamera bil-vidjo (jiġifieri billi r-reċipjent jitqiegħed fuq kaxxa tad-dawl) u l-immaġni li tirriżulta tiġi diġitizzata. Bil-kalibrazzjoni b'forom ċatti ta' erja magħrufa, tista' tiġi ddeterminata l-erja totali tal-frond f'reċipjent tat-test. Wieħed għandu joqgħod attent biex jeskludi interferenza kkawżata mir-rimm tar-reċipjent tat-test. Approċċ alternattiv iżda iktar impenjattiv huwa li jiġu fotokopjati r-reċipjenti tat-test u l-pjanti, tinqata' l-forma li tirriżulta tal-kolonji u tiġi ddeterminata l-erja tagħhom permezz ta' analizzatur tal-erja tal-weraq jew karta tal-graffs. Jaf ikunu xierqa wkoll tekniki oħra (eż. il-proporzjon tal-piż tal-karta bejn l-erja tas-siluwett tal-kolonji u l-unità tal-erja).

(ii) *Piż xott*: Il-kolonji kollha jinġabru minn kull wieħed mir-reċipjenti tat-test u jitlaħalħu b'ilma distillat jew dejonizzat. Dawn jiġu xxugati biex jitneħħa l-ilma żejjed u mbagħad jitnixxfu f'60 °C sa piż kostanti. Għandu jiġi inkluż kwalunkwe framment tal-għeruq. Il-piż xott għandu jiġi espress għal preċiżjoni ta' mill-anqas 0,1 mg.

(iii) *Piż frisk*: Il-kolonji kollha huma ttrasferiti għal tubi ta' polistiren (jew materjal inerti ieħor) li ntiżnu minn qabel b'toqob żgħar (1 mm) fil-qigħan tondi. Imbagħad it-tubi jiġu ċentrifugati f'3 000 rpm għal 10 minuti f'temperatura tal-ambjent. Tubi, li fihom kolonji li issa nixfu, jerġgħu jintiżnu u l-piż frisk jiġi kkalkolat billi jitnaqqas il-piż tat-tubu vojt.

Frekwenza tal-kejliet u d-determinazzjonijiet analitiċi

42. Jekk jintuża disinn ta' test statiku, għandha titkejjel il-pH ta' kull trattament fil-bidu u fi tmiem it-test. Jekk jintuża disinn tat-test semistatiku, il-pH għandha titkejjel f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test 'ġdid' qabel kull tiġdid u anki fis-soluzzjonijiet korrispondenti 'użati'.

43. L-intensità tad-dawl għandha titkejjel fil-kompartiment, l-inkubatur jew il-kamra tat-tkabbir f'punti li jinsabu fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-frondi *Lemna*. Il-kejliet għandhom isiru tal-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-midjum f'reċipjent surrogat miżmum fl-istess kundizzjonijiet fil-kompartiment tat-tkabbir, l-inkubatur jew il-kamra għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum.

44. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma ddeterminati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiċi, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fi tmiem it-test.

45. F'testijiet semistatiċi li fihom il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija li tibqa' fi ħdan l-± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, huwa meħtieġ li jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test li għadhom kif jiġu ppreparati u l-istess soluzzjonijiet f'kull tiġdid (ara l-paragrafu 33). Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test hija fi ħdan l-± 20 % tan-nominali iżda fejn tista' tingħata biżżejjed evidenza biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma repetibbli u stabbli (jiġifieri fi ħdan il-medda 80 — 120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla jew l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test qabel it-tiġdid għandha ssir biss fuq reċipjent tar-replikat wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura mir-replikat).

46. Jekk jintuża test bi fluss kontinwu, reġim ta' kampjunar simili għal dak deskritt għat-testijiet semistatiċi, inkluż analiżi fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem it-test, huwa xieraq, iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet użati mhuwiex xieraq f'dan il-każ. F'dan it-tip ta' test, ir-rata ta' fluss tad-dilwent u s-sustanza kimika tat-test jew is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ċċekkjati kuljum.

47. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan il-konċentrazzjoni ta' ± 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla ma tkunx fi ħdan il-medda ta' ± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (8).

Test tal-limitu

48. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew konċentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat ħafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità deskritti preċedentement kollha għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom jiġu dduplikati. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-midjums, eż. Test-t ta' Student.

DEJTA U RAPPORTAR

Ħin għall-irdoppjar

49. Biex jiġi ddeterminat il-ħin għall-irdoppjar (T_d) tan-numru ta' frondi u l-konformità ma' dan il-kriterju ta' validità mill-istudju (paragrafu 12), tintuża l-formola li ġejja b'dejta miksuba mir-reċipjenti ta' kontroll:

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

fejn µ hija r-rata ta' tkabbir speċifika medja ddeterminata kif deskritt fil-paragrafi 54-55.

Varjabbli ta' rispons

50. Il-fini tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv ta' *Lemna*. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi żewġ fatturi ta' rispons, peress li ġurisidizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u ħtiġijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisdizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) *Rata ta' tkabbir speċifika medja*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi tan-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi ta' parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) maż-żmien (espress għal kull jum) fil-kontrolli u kull grupp ta' trattament. Xi drabi jissejjaħ bħala r-rata ta' tkabbir relattiva (12).

(a) *Rendiment*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fin-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament sa tmiem it-test.

51. Għandu jiġi nnotat li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. 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 jiġi interpretat bħala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda sempliċement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kunċett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tad-duckweed f'kulturi mhux limitati, fejn it- tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-pendil tal-kurva tal-konċentrazzjoni/rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendimentjiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra 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 ir-rispons varjabblima għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' duckweedjew anki kloni differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika għall-istima tat-tossiċità hija xjentifikament ppreferuta, l-istimi tat-tossiċità ibbażati fuq ir-rendiment huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu ta' Ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti regolatorji attwali f'xi ġurisdizzjonijiet.

52. L-istimi tat-tossiċità għandhom ikunu bbażati fuq in-numru ta' frondi u fuq varjabbli ta' kejl addizzjonali wieħed (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl oħra ħafna iktar min-numru ta' frondi. L-effett ma jiġix identifikat bil-kalkolu tan-numru ta' frondi biss.

53. In-numru ta' frondi, kif ukoll kwalunkwe varjabbli ta' kejl irreġistrat ieħor, jiġifieri l-erja totali tal-frondi, il-piż xott jew il-piż frisk, huma tabulati flimkien mal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għal 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.

Rata ta' tkabbir speċifika medja

54. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tat-tkabbir — in-numru tal-frondi u varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) — permezz tal-formola ta' hawn taħt għal kull replikat ta' kontroll u t-trattamenti:

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

fejn:

— μ_{i-j}: rata ta' tkabbir speċifika medja mill-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 u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

55. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-ħin 'i' fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin 'j' huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza. Barra minn hekk, għandha tiġi vvalutata r-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu matul il-perjodu ta' espożizzjoni (eż. billi jiġu spezzjonati l-kurvi ta' tkabbir ittrasformati mil-log). Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir. F'dan il-każ, approċċ konservattiv ikun li jitqabblu rati ta' tkabbir speċifiċi minn kulturi ttrattati matul il-perjodu tal-ħin tal-inibizzjoni massima għal dawk għall-kontrolli matul l-istess perjodu ta' żmien.

56. 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: inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;

— μ_C: valur medju għal μ fil-kontroll

— μ_T: valur medju għal μ fil-grupp ta' trattament

Rendiment

57. L-effetti fuq ir-rendiment huma ddeterminati abbażi ta' żewġ varjabbli ta' kejl, in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) preżenti f'kull reċipjent tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test. Għal piż xott jew piż frisk, il-bijomassa tal-bidu hija ddeterminata abbażi ta' kampjun tal-frondi meħud mill-istess lott użat biex jiġu inokulati r-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafu 20). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. L-inibizzjoni perċentwali medja fir-rendiment (%I_y) tista' tiġi kkalkolata għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

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

fejn:

— % I_y: tnaqqis perċentwali 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

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni rispons

58. Għandhom jiġu pplottjat kurvi konċentrazzjoni rispons relatati mal-inibizzjoni perċentwali tal-varjabbli ta' rispons (I_r, jew I_y ikkalkolati kif indikati fil-paragrafu 56 jew 57) u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test.

Estimi ta' EC_x

59. 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 huwa minħabba li hemm sustanzi kimiċi tat-test li jaffettwaw in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (numru ta' frond); E_rC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk); E_yC_x (numru ta' frond); u E_yC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk).

Proċeduri ta' statistika

60. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analiżi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppeżata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — eż. f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (13), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (13). Għandu jiġi nnotat li metodi standard ta' analiżi permezz ta' trasformati ta' probit, logiit jew Weibull huma maħsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar ir-rata ta' tkabbir jew ir-rendiment. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn data kontinwa jistgħu jinstabu f'(14), (15), u (16).

61. 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 ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqgħod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.

62. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (17), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-data.

63. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha mbagħad titqabbel mal-medja ta' kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test ta' tendenza. It-test ta' Dunnett jew ta' Williams jista' jkun utili (18)(19)(20)(21). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treġġix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (22). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. F'(16) tista' tinstab gwida addizzjonali li tiddetermina l-NOEC.

64. 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 it-test ta' *Lemna*. 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.

Rapportar

65. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tal-ittestjar:

— natura fiżika u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluż il-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

— isem xjentifiku, klonu (jekk ikun magħruf) u sors.

Kundizzjonijiet tal-ittestjar:

— proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);

— id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;

— midjum tat-test;

— deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: reċipjenti u għotjien tat-test, volumi ta' soluzzjonijiet, numru ta' kolonji u frondi għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni;

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew aġent dispersiv;

— temperatura matul it-test;

— sors ta' dawl, intensità tad-dawl u omoġenità;

— valuri tal-pH tal-midjums tat-test u ta' kontroll;

— konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u l-metodu tal-analiżi b'dejta ta' valutazzjoni tal-kwalità xierqa (studji ta' validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti ta' kunfidenza tal-analiżijiet);

— metodi għad-determinazzjonijiet tan-numru ta' frondu u varjabbli ta' kejl oħrajn, eż. piż xott, piż frisk jew erja tal-frond;

— id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Riżultati:

— dejta mhux ipproċessata: numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl oħra f'kull reċipjent tat-test u ta' kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni ta' analiżi;

— medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;

— kurvi ta' tkabbir għal kull konċentrazzjoni tat-test (rakkomandati b'varjabbli ta' kejl ittrasformati bil-log, ara l-paragrafu 55);

— ħin għall-irdoppjar/rata ta' tkabbir fil-kontroll abbażi tan-numru ta' frondi;

— il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;

— rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-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 ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;

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

— kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament;

— kwalunkwe sinjal viżwali tal-fitotossiċità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

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

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

(4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) Organizzazzjoni Internazzjonali għall-Istandardizzazzjoni (International Organization for Standardization.). ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 18. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

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

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

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

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

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

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(22) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-finijiet ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet u l-abbrevazzjonijiet li ġejjin:

Il-**bijomassa** hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-għadd ta' frondi jew l-erja tal-frondi, ġeneralment jitkejlu u għalhekk l-użu tat-terminu 'bijomassa' jirreferi għal dawn il-kejliet ta' surrogati wkoll.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Klorożi hija s-sfurija tat-tessut ta' frond.

Klonu huwa organiżmu jew ċellola li nħolqot minn individwu singolu b'riproduzzjoni asseswali. Għalhekk, l-individwi mill-istess klonu huma ġenetikament identiċi.

Kolonja tfisser aggregat ta' frondi ommijiet u bniet (ġeneralment 2 sa 4) imwaħħla ma' xulxin. Xi drabi jissejħu pjanta.

EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test maħlula fil-midjum tat-test li tirriżulta f'tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir ta' *Lemna* f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissemma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). 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. E_rC (għadd ta' frond).

Bi fluss kontinwu huwa test fejn is-soluzzjonijiet tat-test jiġu ssostitwiti b'mod kontinwu.

Frond huwa struttura individwali/unika 'qisha werqa' ta' pjanta duckweed. Hija l-iżgħar unità, jiġifieri individwu, li jista' jirriproduċi.

Gibbożità tfisser frondi li huma mħattbin jew minfuħin.

Tkabbir hija żieda fil-varjabbli ta' kejl, eż. numru ta' frondi, piż xott, piż imxarrab, jew erja tal-frondi, matul il-perjodu tal-ittestjar.

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

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir (b'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Varjabbli ta' kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li jitkejlu biex jiġi espress il-punt ta' tmiem tal-ittestjar permezz ta' varjabbli ta' rispons differenti wieħed jew iktar. F'dan il-metodu, in-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż xott huma varjabbli ta' kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta waħda.

Nekrożi huwa tessut ta' frond mejjet (jiġifieri abjad jew imxarrab fl-ilma).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC.

Fenotip huma l-karatteristiċi osservabbli ta' organiżmu ddeterminati mill-interazzjoni tal-ġeni tiegħu mal-ambjent tiegħu.

Il-varjabbli ta' rispons huma varjabbli għall-istima tat-tossiċità derivati minn kwalunkwe parametru mkejjel li jiddeskrivi l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-Metodu ta' Ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-varjabbli ta' kejl bħan-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk jew il-piż xott.

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Sustanza kimika tat-test hija sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li sejjer jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wieħed jew iktar.

Midjum tat-test huwa midjum ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test sejra tinħall fil-midjum tat-test.

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni.

Appendiċi 2

Deskrizzjoni ta' *Lemna* spp.

Il-pjanta akkwatika, li komunement tissejjaħ duckweed, *Lemna* spp., tagħmel parti mill-familja Lemnaceae li għandha numru ta' speċijiet mad-dinja kollha f'erba' ġeneri. Id-dehra u t-tassonomija differenti tagħhom ġew deskritt b'mod eżawrjenti (1)(2). *Lemna gibba* u *L. minor* huma speċijiet rappreżentattivi ta' erjas b'temperatura moderata u huma komunement użati għal testijiet ta' tossiċità. Iż-żewġ speċijiet għandhom fergħa (frond) diskojdi li żżomm ril-wiċċ jew mgħaddsa u għerq irqiq ħafna ħiereġ miċ-ċentru tal-wiċċ ta' isfel ta' kull frond. *Lemna* spp. rarament jipproduċu fjuri u l-pjanti jirriproduċu billi veġetattivament jipproduċu frondi ġodda (3). Meta mqabbla ma' pjanti li għandhom iktar żmien, iż-żgħar għandhom tendenza li jkunu iktar ċari, ikollhom għeruq iqsar u jikkonsistu minn tnejn sa tliet frondi b'qisien differenti. Id-daqs żgħir tal-*Lemna*, l-istruttura sempliċi, ir-riproduzzjoni asseswali u l-ħin ta' ġenerazzjoni qasir tagħha jagħmlu l-pjanti ta' dan il-ġeneru adattati ħafna għall-ittestjar fil-laboratorju (4)(5).

Minħabba l-varjazzjoni probabbli bejn l-ispeċijiet fis-sensittività, huma validi biss paraguni ta' sensittività fi ħdan speċi.

Eżempji ta' speċijiet ta' *Lemna* li ntużaw għall-ittestjar: Referenza għall-Ispeċijiet

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sources of *Lemna* species

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

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

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 3

Żamma tal-kultura ewlenija

Koltivazzjonijiet ikkonċentrati jistgħu jiġu miżmuma f'temperaturi iktar baxxi (4-10 °C) għal żmien itwal mingħajr il-bżonn li jerġgħu jsiru mill-ġdid. Il-midjum ta' tkabbir ta' *Lemna* jista' jkun l-istess bħal dak għall-ittestjar iżda jistgħu jintużaw midjums rikki fin-nutrijenti oħra għall-kulturi ewlenin.

Perjodikament, numru ta' pjanti ħodor ċari, żgħar jitpoġġew f'kontenituri tal-kultura li fihom midjum ġdid permezz ta' teknika aseptika. Fil-kundizzjonijiet iktar keshin issuġġeriti hawnhekk, jistgħu jitwettqu sottokulturi f'intervalli sa tliet xhur.

Għandhom jintużaw reċipjenti tal-kulturi tal-ħġieġ kimikament nodfa (maħsula bl-aċidu) u sterilizzati kif ukoll tekniki ta' mmanniġġar asettiċi. Fil-każ ta' kontaminazzjoni tal-kultura ewlenija, eż. b'algi jew fungi, huma meħtieġa passi biex jiġu eliminati l-organiżmi kontaminanti. Fil-każ ta' algi u l-biċċa l-kbira ta' organiżmi kontaminanti oħra, dan jista' jintlaħaq bl-isterilizzazzjoni tal-wiċċ. Jittieħed kampjun tal-materjal tal-pjanta kkontaminat u l-għeruq jinqatgħu. Il-materjal imbagħad jitħawwad bis-saħħa f'ilma nadif, segwit minn immersjoni f'soluzzjoni ta' 0,5 % (v/v) ipoklorit tas-sodju għal bejn 30 sekonda u 5 minuti. Imbagħad il-materjal tal-pjanta jitlaħlaħ b'ilma sterili u jiġi ttrasferit, bħala numru ta' lottijiet, f'reċipjenti ta' kulturi li fihom midjum tat-tkabbir frisk. Ħafna mill-frondi sejrin imutu bħala riżultat ta' dan it-trattament, speċjalment jekk jintużaw perjodi ta' espożizzjoni itwal, iżda xi wħud minn dawk li jibqgħu ħajjin ġeneralment sejrin ikunu ħielsa mill-kontaminazzjoni. Imbagħad dawn jistgħu jintużaw biex jerġgħu jinokulaw kulturi ġodda.

Appendiċi 4

Midjums

Huma rakkomandati midjums ta' tkabbir differenti għal *L. minor* u *L. gibba*. Għal *L. minor*, huwa rakkomandat midjum ta' Standard Svediż (SIS) immodifikat filwaqt li għal *L. gibba*, huwa rakkomandat midjum 20X AAP. Il-kompożizzjonijiet taż-żewġ midjums jingħataw hawn taħt. Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reaġent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir *Lemna* ta' Standard Svediż (SIS)

— Soluzzjonijiet ikkonċentrati I — V huma sterilizzati b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15-il minuta) jew b'tisfija minn membrana (b'daqs tal-pori ta' ċirka 0,2 μm).

— L-Istokk VI (u b'mod fakultattiv VII) jiġu sterlizzati bil-filtrazzjoni tal-membrana biss; dawn ma għandhiex issirilhom awtoklavazzjoni.

— Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. L-Istokkijiet I — V għandhom jintremew wara sitt xhur filwaqt li l-istokkijiet VI (u b'mod fakultattiv VII) għandhom żmien tal-ħżin ta' xahar.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/l)	Konċentrazzjoni f'midjums imħejjija (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	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
	$CuSO_4. 5H_2O$	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 (bafer)	490	490	—	—

Biex tħejji litru ta' midjum SIS, dan li ġej jiżdied ma' 900 ml ta' ilma dejonizzat:

— 10 ml ta' soluzzjoni ewlenija I

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija II

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija III

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija IV

— 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija V

— 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija VI

— 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija VII (fakultattiva)

Nota: Soluzzjoni ewlenija oħra VII (buffer MOPS) jaf tkun meħtieġa għal ċerti sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafu 11).

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 ewlenin jiġu ppreparati f'ilma distillat jew dejonizzat sterilizzat.

Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. F'dawn il-kundizzjonijiet, is-soluzzjonijiet ewlenin sejrin ikollhom żmien tal-ħżin ta' mill-anqas 6 — 8 ġimgħat.

Jiġu ppreparati ħames soluzzjonijiet ewlenin tan-nutrijenti (A1, A2, A3, B u C) għal midjum 20X — AAP, permezz ta' sustanzi kimiċi tal-grad tar-reaġenti. L-20 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija tan-nutrijenti jiżdied ma' madwar 850 ml ta' ilma dejonizzat biex jiġi prodott il-midjum tat-tkabbir. Il-pH huwa aġġustat għal 7,5 ± 0,1 b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustati għal litru b'ilma dejonizzat. Il-midjum imbagħad jiġi ffiltrat permezz ta' (madwar) 0,2 μm tal-filtru tal-membrani f'kontenitur sterilizzat.

Il-midjum tat-tkabbir maħsub għall-ittestjar għandu jiġi ppreparat 1-2 jum qabel l-użu biex iħalli lill-pH jistabbilizza. Il-pH tal-midjum tat-tkabbir għandu jiġi ċċekkjat qabel l-użu u jerġa' jiġi aġġustat biż-żieda ta' 0,1 jew 1 mol NaOH jew HCl kif deskritt hawn fuq.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/•l) (*)	Konċentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l) (*)
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	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2{\cdot}O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/•l) (*)	Konċentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/•l)	Midjum imħejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/•l) (*)
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	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) Sakemm mhux innotat

Nota: Il-konċentrazzjoni finali teoretikament xierqa tal-bikarbonat (li tevita aġġustament apprezzabbli tal-pH) hija mhux 300 mg/L. Madankollu, l-użu storiku ta' midjum 20X-AAP, inkluż ir- ring test għal din il-linja gwida, 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 (Wara l-ISO 20079)

Konċentrazzjoni u soluzzjonijiet ewlenin

Il-midjum Steinberg immodifikat jintuża f'ISO 20079 għal *Lemna* minuri waħdu (peress li hemm *Lemna minor* biss huwa permess) iżda t-testijiet urew li jistgħu jintlaħqu riżultati tajba b'*Lemna gibba* wkoll.

Meta tipprepara l-midjum, għandhom jintużaw reaġent jew sustanzi kimiċi tal-grad analitiku u ilma dejonizzat.

Ipprepara l-midjum tal-nutrijenti mis-soluzzjonijiet ewlenin k jew il-midjum ikkonċentrat ta' 10 darbiet il-konċentrazzjoni massima tal-midjum mingħajr preċipitazzjoni.

Tabella 1

Midjum STEINBERG stabbilizzat bil-pH (immodifikat skont Altenburger)

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
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

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
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 Disodju-diidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin (Makroelementi)

1. Makroelementi (ikkonċentrati għal 50 darba)	**g/l**
Soluzzjoni ewlenija 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzzjoni ewlenija 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzzjoni ewlenija 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzzjonijiet ewlenin (Mikroelementi)

2. Mikrolementi (ikkonċentrati għal 1 000 darba)	**mg/l**
Soluzzjoni ewlenija 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzzjoni ewlenija 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzzjoni ewlenija 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0

2. Mikrolementi (ikkonċentrati għal 1 000 darba)	**mg/l**
Soluzzjoni ewlenija 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzzjoni ewlenija 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA Disodju-diidrat	1 500,00

— Is-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 3 u b'mod separat 4 sa 7 jiistgħu jiġu raggruppati (filwaqt li jitqiesu l-konċentrazzjonijiet meħtieġa).

— Għal żmien tal-ħżin itwal ittratta s-soluzzjonijiet ewlenin f'awtoklava f'121 °C għal 20 minuta jew inkella wettaq filtrazzjoni sterilizzata (0,2 μm). Għas-soluzzjoni ewlenija 8 hija rakkomandata ħafna filtrazzjoni sterili (0,2 μm).

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni finali tal-midjum STEINBERG (immodifikat)

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat biex tevita preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3).

— Il-pH għandu jkun 5,5 +/– 0,2 (aġġusta b'żieda ta' volum minimizzat ta' soluzzjoni NaOH jew HCl).

— Aġġusta bl-ilma għal 1 000 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).

Il-preparazzjoni ta' midjum STEINBERG b'konċentrazzjoni ta' 10 darbiet (immodifikat) għal ħżin intermedju

— Żid 20 ml soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 30 ml ta' ilma biex tevita preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3). Aġġusta bl-ilma għal 100 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).

— Il-pH tal-midjum (konċentrazzjoni finali) għandha tkun 5,5 ± 0,2."

(6) Huma miżjuda l-Kapitoli C.31 sa C.46 li ġejjin:

"C.31. **TEST TAL-PJANTA TERRESTRI: TFAĊĊJAR TAN-NEBBIET U TEST TAT-TKABBIR TAN-NEBBIET**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tal-Ittestjar (TG) 208 tal-OECD (2006). Il-metodi tal-ittestjar jiġu perjodikament irriveduti fid-dawl tal-progress xjentifiku u l-applikabbiltà għall-użu regolatorju. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat huwa maħsub biex jivvaluta l-effetti potenzjali tas-sustanzi kimiċi fuq it-tfaċċar u t-tkabbir tan-nebbiet. Bħala tali ma jkoprix l-effetti kroniċi jew l-effetti fuq ir-riproduzzjoni (jiġifieri sett ta' żrieragħ, il-formazzjoni tal-fjura, maturazzjoni tal-frott). Il-kundizzjonijiet tal-espożizzjoni u proprjetajiet tas-sustanza kimika li għandha tiġi ttestjata għandhom jiġu kkunsidrati biex jiżguraw li jintużaw metodi ta' ttestjar xierqa (eż. meta jiġu ttestjati metalli/komposti tal-metall, għandhom jiġu kkunsidrati l-effetti tal-pH u l-kontrojoni assoċjati) (1). Dan il-metodu ta' ttestjar ma għandux jindirizza l-pjanti esposti għal fwar tas-sustanzi kimiċi. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ġenerali, il-bijoċidi u l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (magħrufa wkoll bħala l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti jew il-pestiċidi). Dan ġie żviluppat abbażi tal-metodi eżistenti (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kienu kkunsidrati wkoll referenzi oħra pertinenti għall-ittestjar tal-pjanti (8) (9) (10). Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

2. It-test jivvaluta l-effetti fuq it-tfaċċar tan-nebbiet u t-tkabbir bikri ta' pjanti ogħla wara espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (jew matriċi tal-ħamrija xierqa oħra). Iż-żrieragħ jitqiegħdu f'kuntatt ma' ħamrija trattata bis-sustanza kimika tat-test u evalwata għall-effetti li ġejjin normalment 14-21 jum wara 50 % ħolqien tan-nebbieta fil-grupp ta' kontroll. Il-punti ta' tmiem imkejla huma valutazzjoni viżwali tal-ħolqien tan-nebbieta, piż tan-nebbieta niexfa (inħejja piż tan-nebbieta frisk) u f'ċerti każijiet l-għoli tan-nebbieta, kif ukoll valutazzjoni tal-effetti detrimentali viżibbli f'partijiet differenti tal-pjanta. Dawn il-kejliet u osservazzjonijiet jitqabblu ma' dawk ta' pjanti ta' kontroll mhux ittrattati.

3. Skont ir-rotta mistennija tal-espożizzjoni, is-sustanza kimika tat-test hija inkorporata fil-ħamrija (jew possibbilment f'matriċi tal-ħamrija artifiċjali) jew applikata mal-wiċċ tal-ħamrija, li tirrappreżenta b'mod xieraq ir-rotta potenzjali tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika. L-inkorporazzjoni tal-ħamrija ssir billi tiġi ttrattata l-ħamrija aggregata. Wara l-applikazzjoni, il-ħamrija tiġi ttrasferita fil-qsari, u mbagħad żrieragħ tal-ispeċi tal-pjanti partikolari jinżergħu fil-ħamrija. L-applikazzjonijiet fuq il-wiċċ isiru f'ħamrija fil-qsari fejn diġa nżergħu ż-żrieragħ. L-unitajiet tal-ittestjar (kontrolli u ħamriji ttrattati flimkien maż-żrieragħ) imbagħad jitqiegħdu f'kundizzjonijiet xierqa biex tiġi appoġġjata l-ġerminazzjoni/tkabbir tal-pjanti.

4. It-test jista' jitwettaq sabiex tiġi ddeterminata l-kurva ta' doża-rispons, jew konċentrazzjoni/rata unika bħala test tal-limitu skont l-għan tal-istudju. Jekk ir-riżultati mit-test tal-konċentrazzjoni/rata jaqbżu ċertu livell ta' tossiċità (eż. jekk jiġu osservati effetti ikbar minn x %), jitwettaq test tas-sejba tal-medda biex jiġu ddeterminati l-limiti superjuri u inferjuri għat-tossiċità segwiti minn test tal-konċentrazzjoni/rata biex tiġi ġġenerata kurva ta' doża-rispons. Analiżi statistika xierqa tintuża biex tinkiseb konċentrazzjoni EC_x effikaċi jew rata ta' applikazzjoni effikaċi ER_x (eż. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) għall-parametru/parametri l-iktar sensittivi ta' interess. Barra minn hekk, f'dan it-test tista' tiġi kkalkolata l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u l-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. L-informazzjoni li ġejja hija utli għall-identifikazzjoni tar-rotta mistennija tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika u fit-tfassil tat-test: il-formula strutturali, il-purità, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fis-solventi organiċi, il-koeffiċjent tal-partizzjoni 1-ottanol/ilma, l-imġiba tas-sorbiment tal-ħamrija, il-pressjoni tal-fwar, l-istabbiltà kimika fl-ilma u d-dawl, u l-bijodegradabbiltà.

VALIDITÀ TAT-TEST

6. Sabiex it-test jiġi kkunsidrat validu, il-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati fil-kontrolli:

— it-tfaċċar ta' nebbietahuwa tal-inqas 70 %;

— in-nebbieta ma jurux effetti fitotossiċi viżibbli (eż. klorożi, nekrożi, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u zkuk) u l-pjanti jesibixxu biss varjazzjoni normali fit-tkabbir u l-morfoloġija għal dik l-ispeċi partikolari;

— is-sopravivenza medja tan-nebbieta ta' kontroll li nħolqu hija tal-inqas 90 % għad-durata tal-istudju;

— kundizzjonijiet ambjentali għal speċi partikolari huma identiċi u l-midjums tat-tkabbir fihom l-istess ammont tal-matriċi tal-ħamrija, il-midjums ta' appoġġ, jew sottostrat għall-istess sors.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. Sustanza kimika ta' referenza jaf tiġi ttestjata f'intervalli regolari, biex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tat-test u r-rispons tal-pjanti tat-test partikolari u l-kundizzjonijiet tat-test ma nbidlux b'mod sinifikanti maż-żmien. Inkella, il-bijomassa storika jew il-kejl tat-tkabbir tal-kontrolli jistgħu jintużaw biex jevalwaw il-prestazzjoni tas-sistema f'laboratorji partikolari, u jistgħu jservu bħala miżura ta' kontroll tal-kwalità ġol-laboratorju.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Ħamrija naturali — Sottostrat artifiċjali

8. Il-pjanti jistgħu jitkabbru fi qsari permezz ta' ħamrija ramlija, ramel lomuż, jew ħamrija taflija bir-ramel li fiha sa 1,5 fil-mija karbonju organiku (madwar 3 fil-mija materja organika). Jistgħu jintużaw ukoll ħamrija għat-twaħħil kummerċjali jew taħlita ta' ħamrija sintetika li fihom sa 1,5 fil-mija karbonju organiku. Il-ħamrija taflija ma għandhiex tintuża jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li għandha affinità għolja għat-tafal. Il-ħamrija tas-sit għandha tintgħarbel għal 2 mm daqs tal-frak sabiex tiġi omoġenizzata u jitneħħa l-frak oħxon. Għandu jiġi rrapportat it-tip u l-konsistenza, % karbonju organiku, il-pH u l-kontenut tal-melħ bħala konduttività elettronika tal-ħamrija mħejjija finali. Il-ħamrija għandha tiġi kklassifikata skont skema ta' klassifikazzjoni standard (11). Il-ħamrija tista' tiġi pasturizzata jew ittrattata bis-sħana sabiex jitnaqqas l-effett tal-patoġeni tal-ħamrija.

9. Il-ħamrija naturali tista' tikkomplika l-interpretazzjoni tar-riżultati u żżid l-varjabbiltà minħabba proprjetajiet fiżiċi/kimiċi u popolazzjonijiet mikrobjali differenti. Dawn il-varjabbli sussegwentement ibiddlu l-kapaċità ta' żamma ta' umdità, il-kapaċità ta' rbit tas-sustanzi kimiċi, l-arjazzjoni, u l-kontenut tal-elementi tan-nutrijenti u t-traċċi. Minbarra l-varjazzjonijiet għal dawn il-fatturi fiżiċi, sejjer ikun hemm ukoll varjazzjoni fil-proprjetajiet kimiċi bħall-pH u l-potenzjal ta' redox, li tista' taffettwa l-bijodisponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test (12) (13) (14).

10. Is-sottostrati artifiċjali ġeneralment ma jintużawx għall-ittestjar ta' prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, iżda jistgħu jkunu ta' użu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi ġenerali jew fejn ikun mixtieq li titnaqqas il-varjabbiltà tal-ħamrija naturali u tiżdied il-paragunabbiltà tar-riżultati tat-test. Is-sottostrati użati għandhom ikunu komposti ta' materjali inerti li jnaqqsu l-interazzjoni mas-sustanza kimika tat-test, il-portatur tas-solvent, jew it-tnejn li huma. Ramel kwarzuż maħsul bl-aċidu, suf minerali u żibeġ tal-ħġieġ (eż. b'dijametru bejn 0,35 u 0,85 mm) instabu li huma materjali inerti xierqa li jassorbu minimalment is-sustanza kimika tat-test (15), u dan jiżgura li s-sustanza kimika tkun disponibbli kemm jista' jkun kollha għaż-żerriegħa permezz tat-teħid mill-għeruq. Is-sottostrati mhux xierqa, ikunu jinkludu vermikolat, perlajt jew materjali oħra assorbenti ħafna. Għandhom jiġu pprovduti nutrijenti għat-tkabbir tal-pjanti biex jiġi żgurat li l-pjanti ma jkunux taħt stress minħabba nuqqasijiet ta' nutrijenti, u fejn ikun possibbli dan għandu jiġi vvalutat permezz ta' analiżi tas-sustanzi kimiċi jew b'valutazzjoni viżwali tal-pjanti ta' kontroll.

Kriterji għall-għażla tal-ispeċijiet tat-test

11. L-ispeċijiet magħżula għandhom ikunu raġonevolment varjati, eż. meta wieħed iqis id-diversità tassonomika tagħhom fir-renju tal-pjanti tagħhom, id-distribuzzjoni tagħhom, l-abbundanza, il-karatteristiċi taċ-ċiklu tal-ħajja speċifiku għall-ispeċi u r-reġjun ta' okkorrenza naturali, biex tiġi żviluppata medda ta' risponsi (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Il-karatteristiċi li ġejjin tal-ispeċijiet tat-test possibbli għandhom jiġu kkunsidrati fl-għażla:

— l-ispeċijiet għandhom żerriegħa uniformi li huma disponibbli minnufih minn sors(i) standard affidabbli ta' żerriegħa u li jipproduċu ġerminazzjoni konsistenti, affidabbli u ugwali, kif ukoll tkabbir tan-nebbieta uniformi;

— il-pjanta hija soġġetta għall-ittestjar fil-laboratorju, u tista' tagħti riżultati affidabbli u riproduċibbli fi ħdan u fil-faċilitajiet ta' ttestjar kollha;

— is-sensittività tal-ispeċijiet ittestjati għandha tkun konsistenti mar-risponsi tal-pjanti misjuba fl-ambjent espost għas-sustanza kimika;

— dawn intużaw sa ċertu punt f'testijiet tat-tossiċità preċedenti u l-użu tagħhom, pereżempju, f'bijoassaġġi tal-ħaxix, skrinjar ta' metalli tqal, testijiet tas-salinità jew it-testijiet tal-istress minerali jew studji tal-allelopatija jindika sensittività għal varjetà wiesgħa ta' fatturi li joħolqu pressjoni;

— huma kompatibbli mal-kundizzjonijiet ta' tkabbir tal-metodu ta' ttestjar;

— jissodisfaw il-kriterji ta' validità tat-test.

Xi wħud mill-ispeċijiet tat-test l-iktar storikament użati huma elenkati fl-Appendiċi 2 u l-ispeċijiet li potenzjalment mhumiex pjanti fl-Appendiċi 3.

12. In-numru ta' speċijiet li għandhom jiġu ttestjati jiddependi fuq ir-rekwiżiti regolatorji rilevanti, għalhekk mhuwiex speċifikat f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

13. Is-sustanza kimika għandha tiġi applikata f'portatur xieraq (eż. ilma, aċetun, etanol, polietilen glikol, gomma Għarbija, ramel). Taħlitiet (prodotti formulati jew formulazzjonijiet) li jkun fihom ingredjenti attivi u diversi aġġuvanti jistgħu jiġu ttestjati wkoll.

Inkorporazzjoni f'ħamrija/sottostrat artifiċjali

14. Is-sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew huma suspiżi fl-ilma jistgħu jiżdiedu mal-ilma, u mbagħad is-soluzzjoni titħallat mal-ħamrija b'apparat ta' taħlit xieraq. Dan it-tip ta' test jista' jintuża jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tkun permezz tal-ħamrija jew ilma interstizjali tal-ħamrija u li hemm tħassib li tinġibed mill-għeruq. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma tal-ħamrija ma għandhiex tinqabeż biż-żieda tas-sustanza kimika tat-test. Il-volum ta' ilma miżjud għandu jkun l-istess għal kull konċentrazzjoni tat-test, iżda għandu jkun limitat biex jiġi evitat it-tagħqid agglomerat tal-ħamrija.

15. Is-sustanzi kimiċi b'solubbiltà fl-ilma baxxa għandhom jinħallu f'solvent volatili xieraq (eż. aċetun, etanol) u mħallta bir-ramel. Imbagħad is-solvent jista' jitneħħa mir-ramel permezz ta' fluss ta' arja filwaqt li jitkompla jitħallat ir-ramel. Ir-ramel ittrattat jitħallat mal-ħamrija sperimentali. Jiġi stabbilit kontroll ieħor li jirċievi ramel u solvent biss. Jiżdiedu ammonti ugwali ta' ramel, b'solvent imħallat u mneħħi mal-livelli ta' trattament kollha u t-tieni kontroll. Għal sustanzi kimiċi tat-test solidi u li ma jinħallux, il-ħamrija xotta u s-sustanza kimika jitħalltu f'apparat ta' taħlit xieraq. Minn hawn 'il quddiem, il-ħamrija titpoġġa fil-qsari u ż-żerriegħa tinżera' minnufih.

16. Meta jintuża sottostrat artifiċjali minflok il-ħamrija, is-sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jistgħu jinħallu fis-soluzzjoni tan-nutrijenti eżattament qabel il-bidu tat-test. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, li iżda jistgħu jiġu sospiżi fl-ilma permezz ta' portatur ta' solvent, għandhom jiżdiedu mal-portatur, mas-soluzzjoni tan-nutrijenti. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, li għalihom m'hemm disponibbli ebda portatur mhux tossiku li jinħall fl-ilma, għandhom jinħallu f'solvent volatili xieraq. Is-soluzzjoni kimika titħallat mar-ramel jew maż-żibeġ tal-ħġieġ, titpoġġa f'apparat vakwu rotatorju, u tiġi evaporata, biex tibqa' kisja uniformi ta' sustanza kimika fuq ir-ramel jew iż-żibeġ. Porzjon ippeżat ta' żibeġ għandu jiġi estratt bl-istess solvent organiku u s-sustanza kimika tiġi assaġġjatta qabel jimtlew il-kontenituri tal-qsari.

Applikazzjoni fuq il-wiċċ

17. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, ħafna drabi wiċċ il-ħamrija tiġi sprejjata bis-soluzzjoni tat-test għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. It-tagħmir kollu użat fit-twettiq tat-testijiet, inkluż it-tagħmir użat biex tiġi ppreparata u tingħata s-sustanza kimika tat-test, għandu jkun ta' tali disinn u kapaċità li t-testijiet li jinvolvu dan it-tagħmir jistgħu jitwettqu b'mod preċiż u li jagħti kopertura riproduċibbli. Il-kopertura għandha tkun uniformi fl-uċuħ tal-ħamrija kollha. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-possibbiltà li s-sustanzi kimiċi jiġu adsorbiti mit-tagħmir jew ikun hemm reazzjoni miegħu (eż. tubi tal-plastik u sustanzi kimiċi lipofiliċi jew parts u elementi tal-azzar). Is-sustanza kimika tat-test tiġi sprejata fuq wiċċ il-ħamrija b'simulazzjoni ta' applikazzjonijiet tat-tank tal-isprej tipiċi. Ġeneralment, il-volumi tal-isprej għandhom ikunu fil-medda ta' prattika agrikola normali u l-volumi (għandu jiġi rrapportat l-ammont ta' ilma, eċċ). It-tip ta' żennuna għandha tintgħażel biex tipprovdi kopertura uniformi ta' wiċċ il-ħamrija. Jekk jiġu applikati solventi u portaturi, għandu jiġi stabbilit grupp ieħor ta' pjanti ta' kontroll li jirċievi biss is-solvent/portatur. Dan mhuwiex meħtieġ għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti ttestjati bħala formulazzjonijiet.

Verifika tal-konċentrazzjoni/rata tas-sustanza kimika tat-test

18. Il-konċentrazzjonijiet/rati ta' applikazzjoni għandhom jiġu kkonfermati minn verifika analitika xierqa. Għal sustanzi kimiċi li jinħallu, verifika tal-konċentrazzjonijiet/rati tat-test kollha tista' tiġi kkonfermata b'analiżi tal-ogħla konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tat-test għat-test b'dokumentazzjoni dwar id-dilwizzjoni sussegwenti u l-użu ta' tagħmir ta' applikazzjoni kkalibrat (eż. oġġetti tal-ħġieġ analitiċi kkalibrati, kalibrazzjoni tat-tagħmir ta' applikazzjoni tal-isprejer). Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux, għandha tiġi pprovduta verifika tal-materjal kompost bil-piżijiet tas-sustanza kimika tat-test miżjuda mal-ħamrija. Jekk ikun hemm bżonn ta' dimostrazzjoni ta' omoġenità, jaf tkun meħtieġa analiżi tal-ħamrija.

PROĊEDURA

Disinn tat-test

19. Iż-żrieragħ tal-istess speċi jitħawlu fil-qsari. In-numru ta' żrieragħ miżrugħa f'kull qasrija sejjer jiddependi skont l-ispeċi, id-daqs tal-qasrija u d-durata tat-test. In-numru ta' pjanti f'kull qasrija għandu jipprovdi kundizzjonijiet ta' tkabbir adegwati u jevita ffullar matul it-test. Id-densità massima ta' pjanti għandha tkun 3 — 10 żrieragħ f'kull 100 cm^2 skont id-daqs taż-żrieragħ. Eż., hija rakkomandata pjanta tal-qamħ, tas-sojja, tat-tadam, tal-ħjar, jew tal-pitravi taz-zokkor f'kull kontenitur ta' 15 cm; tliet pjanti tal-kolza jew tal-piżelli f'kull kontenitur ta' 15 cm; u 5 sa 10 basliet, qamħ, jew żrieragħ żgħar oħra f'kontenitur ta' 15 cm. In-numru ta' żrieragħ u qsari repliki (ir-replikat huwa ddefinit bħala qasrija, għalhekk il-pjanti fl-istess qasrija ma jikkostitwixxux replikat) għandu jkun adegwat għall-aħjar analiżi statistika (21). Wieħed għandu jinnota li l-varjabbiltà sejra tkun ikbar għall-ispeċijiet tat-test permezz ta' inqas żrieragħ kbar f'kull qasrija (repliki), meta mqabbel mal-ispeċijiet tat-test fejn huwa possibbli li jintużaw numri ikbar ta' żrieragħ f'kull qasrija. Bit-tħawwil ta' numru ugwali ta' żrieragħ f'kull qasrija, din il-varjabbiltà tista' titnaqqas.

20. Jintużaw gruppi ta' kontroll biex jiġi assigurat li l-effetti osservati huma assoċjat mal-espożizzjoni tas-sustanza kimika tat-test jew attribwita lilha. Il-grupp ta' kontroll xieraq għandu jkun identiku f'kull aspett għall-grupp tat-test ħlief għall-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test. F'test partikolari, il-pjanti tal-ittestjar kollha inkluż il-kontrolli għandhom ikunu mill-istess sors. Biex tkun evitata imparzjalità, hija meħtieġa assenjazzjoni każwali tal-qsari tat-test u ta' kontroll.

21. Għandhom jiġu evitati żrieragħ miksija b'insettiċidju jew fungiċidju (jiġifieri żrieragħ 'imlibbsa'). Madankollu, l-użu ta' ċerti fungiċidji ta' kuntatt mhux sistemiku (eż. captan, thiram) huwa permess minn xi awtoritajiet regolatorji (22). Jekk il-patoġeni li jinġarru miż-żerriegħa huma ta' tħassib, iż-żrieragħ jistgħu jixxarbu għal ftit ħin f'soluzzjoni ta' 5 % ipoklorit dgħajfa, imbagħad jitlaħalħu b'mod esteniv taħt l-ilma tal-vit u jitnixxfu. Mhuwa permess ebda trattament rimedjali bi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti oħrajn.

Kundizzjonijiet tat-test

22. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu kemm jista' jkun l-istess bħal dawk il-kundizzjonijiet meħtieġa għat-tkabbir normali għall-ispeċijiet u l-varjetajiet ittestjati (Appendiċi 4 jipprovdi eżempji tal-kundizzjonijiet tat-test). Il-pjanti ġodda għandhom jinżammu bi prattiki ortikulturali ġodda f'kmamar b'ambjent ikkontrollat, fitotroni, jew serer. Meta jintużaw faċilitajiet tat-tkabbir, dawn il-prattiki ġeneralment jinkludu reġistrazzjoni ta' kontroll u adegwatament frekwenti (eż. kuljum) tat-temperatura, l-umdità, il-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, id-dawl (l-intensità, it-tul tal-mewġa, ir-radjazzjoni attiva fotosintetikament) u l-perjodu ta' dawl, mezzi ta' tisqija, eċċ, biex jiġi assigurat tkabbir tajjeb tal-pjanti kif iġġudikat mill-pjanti ta' kontroll tal-ispeċijiet magħżulin. It-temperaturi tas-serer għandhom jiġu kkontrollati permezz ta' sistemi ta' ventilazzjoni, tisħin u/jew tkessiħ. Ġeneralment, il-kundizzjonijiet li ġejjin huma rakkomandati għall-ittestjar tas-serer:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— umdità: 70 % ± 25 %;

— fotoperjodu: minimu ta' 16-il siegħa ta' dawl;

— intensità tad-dawl: 350 ± 50 $\mu E/m_2/s$. Jaf ikun meħtieġ dawl addizzjonali jekk l-intensità tonqos taħt 200 $\mu E/m_2/s$, tul tal-mewġa 400 — 700 nm ħlief għal ċerti speċijiet li għandhom inqas rekwiżiti ta' dawl.

Il-kundizzjonijiet ambjentali għandhom jiġu ssorveljati u rrapportati matul l-istudju. Il-pjanti għandhom jitkabbru f'plastik mhux poruż jew qsari bi ħġieġ doppju bi trej jew plattina taħt il-qasrija. Il-qsari jistgħu jitqiegħdu f'post ieħor kull ċertu żmien biex titnaqqas il-varjabbiltà fit-tkabbir tal-pjanti (minħabba d-differenzi fil-kundizzjonijiet tat-test fi ħdan il-faċilitajiet ta' tkabbir). Il-qsari għandhom ikunu kbar biżżejjed biex jippermettu tkabbir normali.

23. In-nutrijenti tal-ħamrija jistgħu jiġu ssupplimentati kif meħtieġ biex jinżamm vigur tajjeb tal-pjanti. Il-ħtieġa u l-għażla tal-ħin ta' nutrijenti addizzjonali tista' tiġi ġġudikata bl-osservazzjoni tal-pjanti ta' kontroll. Hija rakkomandata t-tisqija mill-qiegħ tal-konteninturi tat-test (eż. permezz ta' ftejjel tal-fibra tal-ħġieġ). Madankollu, tista' tintuża tisqija inizjali minn fuq biex tiġi stimulata l-ġerminazzjoni taż-żrieragħ, u għall-applikazzjoni fuq wiċċ il-ħamrija, tiffaċilita l-moviment tas-sustanza kimika fil-ħamrija.

24. Il-kundizzjonijiet ta' tkabbir speċifiċi għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet ittestjati u s-sustanza kimika tat-test investigata. Il-pjanti ta' kontroll u ttrattati għandhom jinżammu fl-istess kundizzjonijiet, madankollu għandhom jittieħdu miżuri adegwati biex tiġi evitata espożizzjoni inkroċjata (eż. ta' sustanzi kimiċi volatili) bejn trattamenti differenti u tal-kontrolli għas-sustanza kimika tat-test.

Ittestjar f'konċentrazzjoni/rata unika

25. Sabiex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni/rata xierqa ta' sustanza kimika għat-twettiq ta' test (ta' sfida/limitu) tar-rata jew ta' konċentrazzjoni unika, għandhom jiġu kkunsidrati bosta fatturi. Għal sustanzi kimiċi ġenerali, dawn jinkludu l-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tas-sustanza kimika. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi u l-mudell ta' użu tas-sustanza kimika tat-test, jeħtieġ li tiġi kkunsidrata l-konċentrazzjoni massima jew ir-rata ta' applikazzjoni, in-numru ta' applikazzjonijiet f'kull staġun u/jew il-persistenza tas-sustanza kimika tat-test. Biex jiġi ddeterminat jekk sustanza kimika ġenerali għandhiex proprjetajiet fitotossiċi, jaf ikun xieraq li jiġi ttestjat il-livell massimu ta' ħamrija xotta ta' 1 000 mg/kg.

Test tas-sejba tal-medda

26. Meta jkun meħtieġ jista' jitwettaq test tas-sejba tal-medda biex jipprovdi gwida dwar il-konċentrazzjonijiet/rati li għandhom jiġu ttestjati fi studju finali dwar ir-rispons għad-doża. Għat-test tas-sejba tad-doża, il-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar għandhom jiġu spazjati sew (eż. ħamrija xotta ta' 0,1, 1,0, 10, 100 u 1 000 mg/kg). Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-konċentrazzjonijiet/rati jistgħu jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjoni jew ir-rata ta' applikazzjoni rakkomandata jew massima, eż. 1/100, 1/10, 1/1 tal-konċentrazzjoni jew rata ta' applikazzjoni rakkomandata/massima.

Ittestjar f'konċentrazzjonijiet/rati multipli

27. Il-fini tat-test b'konċentrazzjonijiet/rati multipli huwa li jistabbilixxi relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u li jiġi ddeterminat il-valur EC_x jew ER_x għat-tfaċċar, il-bijomassa u/jew l-effetti viżwali meta mqabbel ma' kontrolli mhux esposti, kif meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji.

28. In-numru u l-ispazju tal-konċentrazzjonijiet jew ir-rati għandhom ikunu biżżejjed biex jiġġeneraw relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u l-ekwazzjoni tar-rigressjoni u jagħti stima tal-EC_x jew ER_x. Il-konċentrazzjonijiet/rati magħżula għandhom jinkludu l-valuri EC_x jew ER_x li għandhom jiġu ddeterminati. Pereżempju, jekk ikun meħtieġ valur EC_{50} huwa rakkomandabbli li jsir ittestjar f'rati li jipproduċu effett bejn 20 sa 80 %. In-numru rakkomandat tal-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar biex jintlaħaq dan huwa tal-inqas ħamsa f'serje ġeometrika flimkien ma' kontroll mhux ittrattat, u spazjat b'fattur li ma jaqbiżx tlieta. Għal kull grupp ta' trattament u kontroll, in-numru ta' repliki għandu jkun tal-inqas erbgħa u n-numru totali ta' żrieragħ għandu jkun tal-inqas 20. Iktar repliki ta' ċerti pjanti b'rata ta' ġerminazzjoni baxxa jew b'drawwiet ta' tkabbir varjabbli jaf ikunu meħtieġa biex tiżdied is-setgħa statistika tat-test. Jekk jintużaw numru kbir ta' konċentrazzjonijiet/rati tat-test, jista' jitnaqqas in-numru ta' repliki. Jekk trid tiġi stmata l-NOEC, jaf ikunu meħtieġa iktar repliki biex tinkiseb s-setgħa statistika mixtieqa (23).

Osservazzjonijiet

29. Matul il-perjodu ta' osservazzjoni, jiġifieri bejn 14 u 21 jum wara li tfaċċaw 50 % tal-pjanti ta' kontroll (il-kontrolli ta' solventi ukoll, jekk ikun applikabbli), il-pjanti huma osservati frekwentement (tal-inqas kull ġimgħa u jekk ikun possibbli kuljum) għat-tfaċċar u l-fitototossiċità u l-mortalità viżwali. Fi tmiem it-test, għandu jiġi rreġistrat il-kejl tat-tfaċċar perċentwali u l-bijomassa tal-pjanti li jibqgħu ħajjin, kif ukoll l-effetti detrimentali viżibbli fil-partijiet differenti tal-pjanta. Din tal-aħħar tinkludi anormalitajiet fid-dehra taż-żrieragħ li tfaċċaw, twaqqif tat-tkabbir, klorożi, skolorazzjoni, mortalità, u effetti fuq l-iżvilupp tal-pjanta. Il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż xott medju tan-nebbieta tal-pjanti li jibqgħu ħajjin, billi n-nebbieta tinżera' f'wiċċ il-ħamrija u titnixxef għal piż kostanti ta' 60 °C. Inkella, il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż frisk tan-nebbieta. L-għoli tan-nebbieta jaf ikun punt ta' tmiem ieħor, jekk ikun meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji. Għandha tintuża sistema ta' punteġġi uniformi għal dannu viżwali biex jiġu evalwati r-risponsi tossiċi osservabbli. Fir-referenzi (23) (24), ingħataw eżempji għat-twettiq ta' klassifikazzjonijiet viżwali kwalitattivi jew kwantitattivi.

DEJTA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

Test f'konċentrazzjoni/rata waħda

30. Dejta għal tali speċijiet ta' pjanti għandha tiġi analizzata permezz ta' metodu statistiku xieraq (21). Għandu jiġi rrapportat il-livell ta' effett fil-konċentrazzjoni/rata tat-test, jew in-nuqqas ta' lħuq ta' effett partikolari fil-konċentrazzjoni/rata tat-test (eż., < *x* % l-effett osservat f'konċentrazzjoni jew rata *y*)

Test f'konċentrazzjoni/rata multipla

31. Hija stabbilita relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'termini ta' ekwazzjoni ta' rigressjoni. Jistgħu jintużaw mudelli differenti: pereżempju, biex jiġu stmati l-EC_x jew ER_x (eż. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) u l-limiti ta' kunfidenza għat-tfaċċar bħald-dejta kwantali, il-metodi logit, probit, Weibull, Spearman-Karber, Spearman-Karber trimmjat, eċċ jistgħu jkunu xierqa. Għat-tkabbir tan-nebbieta (piż u għoli) bħala punti ta' tmiem kontinwi EC_x jew ER_x u l-limiti ta' kunfidenza tiegħu, jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (eż. analiżi tar-rigressjoni mhux lineari Bruce-Versteeg (25)). Kull meta jkun possibbli, l-R^2 għandu jkun 0,7 jew ogħla għall-biċċa l-kbira tal-ispeċijiet sensittivi u l-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar użati biex jinkludu effetti bejn 20 % u 80 %. Jekk għandha tiġi stmata l-NOEC, l-applikazzjoni ta' testijiet statistiċi b'saħħithom għandu jkun ippreferut u dawn għandhom jintgħażlu abbażi tad-distribuzzjoni tad-dejta (21) (26).

Rapport tat-test

32. Ir-rapport tat-test għandu jippreżenta riżultati tal-istudji kif ukoll deskrizzjoni ddettaljata tal-kundizzjonijiet tat-test, diskussjoni fid-dettall tar-riżultati, analiżi tad-dejta, u l-konklużjonijiet miġbura mill-analiżi. Għandu jiġi pprovdut sommarju tabulari u silta mir-riżultati. Ir-rapport għandu jinkludi dawn li ġejjin:

Sustanza kimika tat-test:

— dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika, proprjetajiet rilevanti tas-sustanza kimika ttestjata (eż. log P_{ow}, solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba ambjentali, jekk tkun disponibbli);

— dettalji dwar it-tħejjija tas-soluzzjoni tat-test u l-verifika tal-konċentrazzjonijiet tat-test kif speċifikat fil-paragrafu 18.

Speċijiet tat-test:

— dettalji dwar l-organiżmu tat-test: speċi/varjetà, familji tal-pjanti, ismijiet xjentifiċi u komuni, sors u storja taż-żerriegħa kemm jista' jkun iddettaljata (jiġifieri isem il-fornitur, ġerminazzjoni perċentwali, klassi tad-daqs, lott jew numru tal-lott taż-żerriegħa, lott jew numru tal-lott, sena taż-żerriegħa jew staġun tat-tkabbir meta nġabret, klassifikazzjoni tad-data ta' ġerminazzjoni) vijabbiltà, eċċ;

— numru ta' monospeċijiet u speċijiet di-kotiledon ittestjati;

— raġunament għall-għażla tal-ispeċijiet;

— deskrizzjoni tal-ħżin, it-trattament u ż-żamma taż-żerriegħa.

Kundizzjonijiet tat-test:

— faċilità tal-ittestjar (eż. kompartiment tat-tkabbir, fitotron u serra);

— deskrizzjoni tas-sistema tat-test (eż. il-qisien tal-qsari, il-materjal tal-qsari l-ammonti ta' ħamrija);

— karatteristiċi tal-ħamrija (konsistenza jew tip ta' ħamrija: distribuzzjoni u klassifikazzjoni tal-frak tal-ħamrija, proprjetajiet fiżiċi u kimiċi inkluż l- % ta' materja organika, l- % tal-karbonju organiku u l-pH);

— preparazzjoni ta' ħamrija/sottostrat (eż. ħamrija, ħamrija artifiċjali, ramel u oħrajn) qabel it-test;

— deskrizzjoni tal-midjum tan-nutrijenti jekk jintuża;

— applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: deskrizzjoni tal-metodu ta' applikazzjoni, deskrizzjoni tat-tagħmir, rati ta' espożizzjoni u volumi li jinkludu l-verifika tas-sustanza kimika, deskrizzjoni tal-metodu ta' kalibrazzjoni u deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet ambjentali matul l-applikazzjoni;

— kundizzjonijiet tat-tkabbir: intensità tad-dawl (eż. PAR, radjazzjoni fotosintetikament attiva), fotoperjodu, temperaturi massimi/minimi, skeda u metodu tat-tisqija, fertilizzazzjoni;

— numru ta' żrieragħ f'kull qasrija, numru ta' pjanti għal kull doża, numru ta' repliki (qsari) għal kull rata ta' espożizzjoni;

— tip u numru ta' kontrolli (kontrolli negattivi u/jew pożittivi, kontroll tas-solvent jekk jintuża);

— durata tat-test.

Riżultati:

— tabella tal-punti tat-tmiem kollha għal kull replikat, il-konċentrazzjoni/rata tat-test u l-ispeċijiet;

— in-numru u t-tfaċċar perċentwali meta mqabbel mal-kontrolli;

— il-kejliet tal-bijomassa (piż xott jew piż frisk tan-nebbieta) tal-pjanti bħala perċentwal tal-kontrolli;

— l-għoli tan-nebbieta tal-pjanti bħala l-perċentwal tal-kontrolli, jekk imkejjel;

— dannu viżwali perċentwali u deskrizzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tad-dannu viżwali (klorożi, nekrożi, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u z-zokk, kif ukoll kwalunkwe nuqqas ta' effetti) mis-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-pjanti ta' kontroll;

— deskrizzjoni tal-iskala tal-klassifikazzjoni użata biex jiġi ġġudikat id-dannu viżwali, jekk tiġi pprovduta klassifikazzjoni viżwali;

— għal studji tar-rata unika, għandu jiġi rrapportat id-dannu perċentwali;

— Il-valuri EC_x jew ER_x (eż. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) u l-limiti ta' kunfidenza relatati. Meta titwettaq l-analiżi tar-rigressjoni, ipprovdi l-iżball standard għall-ekwazzjoni tar-rigressjoni, u l-iżball standard għall-istima tal-parametru individwali (eż. il-pendil, l-interċetta);

— il-valuri NOEC (u LOEC) jekk jiġu kkalkolati;

— deskrizzjoni tal-proċeduri statistiki u l-preżunzjonijiet użati;

— wiri grafiku ta' din id-dejta u r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons tal-ispeċijiet ittestjati.

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenzi matul it-test.

DOKUMENTAZZJONI

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Kapitolu C.33 ta' dan l-Anness: Test tar-Riproduzzjoni tal-Ħniex (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Ingredjent attiv (a.i.) (jew sustanza attiva (a.s.)) huwa materjal imfassal biex jipprovdi effett bijoloġiku speċifiku (eż. kontroll tal-insetti, kontroll tal-mard tal-pjanti, kontroll tax-xibt fl-erja tat-trattament), magħruf ukoll bħala l-ingredjent attiv tal-grad tekniku, sustanza attiva.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (CPPs jew PPPs) jew pestiċidi huma materjali b'attività bijoloġika speċifika użati b'mod maħsub biex jipproteġu l-pjanti minn pesti (eż. mard fungali, insetti u pjanti kompetittivi).

EC_x. Konċentrazzjoni tal-Effett ta'x % jew ER_x. Rata tal-Effett ta' x % hija l-konċentrazzjoni jew ir-rata li tirriżulta f'bidla mhux mixtieqa ta' x % fil-punt tat-tmiem finali tat-test li jitkejjel b'mod relattiv għall-kontroll (eż. 25 % jew 50 % tnaqqis fit-tfaċċar ta' nebbiet, piż tan-nebbiet, numru finali ta' pjanti preżenti, jew żieda fid-dannu viżwali jikkostitwixxi EC_{25}/ER_{25} jew EC_{50}/ER_{50} rispettivament).

Tfaċċar hija d-dehra ta' koleottilu jew kotiledon fuq wiċċ il-ħamrija.

Formulazzjoni hija l-prodott formulat kummerċjalment li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv), magħrufa wkoll bħala l-preparazzjoni finali ([1]) jew prodott għall-użu finali (TEP) tipiku.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ġie osservat effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal-LOEC, għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0{,}05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll, u hija ogħla mill-valur NOEC.

Pjanti mhux fil-mira: Dawk il-pjanti li mhumiex fl-erja tal-pjanti fil-mira. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan ġeneralment jirreferi għall-pjanti li ma jagħmlux parti mill-erja tat-trattament.

NOEC (Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ma ġie osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0{,}05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Fitotossiċità: Devjazzjonijiet detrimentali (b'valutazzjonijiet imkejla u viżwali) mill-mudell normali ta' dehra u tkabbir ta' pjanti b'rispons għal sustanza kimika partikolari.

Replikat huwa l-unità sperimentali li tirrappreżenta l-grupp ta' kontroll u/jew il-grupp ta' trattament. F'dawn l-istudji, il-kontenitur huwa ddefinit bħala r-replikat.

Valutazzjoni viżwali: Klassifikazzjoni tad-dannu viżwali abbażi tal-osservazzjonijiet tal-istand tal-pjanta, il-vigor, il-malformazzjoni, il-klorożi, in-nekrożi, u dehra ġenerali wara paragun ma' kontroll.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

([1]) Preparazzjoni Finali: Il-prodott formulat li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv) mibjugħ fis-suq.

Appendiċi 2

Lista ta' speċijiet storikament użati fl-ittestjar tal-pjanti

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Karrotti
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Ġirasol
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Ħassa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Mustarda Bajda
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kaboċċa ċiniża
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Kolza
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Kaboċċa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Nevew
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Krexxuni tal-ġnien
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Ravanell
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Pitravi
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Ħjara
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Fażola tas-sojja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Fażola mung
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Dwarf bean, Fażola Franċiża, Fażola tal-ġnien
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Piżelli
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Żerriegħa tal-fienu
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Qrempuċ tal-mogħoż
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Silla Ħamra
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Ġulbiena
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Kittien
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Qamħ saraċin
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tadam

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Basal
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Ħafur
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Xgħir
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Sikran perenni
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Ross
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Segala
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Grain sorghum, Shattercane
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Qamħ
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Qamħirrum

Appendiċi 3

Lista ta' speċijiet li potenzjalment mhumiex pjanti

Speċijiet Potenzjali tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossiċità tal-Pjanti.

Nota: It-tabella li ġejja tipprovdi informazzjoni għal 52 speċi li mhumiex pjanti (jingħataw referenzi fil-parentiżi għal kull entrata). Ir-rati ta' tfaċċjaw pprovduti huma minn dokumentazzjoni ppubblikata u huma għal gwida ġenerali biss. L-esperjenza individwali tista' tiddependi skont is-sors taż-żerriegħa u fatturi oħra.

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (Tursin tas-Sġajra Ġappuniża)	A, B żoni disturbati, ringieli ta' sġajriet, mergħat (16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa (7, 14, 18, 19) jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Lellux Ingliż)	P bur, għelieqi li jinħartu, terf (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	il-ġerminazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza(18, 19) l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Wardet il-Qamħ)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Ċentawrja Sewda)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	jaf tkun meħtieġa maturazzjoni(18, 19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 26)	WARA (5, 22, 26)	A	
Inula h elenium Elecampane	P siti disturbati, umdi (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	A, F	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja [1] u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir [2]	Fond tat-Taħwil (mm) [3]	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) [4]	L-ebda trattament speċjali [5]	Test tat-Tossiċità [6]	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati [7]	Referenzi ohrajn [8]
Leontodon hispidus (Sinnet il-Ljun)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, żoni disturbati (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (17, 18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Black-eyed Susan)	B, P disturbata (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis Virga tad-Deheb Kanadiża	P mergħa, żoni miftuħa (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	ħallat b'parti ugwali ta' ramel u xarrab f'500 ppm għal 24 siegħa (11) l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Agrimonja Komuni)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		ġerminazzjoni tista' tiġi inibita mid-dlam (1) xarrab f'ilma sħun għal 12-il siegħa (29)	QABEL U WARA (31)	A	
Xanthium spinosum (Agrimonja Spinuża)	A ħabitats miftuħa (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		brix (14) l-ebda trattament speċjali (6)	QABEL U WARA (6)	A	
Xanthium strumarium (Agrimonja Taljana)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		l-ebda trattament speċjali (6, 14, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Kardamina)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, terf (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Fjur Kukulu)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 15, 22-26)	WARA (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Tiġieġa Ħoxna)	A marġini tal-għelieqi, żoni disturbati (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	it-trattament huwa differenti skont il-kulur taż-żerriegħa (19) irqad fi ħżien xott (19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) stratifikazzjoni bil-kesħa (18) l-ebda trattament speċjali (14, 34)	QABEL U WARA (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Fexfiex Komuni)	P għelieqi, art li tinħarat, ħabitats miftuħa (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) l-ebda trattament (5, 14, 15, 25, 27)	WARA (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Ipomea Vjola)	A ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa, għelieqi tal-qamħirrum (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Nutsedge Vjola)	P art li tinħarat, mergħat, ġniebi tat-toroq (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 28, 31)	B	7

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Ghantqux)	P għelieqi bil-ħaxix, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 19) il-ġerminazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza (18, 19) l-ebda trattament speċjali (23, 25)	WARA (5, 23, 25)	A, D, E, F	
Senna obtusifolia (Kassja, Sicklepod)	A boskijiet umdi (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) brix (14) il-vijabbiltà taż-żerriegħa hija differenti skont il-kulur (1) l-ebda trattament speċjali (6)	WARA (6,9)	A	
Sesbania exaltata (Qanneb)	A ħamrija alluvjali (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Xnien Aħmar)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, art li tinħarat (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 18) jaf tkun teħtieġ maturazzjoni (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)	A, E, F	
LAM IAC E AE *Leonurus cardiaca* (Motherwort)	P żoni miftuħa (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	F	
Mentha spicata (Nagħniegħ)	P żoni umdi (16)	2,21 (4)		0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	F	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żerriegħ Iċċitati ([7])	Referenzi ohrajn ([8])
Nepeta cataria (Ħaxixet il-Qtates)	P erjas disturbati (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (2, 4, 14)	WARA (2,4)	F	
Prunella vulgaris (Prunella)	P għelieqi li jinħartu, żoni bil-ħaxix, siti disturbati (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) ġerminazzjoni ikbar b'żrieragħ ikbar (1) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 22)	WARA (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Ħurrieq irqiq)	P mergħat, marġini tal-għelieqi (19)	14–18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Werqa bellusija)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	brix (14) l-ebda trattament (5, 10, 21)	QABEL U WARA (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Prickly Sida)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		brix (14) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Peprin)	A għelieqi, art li tinħarat, siti miftuħa (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa u brix (1, 19, 32) l-ebda trattament (4, 14, 29)	WARA (4)	A, D, E, F, G	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja [1] u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir [2]	Fond tat-Taħwil (mm) [3]	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) [4]	L-ebda trattament speċjali [5]	Test tat-Tossiċità [6]	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati [7]	Referenzi oħrajn [8]
POACEAE *Agrostis tenuis* (Agrositis Komuni)	ħaxix, mergħat (16)	0,07 (14)	L > D (Ю)	20 (10)	10 (62 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 17-19) l-ebda trattament speċjali (10)	WARA (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Denb il-Volpi)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	brix (14) ittratta b'101 mg/L KNO3 (14) stratifikazzjoni bis-sħana (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (34)	QABEL U WARA (28, 34)	A	32
Avena fatua (Ħafur Selvaġġ)	A żoni kkultivati, ħabitats miftuħa (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	brix (7, 32) id-dlam jinibixxi l-ġerminazzjoni (1) brix bil-kesħa (1, 18) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Bunixxief)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, art li tinħarat (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		perjodu ta' maturazzjoni (1, 7, 32) ġerminazzjoni inibita mid-dawl (1) l-ebda trattament speċjali (14)	QABEL U WARA (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Ħaxix Denb il-Kelb)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	ġerminazzjoni mhux affettwat mill-irradjanza (19) l-ebda trattament speċjali (14, 29)	WARA (5)	A	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Digitaria sanguinalis (Diġitarja)	A għelieqi, terf, ħabitats miftuħa (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	brix, stratifikazzjoni bil-kesħa, u maturazzjoni (1, 7, 14, 32) ittratta b'101 mg/L KNO3 (14) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Ħaxix tar-Razzett)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		brix (7, 32) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (3, 14, 21)	QABEL U WARA (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Segala Selvaġġa Kanadiża)	P riparjani, siti disturbati (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	l-ebda trattament speċjali (2, 11)	WARA (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Żwien)	P għelieqi, żoni umdi (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (10, 19)	WARA (10)	A	7
Hordeum pusillum (Xgħir Żgħir)	A mergħat, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16)	3,28 (14)				stratifikazzjoni bis-sħana (1) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL (31)		7
Phieum pratense (Ħaxix tal-Għalf)	P mergħat, għelieqi li jinħartu, siti disturbati (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (17) l-ebda trattament speċjali (10, 14, 17, 19)	WARA (10)	A, E	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Leblieba Ħadra)	A ħabitats miftuħa, ġnub tat-toroq (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratifikazzjoni bil-kesħa għal 4 — 8 ġimgħat (1, 2, 4, 20, 29) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL U WARA 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Persikarja)	A ħamrija umda (16)	1,8–2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18) stratifikazzjoni bil-kesħa (1) l-ebda trattament speċjali (5)	QABEL U WARA (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Pennsylvania Smartweed)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratifkazzjoni bil-kesħa għal 4 ġimgħat f'0 — 5oC (1, 29) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1)	QABEL (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Smartweed)	A żoni disturbati, art li tinħarat (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	brix, stratifikazzjoni bil-kesħa, trattament GA (14) stratifikazzjoni bil-kesħa, maturazzjoni (17-19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (13)	WARA (13)	A	32
Rumex crispus (Qarsajja Nnuklata)	P għelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	A, E	32

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja (1) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir (2)	Fond tat-Taħwil (mm) (3)	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) (4)	L-ebda trattament speċjali (5)	Test tat-Tossiċità (6)	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati (7)	Referenzi oħrajn (8)
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Ħarira Ħamra)	A għelieqi li jinħartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesħa, trattament GA (1, 14, 18, 19, 32) dawl meħtieġ għall- ġerminazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Qarsu Komuni)	P għelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24 -26)	WARA (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Ġeum Isfar)	P ringieli ta' sġajriet, żoni umdi (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) stratifikazzjoni bis-sħana (1) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 25, 26)	WARA (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Ħarxaja Komuni)	A għelieqi li jinħartu, żoni umdi, siti disturbat (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratifazzjoni bil-kesħa (1, 18, 19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (18, 19) id-dawl jinibixxi l-ġerminazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (6, 14)	QABEL U WARA (6, 28)	A	32
Galium mollugo (Ħarxajja tal-Kannizzati)	P sisien tal-ħaxix, żoni miftuħa (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24, 26, 29)	WARA (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Diġitalis)	sisien tal-ħitan B,P, żoni miftuħa (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 17-19) l-ebda trattament speċjali (4, 22-26)	WARA (4, 22, 26)	D, G, F	

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' ħajja ([1]) u Ħabitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ([2])	Fond tat-Taħwil (mm) ([3])	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ([4])	L-ebda trattament speċjali ([5])	Test tat-Tossiċità ([6])	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ([7])	Referenzi oħrajn ([8])
Veronica persica (Veronika)	A għelieqi li jinħartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) stratifikazzjoni bil-kesħa (18) l-ebda trattament speċjali (14)	QABEL U WARA (28)	A	32

([1]) A = Pjanti annwali, B = Pjanti biennali, P = Pjanti perenni.
([2]) Referenzi 11,14 u 33 jirreferu għall-proporzjon ta' dawl (L) u dlam (D) meħtieġ biex tiġi indotta ġerminazzjoni taż-żerrieġħa. Referenzi 3, 6, 9, 10, 13, 20 jirreferu għalkundizzjonijiet ta' tkabbir fis-serer.
([3]) 0 mm jindika li ż-żerriegħa nżergħu fuq wiċċ il-ħamrija jew li ż-żerriegħa jeħtieġu d-dawl biex jiġġerminaw.
([4]) In-numri pprovduti jirrappreżentaw in-numru ta' jiem fejn perċentwal ta' żrieragħ iġġerminati skont ir-referenza pprovduta, eż. 3 ijiem (50 %) ġerminazzjoni (referenza19).
([5]) It-tul ta' maturazzjoni u jew is-stratifikazzjoni mhumiex dejjem disponibbli. Ħlief għar-rekwiżiti tat-trattament bil-kesħa, il-kundizzjonijiet tat-temperatura mhumiex speċifikati peress li fl-ittestjar tas-serer hemm kontroll ta' temperatura limitata. Il-biċċa l-kbira taż-żrieragħ sejrin jiġġerminaw f'varjazzjoni normali tat-temperaturi misjuba fis-serer.
([6]) Tindika speċi li kienet utilizzata f'test tat-tossiċità tal-pjanta qabel it-tfaċċar (QABEL) u/jew wara t-tfaċċar (WARA) li jinvolvi erbiċidi.
([7]) Tipprovdi eżempju/eżempji ta' fornituri ta' żrieragħ kummerċjali.
([8]) Tipprovdi żewġ referenzi alternattivi li ġew ikkonsultati.

Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati

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

REFERENZI ĊĊITATI

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W. Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

Appendiċi 4

Eżempji għal kundizzjonijiet ta' tkabbir xierqa għal ċerti speċijiet ta' pjanti

Il-kundizzjonijiet li ġejjin instabu li huma xierqa għal 10 speċijiet ta' pjanti, u jistgħu jintużaw bħala gwida għal testijiet f'ċerti kompartimenti ta' tkabbir b'ċerti speċijiet oħra wkoll:

Konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju: 350 ± 50 ppm;

Umdità relattiva: 70 ± 5 % matul perjodi ta' dawl u 90 ± 5 % matul perjodi fid-dlam;

Temperatura: 25 ± 3 °C matul il-jum, 20 ± 3 °C matul il-lejl;

Fotoperjodu: 16-il siegħa dawl /8 sigħat dlam, meta wieħed jassimi tul ta' mewġa medja ta' 400 sa 700 nm;

Dawl: luminanza ta' 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, imkejla fil-parti ta' fuq tal-kopertura.

L-ispeċijiet ta' pjanti huma:

— tadam (*Solanum lycopersicon*);

— ħjar (*Cucumis sativus*);

— ħass (*Lactuca sativa*);

— fażola tas-sojja (*Glycine max*);

— kaboċċi (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— zunnarija (*Daucus carota*);

— ħafur (*Avena sativa*);

— sikrana perenni (*Lolium perenne*);

— qamħirrum (*Zea mays*);

— basla (*Allium cepa*).

C.32. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ENCHYTRAEID**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar tal-OECD (TG) 220 (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva tad-dudu enchytraeid, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, fil-ħamrija. Huwa bbażat prinċipalment fuq metodu żviluppat minn Umweltbundesamt, il-Ġermanja (1) li sarlu ring test (2). Ġew ikkunsidrati wkoll metodi oħra għall-ittestjar tat-tossiċità tas-sustanzi kimiċi għal Enchytraeidae u l-ħniex (3)(4)(5)(6)(7)(8).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

2. L-annelidi li jgħixu fil-ħamrija tal-ġeneru Enchytraeus huma speċijiet ekoloġikament rilevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Filwaqt li l-enchytraeids, ħafna drabi jinstabu fil-ħamriji li fihom il-ħniex, huwa veru wkoll li ħafna drabi huma abundanti f'diversi ħamriji fejn ma jinstabux il-ħniex. Enchytraeids jistgħu jintużaw f'testijiet tal-laboratorju kif ukoll fi studji prattiċi u semiprattiċi. Minn perspettiva prattika, ħafna speċijiet ta' Enchytraeus huma faċli biex jiġu mmaniġġati u jitnisslu, u ż-żmien għall-ġenerazzjoni tagħhom huwa ferm iqsar milli għall-ħniex. It-tul għal test tar-riproduzzjoni b'enchytraeids huwa għalhekk biss 4-6 ġimgħat filwaqt li għall-ħniex (Eisenia fetida) huwa ta' 8 ġimgħat.

3. Informazzjoni bażika dwar l-ekoloġija u l-ekotossikoloġija ta' enchytraeids fl-ambjent terrestri tista' tinstab f'(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Il-ħniex enchytraeid adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta ma' ħamrija artifiċjali. It-test jista' jinqasam f'żewġ stadji: (a) test tas-sejba tal-medda, f'każ li tkun disponibbli biżżejjed informazzjoni, fejn il-mortalità hija l-punt ta' tmiem ivvalutata wara espożizzjoni ta' ġimagħtejn u (b) test tar-riproduzzjoni finali fejn huwa vvalutat in-numru totali ta' frieħ prodotti mill-annimal ġenitur u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul tat-test finali huwa sitt ġimgħat. Wara l-ewwel tliet ġimgħat, id-dud adult jitneħħa u jiġu rreġistrati l-bidliet morfoloġiċi. Wara tliet ġimgħat oħra, jingħadd in-numru ta' frieħ, imfaqqsa mill-fosdqiet prodotti mill-adulti. Il-prodozzjoni riproduttiva tal-annimali esposti għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) biex b'hekk l-EC_x imbagħad joħroġ mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. Is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma tal-ħamrija (eż. Kapitolu C.18 jew C.19 ta' dan l-Anness) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandhom preferibbilment ikunu magħrufa. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija, bħar-rati ta' fotolisi u idrolisi.

6. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser ivarja kif xieraq. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

VALIDITÀ TAT-TEST

7. Sabiex it-test ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin fil-kontrolli:

— il-mortalità tal-adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u wara l-ewwel tliet ġimgħat tat-test tar-riproduzzjoni.

— jekk wieħed jassumi li ntużaw 10 adulti f'kull reċipjent fil-konfigurazzjoni tat-test, medja ta' mill-anqas 25 frieħ f'kull reċipjent kellha tiġi prodotta fi tmiem it-test.

— il-koeffiċjent ta' varjazzjoni madwar in-numru medju ta' frieħ għandu jkun ogħla minn 50 % fi tmiem it-test tar-riproduzzjoni.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test għandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni għandha tiġi inkluża fir-rapport tat-test.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

8. Sustanza kimika ta' referenza għandha tiġi ttestjata f'intervalli regolari jew possibbilment inkluża f'kull test biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test ma nbidilx wisq maż-żmien. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija karbendażim, li ntweriet li taffettwa s-sopravivenza u r-riproduzzjoni ta' enchytraeids (13)(14), jew jistgħu jintużaw ukoll sustanzi kimiċi oħra li d-dejta tat-tossiċità tagħhom hija magħrufa sew. Formulazzjoni ta' karbendażim magħrufa bl-isem kummerċjali ta' Derosal ™ fornita minn AgrEvo Company (Frankfurt, il-Ġermanja) u li fiha 360 g/l (32,18 %) ingredjent attiv intużat f'ring test (2). L-EC_{50} għar-riproduzzjoni ddeterminata fir-ring test kienet fil-medda ta' 1,2 ± 0,8 mg ingredjent attiv (a.i) /kg massa xotta (2). Jekk standard tat-tossiċità pożittiv huwa inkluż fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli. Għal karbendażim, huwa rakkomandat l-ittestjar ta' 1,2 mg a.i./kg piż xott (ittestjat bħala formulazzjoni likwida).

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Tagħmir

9. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. Važetti tal-ħġieġ (eż. volum: 0,20 — 0,25 litru; dijametru: ≈ 6 cm) huma xierqa. Ir-reċipjenti għandu jkollhom għotjien trasparenti (eż. ħġieġ jew polietilen) li huma ddisinjati biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu l-iskambju tal-gass bejn il-ħamrija u l-atmosfera. Dawn l-għotjien għandhom ikunu trasparenti biex jgħaddi d-dawl minnhom.

10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— miter tal-pH u fotometru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'arja kondizzjonata;

— pinzetti, ganċijiet jew ingassi;

— photo basin.

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

11. F'dan it-test tintuża ħamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbażi tal-piżijiet xotti, li titnixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

— 10 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mitħun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli); huwa rakkomandat li jiġi vverifikat li ħamrija mħejjija b'lott ġdid ta' pit hija xieraqa għall-kulturi tad-dud qabel tintuża f'test;

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex tinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi l-iktar fuq il-kwalità/natura tal-pit;

— madwar 70 % ramel kwarzuż imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Huwa rakkomandabbli li tintwera l-adegwatezza ta' ħamrija artifiċjali għall-kulturi tad-dud u għall-ilħuq tal-kriterji tal-validità tal-ittestjar qabel tintuża l-ħamrija f'test finali. Huwa speċjalment rakkomandat li ssir tali verifika biex jiġi żgurat li l-prestazzjoni tat-test ma tkunx f'riskju jekk jitnaqqas il-kontenut ta' karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali, eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit għal 4-5 % u jiżdied il-kontenut ta' ramel kif xieraq. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tiżdied. Intwera li *Enchytraeus albidus* jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'ħamrija tal-għelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx milli ntqal hawn fuq (eż. 2,7 %) (15), u hemm esperjenza — għalkemm limitata — li dan jista' jintlaħaq ukoll f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit.

Nota: Meta tintuża ħamrija naturali f'ittestjar (eż. ta' livell ogħla) addizzjonali, għandha tintwera ukoll l-adegwatezza tal-ħamrija u l-ilħuq tal-kriterji tal-validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Dan għandu jsir tal-inqas darba f'ġimgħa qabel il-bidu tat-test. Il-ħamrija mħallta għandha tinħażen għal tal-inqas jumejn sabiex tiġi ekwilibrata/stabbilizzata l-aċidità. Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (16) u Appendiċi 3). Jekk il-ħamrija hija iktar aċidika mill-medda meħtieġa (ara l-paragrafu 11), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq tista' tiġi aġġustata billi tiżdied iktar taħlita, li ssir referenza għaliha fil-paragrafu 11, iżda li teskludi s-$CaCO_3$.

13. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jum jew jumejn qabel il-bidu tat-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali tal-ilma, li huwa ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' żamma tal-ilma. Fil-bidu tat-test, il-ħamrija mxarrba minn qabel tinqasam fi porzjonijiet li jikkorrispondu għan-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn ikun xieraq) u l-kontrolli użati għat-test. Il-kontenut ta' umdità huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massima biż-żieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-żieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 19-21). Il-kontenut ta' umdità huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test (billi jitnixxef għal piż kostanti f'105°C) u għandu jkun fi ħdan l-aħjar medda għas-sopravivenza tad-dud. Verifika approssimattiva tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija tista' tinkiseb billi l-ħamrija tingħasar bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umdità jkun tajjeb, għandhom jidhru qtar żgħar tal-ilma bejn is-swaba.

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi tal-ittestjar rakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (potworm abjad), membru tal-familja *Enchytraeidae* (ordni *Oligochaeta*, phylum *Annelida*). *E. albidus* hija waħda mill-akbar speċijiet ta' enchytraeids, bir-reġistrazzjoni ta' kampjuni sa 35 mm f'tul (17)(18). *E. albidus* għandha distribuzzjoni dinjija u tinstab fil-ħabitats tal-baħar, tal-ilma ħelu u terrestri, prinċipalment f'materja organika li tkun qiegħda titmermer (makroalgi tal-baħar, kompost) u rarament f'mergħat (9). It-tolleranza ekoloġika wiesgħa tagħha u xi varjazzjonijiet morfoloġiċi jaf jindikaw li jeżistu razez differenti.

15. *E. albidus* hija kummerċjalment disponibbli, bħala ikel għall-ħut. Għandu jiġi vverifikat jekk il-kultura hijiex kontaminata minn speċijiet oħrajn, ġeneralment iżgħar (1) (19). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jitlaħlaħ bl-ilma f'dixx petri. Imbagħad għandhom jintgħażlu kampjuni ta' adulti kbar ta' *E. albidus* (permezz ta' sterjomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida u d-dud l-ieħor kollu jintrema. *E. albidus* tista' titrabba faċilment f'firxa wiesgħa ta' materjali organiċi (ara l-Appendiċi 4). Iċ-ċiklu tal-ħajja ta' *E. albidus* huwa qasir peress li tilħaq il-maturità bejn it-33 jum (f'18 °C) u l-74 jum (f'12 °C) (1). Għat-test sejrin jintużaw biss dawk il-kulturi li nżammu mingħajr problemi fil-laboratorju għal tal-inqas 5 ġimgħat (ġenerazzjoni waħda).

16. Huma xierqa wkoll speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus*, pereżemju *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 jew *E. crypticus* Westheide u Graefe 1992 (ara l-Appendiċi 5). Jekk jintużaw speċijiet oħra ta' *Enchytraeus*, dawn għandhom jiġu identifikati b'mod ċar u għandu jiġi rrapportat ir-raġunament wara l-għażla tal-ispeċijiet.

17. L-annimali użati fit-testijiet huma dud adult. Dawn għandu jkollhom bajd (tikek bojod) fir-reġjun tal-klitellu, u għandhom ikollhom bejn wieħed u ieħor l-istess daqs (tul ta' madwar 1 cm). Mhijiex meħtieġa sinkronizzazzjoni tal-kultura tat-tnissil.

18. Jekk l-enchytraeids ma jitnisslux fl-istess tip ta' ħamrija u fl-istess kundizzjonijiet (inkluż it-tagħlif) użati għat-test finali, dawn għandhom jiġu akklimatizzati għal tal-inqas 24 siegħa u sa tliet ijiem. Inizjalment għandu jiġi akklimatizzat numru kbir ta' adulti minn dawk meħtieġa għat-twettiq tat-test biex ikun hemm skop għar-rifjut tal-kampjuni danneġġati jew inkella mhux adattati. Fi tmiem il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, jintgħażel biss id-dud li fih il-bajd u li ma jesebixxi ebda anormalità fl-imġiba (eż. jipprova jaħrab mill-ħamrija) għat-test. Id-dud jitneħħa b'attenzjoni permezz ta' pinzetti, ganċijiet jew ħoloq tal-ġojjellier u jitqiegħed f'dixx petri li jkun fih ammont żgħir ta' ilma ħelu. Ilma frisk rikostitwit kif propost fil-Kapitolu C.20 ta' dan l-Anness (Test tar-Riproduzzjoni *Daphnia magna*) huwa preferut għal dan il-fini peress li ilma tal-vit dejonizzat u demineralizzat jaf ikun ta' ħsara għad-dud. Id-dud jiġu spezzjonati taħt sterjomikroskopju u dak li ma jkollux bajd jintrema. Kwalunkwe dud irqiq jew springtail li jaf infetta l-kulturi jitneħħa jew jintrema b'attenzjoni. Dud b'saħħtu li ma jintużax għat-test jerġa' jitpoġġa' fil-kultura ewlenija.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità meħtieġ, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 13). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test titħawwad sew b'lott wieħed ta' ħamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma iżda li jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Il-veikolu jiġi sprejat fuq jew jitħallat b'ammont żgħir, pereżempju 2,5 g, ta' ramel kwarzuż irqiq. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taħt għata tad-dħaħen għal tal-inqas siegħa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umdità meħtieġa. It-taħlita finali tiġi introdotta fir-reċipjenti tat-test.

21. Għal sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwivalent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq f'kull reċipjent tat-test jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test mixtieqa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umdità meħtieġ. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.

22. Is-sustanzi kimiċi għandhom normalment jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet ogħla minn 1 000 mg/kg massa ta' ħamrija. Madankollu jaf ikun meħtieġ ittestjar f'konċentrazzjonijiet ogħla skont l-objettivi ta' test speċifiku.

EŻEKUZZJONI TAT-TESTIJIET

Gruppi tal-ittestjar u kontrolli

23. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, jitqiegħed ammont ta' ħamrija tat-test korrispondenti għal 20 g piż xott fir-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafi 19-21). Jiġu ppreparati wkoll kontrolli, mingħajr is-sustanza kimika tat-test. L-ikel jiżdied ma' kull reċipjent skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 29. Għaxar dud jiġu allokati b'mod

każwali f'kull reċipjent tat-test. Id-dud jiġi ttrasferit b'attenzjoni f'kull reċipjent tat-test u jitqiegħed f'wiċċ il-ħamrija permezz ta' pereżempju, pinzetti, ganċijiet jew ħoloq tal-ġojjellier. In-numru ta' repliki għal konċentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi fuq id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafu 34). Ir-reċipjenti tat-test jitqiegħdu b'mod każwali fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jiġu randomizzati mill-ġdid kull ġimgħa.

24. Jekk għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jintuża veikolu, għandha ssir serje ta' kontrolli waħda li fiha ramel kwarzuż isprejjat jew imħallat b'solvent minbarra s-serje tal-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test. Għandha ssir serje ta' kontrolli li fiha ramel kwarzuż addizzjonali (2,5 g f'kull reċipjent) għal sustanzi kimiċi li jeħtieġu li jingħataw skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 21.

Kundizzjonijiet tat-test

25. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. Biex id-dud jiġi skoraġġit milli joħroġ mill-ħamrija, it-test isir f'ċikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (idealment 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam) b'illuminazzjoni ta' bejn 400 u 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

26. Sabiex tiġi ċċekkjata l-umdità tal-ħamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu tat-test u minn hemm 'il quddiem darba f'ġimgħa. Iż-żieda ta' ammont xieraq ta' ilma dejonizzat tagħmel tajjeb għat-telf tal-piż. Ta' min jgħid li t-telf tal-ilma jista' jitnaqqas biż-żamma ta' umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.

27. Il-kontenut ta' umdità u l-pH għandhom jitkejlu fil-bidu u fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u t-test finali. Il-kejliet għandhom isiru f'kontroll u fil-kampjuni tal-ħamrija tal-kontroll u ttrattati (il-konċentrazzjonijiet kollha) imħejjin u miżmuma fl-istess mod bħall-kulturi tat-test iżda mingħajr dud. L-ikel għandu jiżdied ma' dawn il-kampjuni tal-ħamrija fil-bidu tat-test biex jiffaċilita l-attività mikrobjali. L-ammont ta' ikel miżjud għandu jkun l-istess bħal dak miżjud mal-kulturi tat-test. Mhuwiex meħtieġ li żżid iktar ikel ma' dawn ir-reċipjenti matul it-test.

Tagħlif

28. Jista' jintuża ikel li bih tkun tista' tgħħix popolazzjoni ta' enchytraeids. Ħafur irrumblat, preferibbilment mgħoddi minn awtoklavi qabel l-użu biex tevita l-kontaminazzjoni b'mikrobi (tisħin huwa xieraq ukoll), instab li huwa materjal ta' tagħlif xieraq.

29. L-ikel l-ewwel jiġi pprovdut billi jitħalltu 50 mg ħafur irrumblat tal-art mal-ħamrija f'kull reċipjent qabel ma jiddaħħal id-dud. Għalhekk, l-ikel huwa fornit kull ġimgħa sal-21 Jum. It-tagħlif ma jsirx fit-28 Jum peress li l-adulti jkunu tneħħew f'dan l-istadju u l-frieħ tad-dud jeħtieġu relattivament ftit ikel addizzjonali lil hinn dan il-punt. It-tagħlif matul it-test jinkludi 25 mg ħafur irrumblat irqiq għal kull reċipjent mqiegħed b'attenzjoni fuq wiċċ il-ħamrija biex b'hekk jiġi evitat li d-dud iweġġa'. Sabiex jitnaqqas it-tkabbir fungali, il-qxur tal-ħafur għandhom jinżergħu fil-ħamrija billi jiġu koperti b'ammonti żgħar ta' ħamrija. Jekk l-ikel jibqa' ma jittikilx, il-proporzjon għandu jitnaqqas.

Disinn għat-test tas-sejba tal-medda

30. Meta jkun meħtieġ, test tas-sejba tal-medda jitwettaq pereżempju b'ħames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (piż xott tal-ħamrija). Replikat wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti.

31. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija ġimagħtejn. Fi tmiem it-test, tiġi vvalutata l-mortalità tad-dud. Dudu huwa rreġistrat bħala mejjet jekk ma jkollu ebda reazzjoni bħala stimulu mekkaniku fil-parti anterjuri. Informazzjoni addizzjonali għall-mortalità jaf ukoll tkun utli biex tittieħed deċiżjoni dwar il-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandha tintuża fit-test finali. Il-bidliet fl-imġiba tal-adulti (eż. l-inabbiltà biex titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż.l-preżenza ta' feriti miftuħa) għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. Dan tal-aħħar jista' jiġi ddeterminat permezz tal-metodu ta' tilwin deskritt fl-Appendiċi 6.

32. L-LC_{50} jista' jiġi ddeterminat bejn wieħed u ieħor billi tiġi kkalkolata l-medja ġeometrika tad-dejta tal-mortalità. Fl-istabbilment tal-medda ta' konċentrazzjoni għat-test finali, wieħed jassumi li l-effetti huma inqas mil-LC_{50} b'fattur sa 10 darbiet. Madankollu, din hija relazzjoni empirika u fi kwalunkwe każ speċifiku jaf tkun differenti. Osservazzjonijiet addizzjonali li saru fit-test tas-sejba tal-medda bħall-okkorrenza tal-frieħ jistgħu jgħinu biex jirfinaw il-medda tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tintuża għat-test finali.

33. Sabiex ikun hemm determinazzjoni preċiża tal-LC_{50}, huwa rakkomandat li t-test jitwettaq b'tal-anqas erba' repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u numru adegwat tal-konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi medji differenti statistikament sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Numru simili ta' konċentrazzjonijiet u repliki għall-kontrolli jintużaw meta jkunu applikabbli.

Disinn għat-test tar-riproduzzjoni finali

34. Huma proposti tliet disinji abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test (2)

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati ħames konċentrazzjonijiet u l-konċentrazzjonijiet għandhom jibbrakitjaw f'EC_x sabiex jippermettu l-interpolazzjoni ta' EC_x u mhux estrapolazzjoni. Tal-inqas erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u erba' repliki ta' kontroll huma rakkomandati. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

35. Għandhom jintużaw għaxar dud adulti għal kull reċipjent tat-test (ara l-paragrafu 23). L-ikel jiżdied mar-reċipjenti fil-bidu tat-test u mbagħad darba f'ġimgħa (ara paragrafu 29) sal-21 Jum. Fil-21 Jum, il-kampjuni tal-ħamrija ssirihom tfittixija bir-reqqa bl-idejn u d-dud adulti ħajjin jiġu osservati u jingħaddu u jiġu rreġistrati l-bidliet fl-imġiba (eż. inabbiltà li titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u fil-morfoloġija (eż. feriti miftuħa). Id-dud adult mbagħad jitneħħa mir-reċipjenti tat-test u l-ħamrija tat-test. Il-ħamrija tal-ittestjar li fiha kwalunkwe fosdqa li kienu prodotti huma inkubati għal tliet ġimgħat addizzjonali taħt l-istess kundizzjonijiet tat-test ħlief dik li t-tagħlif iseħħ biss fil-Jum 35 (jiġifieri 25 mg ħafur tal-art irrumblat għal kull reċipjent).

36. Wara sitt ġimgħat, jingħadd id-dud li għadu kif faqqas. Il-metodu bbażat fuq tbajja ħomor ta' Bengal (ara l-Appendiċi 6) huwa rakkomandat għalkemm estrazzjoni mxarrba oħra (iżda mhux bis-sħana) u metodi ta' żamma fil-wiċċ (ara l-Appendiċi 6) ipprovaw ukoll li huma xierqa (4)(10)(11)(20). Tbajja ħomor ta' Bengal huma rakkomandati peress li l-estrazzjoni mxarrba minn sottostrat tal-ħamrija tista' titfixkel minn turbidità kkawżata minn frak tat-tafal suspiżi.

Test tal-limitu

37. Jekk ma jkunu osservati ebda effetti fuq l-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' 1 000 mg/kg sabiex jintwera li l-NOEC għar-riproduzzjoni huwa ikbar minn dan il-valur.

Sommarju u skeda taż-żmien għat-test

38. Il-passi tat-test jistgħu jinġabru fil-qosor kif ġej:

Ħin	Test tas-sejba tal-medda	Test finali
Jum −7 jew iktar kmieni	— Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlita ta' kostitwenti xotti)	— Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlita ta' kostitwenti xotti)
Jum −5	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija
Jum −5 sa −3	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni
Jum −3 sa 0	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa
Jum −1	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet
Jum 0	— Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen is-sottostrat tat-test fir-reċipjenti tat-test — Ħallat fl-ikel — Daħħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen sottostrat tal-ittestjar fir-reċipjenti tat-test — Ħallat fl-ikel — Daħħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità
Jum 7	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 14	— Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Numru stmat ta' frieħ — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 21		— Osserva l-imġiba tal-adulti — Neħħi l-adulti — Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 28		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Tagħlifx

Ħin	Test tas-sejba tal-medda	Test finali
Jum 35		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Agħlef
Jum 42		— Għodd id-dud frieħ — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

39. Ghalkemm tingħata ħarsa ġenerali fl-Appendiċi 7, ma tingħata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.

40. Fit-test tas-sejba tal-medda, il-punt ta' tmiem ewlieni huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. L-analiżi probit (21) jew ir-rigressjoni loġistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l-LC_{50}. Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (22), il-metodu Spearman-Karber trimmjat (23) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC_0 u LC_{100}, kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC_0 immoltiplikat b'LC_{100}).

41. Fit-test finali, il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-fekondità (jiġifieri numru ta' frieħ prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob l-medja aritmetika u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.

42. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-gradi ta' libertà, df, jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima tal-varjanza raggruppata mill-ANOVA u l-gradi tiegħu tal-libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependix fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġeneralment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull reċipjent bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli negattivi u tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wieħed minn dawk, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat li mhumiex sinifikament differenti (għal testijiet xierqa ara l-paragrafu 45 u l-Appendiċi 7).

43. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omoġenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

Stima tal-NOEC

44. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wieħed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimattiv normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omossedastiċità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza ħafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal omossedastiċità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet-t multipli bħat-test ta' Williams ($\alpha = 0{,}05$, naħa waħda) (24)(25) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (26)(27). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuġġerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minħabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotoniċità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm iktar devjazzjonijiet mill-omossedastiċità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi iktar mill-qrib biex

jiġi deċiż jekk it-testijiet-t jistgħux jiġu applikati mingħajr it-telf ta' ħafna qawwa (28). Inkella, test-U multiplu, eż. t-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (29), jew meta din id-dejta tesebixxi omossedastiċità iżda hija altrimenti konsistenti mar-rispons għad-doża ta' monoton sottostanti, jista' jiġi applikat test mhux parametriku ieħor [eż. Jonckheere-Terpstra (30) (31) jew Shirley (32) (33)] u ġeneralment ikun ippreferut minn testijiet-t tal-varjanza mhux indaqs. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 7).

45. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri parametriċi tal-ittestjar (normalità, omoġenità), jista' jintuża t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (29).

Estimi ta' EC_x

46. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x, jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat-tkabbir tad-dud bħala rispons kontinwu, il-valuri EC_x- jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (35). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza) u numru ta' wlied prodotti, huma l-funzjonijiet sigmoid, loġistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi wħud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddaħħlet b'analiżi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal-EC_x billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analiżi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney (21)) jew metodi xierqa moderni oħra.

47. Inkella, ir-rispons jiġu mmudellat bħala perċentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat bħala r-rispons medju ta' kontroll. F'dawn il-każijiet, il-kurva sigmoid (loġistika, Weibull) ħafna drabi tista' tiddaħħal fir-riżultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (21). F'dawn il-każijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (36). Madankollu, jekk tkun osservata ormeżi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni loġistika jew Weibull b'erba' parametri, imdaħħla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (36). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddaħħal mad-dejta, wieħed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l-EC_x, u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, bħall-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (22) u l-proċedura Spearman-Karber Trimmjata (23).

RAPPORT TAT-TEST

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

Sustanza kimika tat-test:

— in-natura fiżika u, fejn ikunu rilevanti, il-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar);

— l-identifikazzjoni kimika tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura ta' IUPAC, in-numru CAS, il-grupp, il-lott, il-formula strutturali u l-purità;

— id-data ta' skadenza tal-kampjun.

Speċijiet tat-test:

— l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet ta' tgħammir.

Kundizzjonijiet tat-test:

— l-ingredjenti u l-preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali;

— il-metodu ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— id-deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-test, inkluż it-temperatura, il-kontenut ta' umdità, il-pH, eċċ;

— deskrizzjoni sħiħa tad-disinn u l-proċedura sperimentali.

Riżultati tat-test:

— il-mortalità tad-dud adult wara ġimagħtejn u n-numru ta' frieħ fi tmiem tat-test tas-sejba tal-medda;

— il-mortalità tad-dud adult wara espożizzjoni ta' tliet ġimgħat u r-rekord sħiħ tal-frieħ fi tmiem it-test finali;

— kwalunkwe sintomu fiżiku jew patoloġiku osservat u l-bidliet fl-imġiba fl-organiżmi tat-test;

— l-LC_{50}, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC_{50}, EC_{10}) għar-riproduzzjoni jekk xi wħud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossiċità għall-Ħniex.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

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

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redisc-ription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslo-vensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

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

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, huma applikabbli d-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test fil-perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test.

LC_0 (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wieħed mill-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_0 hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{50} (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organiżmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{50} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{100} (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{100} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LOEC (Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$). F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dawn ta' fuq fl-identifikazzjoni tal-LOEC għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taħt l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata ta' riproduzzjoni hija n-numru medju ta' dud frieħ prodott għal kull numru ta' adulti matul il-perjodu tal-ittestjar.

Sustanza kimika tal-ittestjar hija sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima ta' ilma tal-ħamrija artifiċjali

Il-metodu li ġej instab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2.

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tat-test permezz ta' apparat xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru u, wara li timlieh bl-ilma u, qiegħdu fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li ma jistax jinżamm l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ramel kwarzuż mitħun irqiq imxarrab ħafna li huwa inkluż f'reċipjent magħluq (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f' \% ta' massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH ta' kampjun tal-ħamrija, huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO 10390 (Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH).

Kwantità ddefinita tal-ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti. Wara li titħawwad, is-sospensjoni titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

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

Appendiċi 4

Kundizzjonijiet ta' kulturi ta' *Enchytraeus sp.*

L-enchytraeids tal-ispeċi*Enchytraeus albidus* (kif ukoll speċijiet *Enchytraeus* oħra) jistgħu jiġu kkulturati f'kaxex tal-plastik kbar (eż. 30 × 60 × 10 cm) mimlija b'taħlita 1:1 ta' ħamrija artifiċjali u ħamrija tal-ġnien, naturali mhux ikkontaminata. Materjal kompost għandu jiġi evitat peress li jaf ikun fih sustanzi kimiċi tossiċi bħal metalli tqal. Il-fawna għandha titneħħa mill-ħamrija qabel l-użu (eż. permezz ta' ffriżar qawwi). Jista' jintuża wkoll sottostrat li jinkludi biss ħamrija artifiċjali, iżda r-rata ta' riproduzzjoni tista' tkun inqas minn dik miksuba b'sottostrat ta' ħamrija mħallta. Is-sottostrat użat għall-kulturi għandu jkollu pH ta' 6,0 ± 0,5.

Il-kutura tinżamm fid-dlam f'temperatura ta' 15 sa 20 °C ± 2 °C. Temperaturi ogħla minn 23 °C għandhom jiġu evitati. Il-ħamrija għandha tinżamm umda iżda mhux imxarrba. Il-kontenut it-tajjeb ta' umdità fil-ħamrija huwa indikat meta jidhru qtar żgħar ta' ilma bejn is-swaba' meta l-ħamrija tingħafas ġentilment. Il-produzzjoni ta' kundizzjonijiet anossiċi għandha tiġi evitata billi jiġi żgurat li l-għotjien tal-konteni turi tal-kulturi jippermettu skambju gassuż xieraq mal-atmosfera. Il-ħamrija għandha tinqassam kull ġimgħa biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni.

Id-dud jista' jintema' b'ħafur irrumblat. Il-ħafur għandu jinħażen f'reċipjenti ssiġillati u awtoklavat jew imsaħħan qabel l-użu sabiex tiġi evitata infestazzjoni b'dud tad-dqiq (eż. *Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina*) jew b'dud predatur [eż. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles, Gamasida, Acarina*]. Wara trattament bl-isħana, l-ikel għandu jintaħan biex b'hekk ikun jista' jinxtered faċilment fuq wiċċ il-ħamrija. Minn żmien għall-ieħor, il-ħafur irrumblat jista' jiġi ssupplimentat b'żieda ta' vitamini, ħalib u żejt tal-fwied tal-merluzz. Sorsi ta' ikel xierqa oħra huma l-ħmira tal-furnar u l-ikel tal-ħut 'Tetramin'.

It-tagħlif isir bejn wieħed u ieħor darbtejn fil-ġimgħa. Kwantità xierqa ta' ħafur irrumblat jinxtered fuq wiċċ il-ħamrija jew jitħallat b'attenzjoni fis-sottostrat meta tinqasam il-ħamrija biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni. L-ammont assolut ta' ikel ipprovdut jiddependi fuq in-numru ta' dud preżenti fis-sottostrat. Bħala gwida, l-ammont ta' ikel għandu jiżdied jekk jiġi kkunsmat kollu fi żmien jum minn meta jiġi pprovdut. Bil-maqlub, jekk l-ikel xorta jibqa' fuq il-wiċċ fiż-żmien tat-tieni tagħif (ġimgħa wara) dan għandu jitnaqqas. L-ikel ikkontaminat bit-tkabbir fungali għandu jitneħħa u jiġi ssostitwit. Wara tliet xhur, id-dud għandu jiġi ttrasferit f'sottostrat li għadu kif jiġi ppreparat.

Il-kundizzjonijiet tal-kulturi jitqiesu sodisfaċenti jekk id-dud: (a) ma jippruvawx jitilqu mis-sottostrat tal-ħamrija, (b) jiċċaqalqu rapidament fil-ħamrija, (c) jesibixxu qoxra tleqq mingħajr frak tal-ħamrija aderenti, (d) bejn wieħed u ieħor għandhom kulur abjad, (e) jesibixxu varjetà ta' meded ta' etajiet fil-kulturi u (f) jirriproduċu b'kontinwità.

Appendiċi 5

Twettiq tat-test bi speċijiet *Enchytraeus* oħra

Għażla ta' speċijiet

Jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn minbarra *E. albidus* iżda l-proċedura tal-ittestjar u l-kriterji tal-validità għandhom jiġu adattati skont dan. Peress li ħafna speċijiet *Enchytraeus* huma disponibbli minnufih u jistgħu jinżammu b'mod sodisfaċenti fil-laboratorju, il-kriterju l-iktar importanti għall-għażla ta' speċi differenti minn *E. albidus* hija r-rilevanza ekoloġika, kif ukoll is-sensittività paragunabbli. Jista' jkun hemm ukoll raġunijiet formali għal skambju ta' speċi. Pereżempju, f'pajjiżi fejn ma tinstabx *E. albidus* u ma tistax tiġi importata (eż. minħabba restrizzjonijiet ta' kwarantina), sejjer ikun meħtieġ li tintuża speċi *Enchytraeus* oħra.

Eżempji ta' speċijiet alternattivi xierqa

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): F'dawn l-aħħar snin, din l-ispeċi ħafna drabi ntużat f'studji ekotossikoloġiċi minħabba s-sempliċità tat-tgħammir u l-ittestjar tagħha. Madankollu, hija żgħira u dan jagħmel l-immaniġġar iktar diffiċli meta mqabbel ma' *E. albidus* (speċjalment fl-istadji qabel l-użu tal-metodu ta' tilwin). *E. crypticus* ma ħariġx li teżisti b'ċertezza fis-sit, peress li ġiet deskritta biss minn kulturi ta' ħniex. Għalhekk, ir-rekwiżiti ekoloġiċi tagħha mhumiex magħrufa.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Dan l-isem probabbilment li jkopri grupp ta' speċijiet relatati mill-qrib li huma morfoloġikament diffiċli biex jintgħarfu. L-użu tiegħu għall-ittestjar mhuwiex rakkomandat sakemm l-individwi użati f'test jistgħu jiġu identifikati mal-ispeċi. *E. buchholzi* ġeneralment tinstab f'mergħat u f'siti disturbati bħala ġniebi tat-toroq.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Din l-ispeċi kienet oriġinarjament magħrufa bħala *E. 'minutus'*, iżda ġiet deskritta dan l-aħħar (1). Instabet l-ewwel minn U. Graefe (Hamburg) f'mergħa qrib St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, il-Ġermanja). *E. luxuriosus* hija madwar nofs id-daqs ta' E. albidus iżda ikbar mill-ispeċijiet l-oħra diskussi hawnhekk; dan jista' jagħmila alternattiva tajba għal *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Din l-ispeċi s'issa kienet irrapportata minn ħamriji minerali Ġermaniżi u Spanjoli, fejn hija komuni iżda ġeneralment mhux abbundanti ħafna. Meta mqabbla ma' speċijiet żgħar oħra ta' dan il-ġeneru, hija relattivament faċli biex tiġi identifikata. Xejn mhu magħruf dwar l-imġiba tagħha fit-testijiet tal-laboratorju jew is-sensittività tagħha għas-sustanzi kimiċi. Madankollu, instab li hija faċli biex tiġi kkulturata (E. Belotti, komunikazzjoni personali).

Kundizzjonijiet tat-tgħammir

L-ispeċijiet ta' *Enchytraeus* kollha msemmija hawn fuq jistgħu jiġu kkulturati fl-istess sottostrati użati għal *E. albidus*. Id-daqs żgħir tagħhom ifisser li r-reċipjenti tal-kultura jistgħu jkunu iżgħar u li, filwaqt li jista' jintuża l-istess ikel, id-daqs tal-proporzjon għandu jiġi aġġustat. Iċ-ċiklu tal-ħajja ta' dawn l-ispeċijiet huwa iqsar milli għal *E. albidus* u t-tagħlif għandu jsir b'mod iktar frekwenti.

Kundizzjonijiet tat-test

Il-kundizzjonijiet tat-test huma ġeneralment l-istess bħal dawk li japplikaw għal *E. albidus*, ħlief li:

— id-daqs tar-reċipjent tat-test jista' (iżda ma għandux bżonn) ikun iżgħar; id-durata tat-test tar-riproduzzjoni jista' (iżda ma għandux bżonn) ikun iqsar, jiġifieri erba' ġimgħat minflok sitta;

— madankollu, id-durata tat-Test tas-Sejba tal-Medda ma għandhiex titbidel;

— fid-dawl tad-daqs żgħir tad-dud frieħ, l-użu ta' metodu ta' titbigħ huwa rakkomandat b'mod qawwi għall-għadd;

— il-kriterju ta' validità relatat man-'numru ta' frieħ għal kull reċipjent tat-test fil-kontroll' għandu jitbidel għal '50'.

REFERENZI

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

Appendiċi 6

Deskrizzjoni ddettaljata tat-tekniki ta' estrazzjoni

Titbigħ b'aħmar ta' Bengal

Dan il-metodu, li oriġinarjament ġie żviluppat f'ekoloġija limnika (1) kien propost l-ewwel darba għall-għadd ta' enchytraeids frieħ fit-test tar-riproduzzjoni ta' Enchytraeidae minn W. de Coen (Università ta' Ghent, il-Belġju). Indipendentement, verżjoni mmodifikata (Bengalred imħallat b'formaldeid minflok etanol) kienet żviluppata minn RIVM Bilthoven (2)(3).

Fi tmiem it-test finali (jiġifieri wara sitt ġimgħat), il-ħamrija fir-reċipjent tat-test tiġi ttrasferita għal kontenitur baxx. Reċipjent Bellaplast jew photo basin b'qiegħ imqabbeż huwa utli għal dan il-fini, dan tal-aħħar peress li l-'kustilji' jillimitaw il-moviment tad-dud fil-qasam ta' osservazzjoni. Il-frieħ huma fissi mal-etanol (madwar 5 ml għal kull replikat). Imbagħad ir-reċipjenti jimtlew bl-ilma sa strat ta' 1 sa 2 cm. Jiżdiedu ftit qtar (200 sa 300 μl) ta' Bengal red (1 % soluzzjoni fl-etanol) (0,5 % eosin hija alternattiva) u ż-żewġ komponenti jitħalltu b'attenzjoni. Wara 12-il siegħa, id-dud għandu jittebba' b'kulur ħamrani u għandu jkun faċli biex jingħadd peress li sejjer jitqiegħed fuq wiċċ is-sottostrat. Inkella, it-taħlita tas-sottostrat/alkoħol tista' tinħasel permezz ta' passatur (daqs tax-xibka: 0,250 mm) qabel ma jingħadd id-dud. Permezz ta' din il-proċedura, il-kaolinit, il-pit, u xi parti mir-ramel sejjer jinħasel u wieħed sejjer ikun jista' jara u jgħodd id-dud b'kulur ħamrani. L-użu ta' lentijiet illuminati (daqs tal-lenti tal-inqas 100 × 75 mm b'fattur ta' ingrandiment ta' 2 sa 3x) sejjer jiffaċilita wkoll l-għadd.

It-teknika ta' titbigħ tnaqqas il-ħin ta' għadd għal ftit minuti f'kull reċipjent u bħala gwida għandu jkun possibbli għal kull persuna li tivvaluta r-reċipjenti kollha minn test wieħed f'massimu ta' jumejn.

Estrazzjoni mxarrba

L-estrazzjoni mxarrba għandha tinbeda mill-ewwel malli jintemm it-test. Il-ħamrija minn kull reċipjent tat-test titqiegħed f'passaturi tal-plastik b'daqs tax-xibka ta' madwar 1 mm. Il-passaturi mbagħad jiġu sospiżi fi skutelli tal-plastik mingħajr ma jintmess il-qiegħ. L-iskutelli jimtlew b'attenzjoni bl-ilma sakemm il-kampjuni fil-passaturi jkunu kompletament taħt wiċċ l-ilma. Biex tiġi assigurata rata ta' rkupru ta' iktar minn 90 % tad-dud preżenti, għandu jintuża perjodu ta' estrazzjoni ta' 3 ijiem f'20 ± 2 °C. Fi tmiem il-perjodu ta' estrazzjoni, il-passaturi jitneħħew u l-ilma (ħlief għal ammont żgħir) jitferra' bil-mod, b'attenzjoni biex ma jiġix iddisturbat in-naqal f'qiegħ l-iskutelli. L-iskutelli tal-plastik imbagħad jitħalltu ftit biex in-naqal jiġi sospiż fl-ilma tal-madwar. L-ilma huwa ttrasferit f'dixx petri wara li l-frak tal-ħamrija jkun qagħad), l-enchytraeids jistgħu jiġu identifikanti, jitneħħew u jingħaddu permezz ta' sterjomikroskopju u pinzetti tal-azzar rotob.

Żamma fil-wiċċ

Metodu bbażat fuq iż-żamma fil-wiċċ ġie deskritt f'nota minn R. Kuperman (4). Wara li jiġu stabbiliti l-kontentut tar-reċipjenti tat-test b'etanol, il-ħamrija titfawwar b'Ludox (AM-30 silika kollojdali, 30 wt. % sospensjoni fl-ilma) bejn 10 sa 15-il mm 'il fuq minn wiċċ il-ħamrija. Wara li l-ħamrija titħallat sew mal-aġent ta' flotazzjoni għal 2 — 3 minuti, id-dud frieħ li jkun jinsab fil-wiċċ jista' jingħadd faċilment.

REFERENZI

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

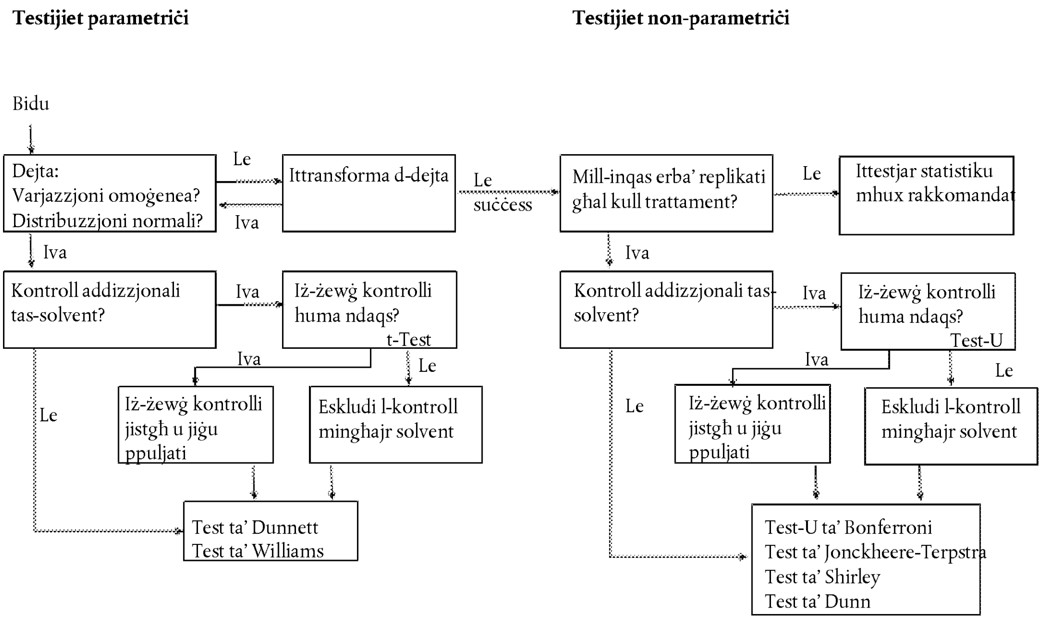
(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta, Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

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

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

Appendiċi 7

Ħarsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)



C.33. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦNIEX (*EISENIA FETIDA*/ *EISENIA ANDREI*)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 222 tal-OECD (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva (u punti ta' tmiem letali oħra) tal-ispeċijiet ta' ħniex *Eisenia fetida* (Savigny 1826) jew *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). It-test sarlu ring test (3). Jeżisti metodu ta' ttestjar għat-tossiċità akuta tal-ħniex (4). Ġew ippubblikati numru ta' linji gwida internazzjonali u nazzjonali oħra għal testijiet akuti u kroniċi tal-ħniex (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* huma kkunsidrati bħala wieħed mir-rappreżentanti tal-fawna tal-ħamrija u l-ħniex b'mod partikolari. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-ħniex u l-użu tagħhom fl-ittestjar ekotossikoloġiku (7)(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Id-dud adult huwa espost għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallata mll-ħamrija jew, fil-każ ta' pestiċidi, applikati fil-ħamrija jew ġo fiha permezz ta' proċeduri konsistenti mal-mudell ta' użu tas-sustanza kimika. Il-metodu ta' applikazzjoni huwa speċifiku għall-fini tat-test. Il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test huwa magħżul biex jinkludi dawk li x'aktarx jikkawżaw effett sottoletali jew letali f'perjodu ta' tmien ġimgħat. Il-mortalità u l-effetti ta' tkabbir fuq id-dud adult huma ddeterminati wara 4 ġimgħat ta' espożizzjoni. L-adulti mbagħad jitneħħew mill-ħamrija u l-effetti fuq ir-riproduzzjoni vvalutati wara 4 ġimgħat oħra billi jingħadd in-numru ta' wlied preżenti fil-ħamrija. Il-produzzjoni riproduttiva tad-dud hija esposta għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) biex b'hekk l-EC_x imbagħad tiġi mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. L-informazzjoni li ġejja relatata mas-sustanza kimika tat-test għandha tkun disponibbli biex tassisti fid-disinn ta' proċeduri tat-test xierqa:

— is-solubbiltà fl-ilma;

— log K_{ow};

— il-pressjoni tal-fwar;

— u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba fl-ambjent, fejn ikun possibbli (eż. ir-rata ta' fotoliżi u r-rata ta' idroliżi fejn ikun rilevanti għal xejriet ta' applikazzjoni).

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha, irrispettivament mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, iddefiniti hawnhekk bħala sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-partizzjoni tal-arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew għas-sustanzi kimiċi bi pressjonijiet tal-fwar li jaqbzu 0,0133 Pa f'25 °C.

6. Ma ssir ebda konċessjoni f'dan il-metodu ta' ttestjar għal degradazzjoni possibbli tas-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tat-test. Għaldaqstant, wieħed ma jistax jassumi li l-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni sejrin jinżammu fil-valuri inizjali matul it-test kollu. Hija rakkomandata analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test f'dak il-każ.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. L-NOEC u/jew l-EC_x ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tal-ittestjar ma jinbidilx statistikament maż-żmien. Huwa rakkomandabbli li sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata tal-inqas darba f'sena jew, meta jitwettaq ittestjar bi frekwenza iktar baxxa, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test. Karbendażim jew benomil huma sustanzi kimiċi ta' referenza xierqa li ntwerew li jaffettwaw ir-riproduzzjoni (3). Għandhom jiġu osservati effetti sinifikanti bejn (a) 1 u 5 mg ta' massa xotta tas-sustanza attiva (a.i.)/kg jew (b) 250-500 g/ha jew 25-50 mg/m^2. Jekk standard tat-tossiċità pożittiv huwa inkluż fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli.

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

— kull replikat (li fih 10 adulti) li jkun ipproduċa ≥ 30 ferħ sa tmiem it-test;

— il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproduzzjoni li għandu jkun ta' ≤ 30 %;

— il-mortalità tal-adulti matul l-4 ġimgħat inizjali tat-test li għandha tkun ta' ≤ 10 %.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test għandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni għandha tiġi inkluża fir-rapport.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Tagħmir

9. Għandhom jintużaw żewġ kontenituri tal-ittestjar li huma magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor ta' kapaċità ta' litru sa żewġ litri. Il-kontenituri għandu jkollhom erja transsettorjali ta' madwar 200 cm^2 biex b'hekk jinkiseb sottostrat ta' umdità li huwa fond madwar 5-6 cm meta tiżdied massa ta' sottostrat xotta ta' 500 sa 600 g. Id-disinn tal-għatu tal-kontenitur għandu jippermetti l-iskambju gassuż bejn is-sottostrat u l-atmosfera u l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jiġi evitat li d-dud jaħrab. Jekk l-ammont tas-sottostrat tat-test użat huwa sostanzjalment iktar minn 500 sa 600 g għal kull kontenitur tal-ittestjar, in-numru ta' dud għandu jiżdied proporzjonalment.

10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— miter tal-pH u fotometru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'arja kondizzjonata;

— pinzetti, ganċijiet jew ingassi;

— banjumarija.

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

11. F'dan it-test tintuża ħamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbażi tal-piżijiet xotti, li titnixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

— 10 fil-mija tal-pit ta' sfanju (qrib kemm jista' jkun għal pH 5,5-6,0, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, mithun irqiq, imnixxef għal kontenut ta' umdità mkejjel);

— 20 fil-mija tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 fil-mija);

— 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad tal-analiżi) biex jinkiseb pH inizjali ta' 6,0 ± 0,5.

— 70 % ramel kwarzuż imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-ħamrija inkluż l-ikel, u għandu jiġi ddeterminat mill-kejliet tas-sottokampjuni tal-ħamrija eżattament qabe it-test. Il-pH jitkejjel f'kampjun imħallat f'1 M ta' soluzzjoni ta' klorur tal-potassju (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) (13).

Nota 2: Il-kontenut tal-karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali jaf jitnaqqas eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit sa 4-5 % u jiżdied il-kontenut ta' pit skont dan. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tiżdied. Intwera li Eisenia fetida jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'ħamrija tal-għelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx (eż. 2,7 %) (14), u hemm esperjenza li dan jista' jintlaħaq ukoll f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit. Għalhekk, mhuwiex meħtieġ qabel tintuża tali ħamrija f'test finali li tintwera l-adegwatezza tal-ħamrija artifiċjali biex it-test ikun jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità sakemm il-kontenut tal-pit jitbaxxa iktar minn dak speċifikat hawn fuq.

Nota 3: Meta tintuża ħamrija naturali f'ittestjar addizzjonali (eż. ta' livell ogħla), għandha tintwera wkoll l-adegwatezza tal-ħamrija u l-ilħuq tal-kriterji ta' validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira) f'żoni b'ventilazzjoni tajba. Qabel jinbeda t-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab billi jiżdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 % sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima (li tikkorrispondi għal 50 ± 10 % tal-massa xotta ta' umdità). Dan sejjer jipproduċi sottostrat li ma għandu ebda ilma permanenti jew liberu meta jiġi kkompressat bl-idejn. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2, ISO 11274 (15) jew standard tal-UE ekwivalenti.

13. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi applika fuq wiċċ il-ħamrija jew titħallat fil-ħamrija mingħajr l-ilma, l-ammont finali tal-ilma jista' jitħallat fil-ħamrija artifiċjali matul il-preparazzjoni tal-ħamrija. Jekk is-sustanza kimika tat-test titħallat fil-ħamrija flimkien ma' xi ilma, l-ilma addizzjonali jista' jiżdied flimkien mas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 19).

14. Il-kontenut ta' umdità fil-ħamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test skont ISO 11465 (16) jew l-istandard tal-UE ekwivalenti, u l-pH tal-ħamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti. Dawn id-determinazzjonijiet għandhom jitwettqu f'kampjun ta' ħamrija ta' kontroll u kampjun ta' kull ħamrija ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-ħamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċidużi jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi l-kontenituri jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 26 u 30).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

15. L-ispeċi użata fit-test hija *Eisenia fetida* jew *Eisenia andrei* (1)(2). Biex jinbeda t-test huwa meħtieġ dud adult li għandu bejn xahrejn u sena u bi klitellu. Id-dud għandu jintgħażel minn kultura sinkronizzata bi struttura ta' età relattivament omoġenja (Appendiċi 4). L-individwi f'grupp tal-ittestjar ma għandhomx ikunu differenti fl-età b'aktar minn 4 ġimgħat.

16. Id-dud magħżul għandu jiġi akklimatizzat għal tal-inqas jum bit-tip ta' sottostrat ta' ħamrija artifiċjali li għandu jintuża għat-test. Matul dan il-perjodu, id-dud għandu jingħalef bl-istess ikel li għandu jintuża fit-test (ara l-paragrafi 31 sa 33).

17. Gruppi ta' 10 dud għandhom jintiżnu individwalment biex il-gruppi jiġu assenjati b'mod każwali għall-kontenituri tat-test fil-bidu tat-test. Id-dud jinħasel qabel ma jintiżen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit ħin fuq il-karta filtru. Il-massa mxarrba tad-dud individwali għandha tkun bejn 250 u 600 mg.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

18. Jistgħu jintużaw żewġ metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (ara l-paragrafi 19-21) jew l-applikazzjoni ma' wiċċ il-ħamrija (ara l-paragrafi 22-24). L-għażla tal-metodu xieraq tiddependi fuq il-fini tat-test. B'mod ġenerali, huwa rakkomandat it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madankollu, jaf ikunu meħtieġ proċeduri għal applikazzjoni li huma konsistenti bi prattika agrikola normali (eż. l-isprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pestiċidi speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa). Is-solventi użati fit-trattament tal-għajnuna tal-ħamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossiċità baxxa tagħhom għall-ħniex u għandu jiġi inkluż kontroll tas-solventi xieraq fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 27).

It-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat tiġi ppreparata immedjatament qabel jinbeda t-test f'kwantità biżżejjed għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni waħda. Jaf ikun meħtieġ kosolvent biex tiġi ffaċilitata l-preparazzjoni tas-soluzzjoni tat-test. Huwa konvenjenti li tipprepara ammont ta' soluzzjoni meħtieġa biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità finali (40 sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima). Is-soluzzjoni titħallat sew mas-sottostat tal-ħamrija qabel tiġi introdotta f'kontenitur tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Is-sustanza kimika tat-test tinħall f'volum żgħir ta' solvent organiku xieraq (eż. aċetun) u mbagħad tiġi sprejjata fuq kwantità żgħira ta' ramel kwarzuż irqiq. Imbagħad is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni f'għatu għad-dħaħen għal tal-inqas żewġ minuti. Ir-ramel ittrattat imbagħad jitħallat sew mal-ħamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jitħallat miegħu ilma dejonizzat (ammont meħtieġ) biex jintlaħaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' żamma tal-ilma. Imbagħad il-ħamrija tkun lesta biex titqiegħed f'reċipjenti tal-kontenituri tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li xi solventi jaf ikunu tossiċi għall-ħniex.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma u solventi organiċi

21. Tiġi ppreparata taħlita li tinkludi 10 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq bi kwantità tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa biex tintlaħaq il-konċentrazzjoni tat-test fil-ħamrija. It-taħlita mbagħat titħallat sew bil-ħamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jitħallat miegħu ilma dejonizzat (ammont meħtieġ) biex jintlaħaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima. Il-ħamrija mbagħad tkun lesta biex titqiegħed f'reċipjenti tal-kontenituri tat-test.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija

22. Il-ħamrija tiġi ttrattata wara li jiżdied id-dud. Il-kontenituri tat-test l-ewwel jimtlew bis-sottostrat ta' ħamrija umda u d-dud miżun jitqiegħed fuq il-wiċċ. Dud b'saħħtu normalment iħaffer toqba mill-ewwel fis-sottostrat u għaldaqstant dak kollu li jibqa' fuq il-wiċċ wara 15-il minuta jiġi ddefinit bħala danneġġjat u għandu jiġi ssostitwit. Jekk id-dud jiġi sostitwit, dak ġdid u dak sostitwit għandu jintiżen biex b'hekk il-piż ħaj totali tal-grupp ta' espożizzjoni tad-dud u l-piż totali tal-kontenitur bid-dud fil-bidu jkun magħruf.

23. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata. Ma għandhiex tiżdied mal-ħamrija fi żmien nofs siegħa mill-introduzzjoni tad-dud (jew jekk id-dud ikun preżenti fuq wiċċ il-ħamrija) biex b'hekk tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta għas-sustanza kimika tat-test b'kuntatt mal-ġilda. Meta s-sustanza kimika tat-test hija pestiċida jaf ikun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija billi tiġi sprejata. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija kemm jista' jkun b'mod uniformi permezz ta' apparat tal-isprejjar fuq skala tal-laboratorju xierqa biex tiġi stimulata l-applikazzjoni tal-isprej fis-sit. Qabel l-applikazzjoni, l-għatu tal-kontenitur tal-ittestjar għandu jitneħħa u jiġi sostitwit minn inforra li tipproteġi l-ħitan tal-ġenb tal-kontenitur mill-isprej. L-inforra tista' tkun magħmula minn kontenitur tat-test bil-bażi mneħħija. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura ta' 20 ± 2 °C ta' varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni ta' bejn 600 u 800 $\mu l/m^2$. Ir-rata għandha tiġi vverifikata permezz ta' teknika ta' kalibrazzjoni xierqa. Għandhom jiġu applikati formulazzjonijiet speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa b'mod konsistenti mal-użu agrikolu.

24. Il-kontenituri tat-test għandhom jitħallew miftuħa għal perjodu ta' siegħa biex jippermettu l-evaporazzjoni tas-solvent volatili assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tingħata attenzjoni biex l-ebda dud ma jaħrab mir-reċipjenti tat-test f'dan il-perjodu ta' ħin.

PROĊEDURA

Gruppi tat-test u kontrolli

25. Hija rakkomandata tagħbija ta' 10 ħniex f'500 — 600 mg ta' massa xotta ta' ħamrija artifiċjali (jiġifieri 50-60 mg ta' ħamrija għal kull dudu). Jekk jintużaw kwantitajiet ikbar ta' ħamrija, kif jista' jkun il-każ fil-pestiċidi tat-test b'mod speċjali ta' applikazzjoni bħall-kisi taż-żerriegħa, it-tagħbija ta' 50-60 g ta' ħamrija għal kull dudu għandha tinżamm billi jiżdied in-numru ta' dud. Għal kull kontroll jiġu ppreparati għaxar dud u kontenitur ta' trattament. Id-dud jinħasel bl-ilma u jintmesaħ u mbagħad jitqiegħed fuq karta assorbenti għal perjodu qasir biex l-ilma żejjed ikun jista' jissaffa.

26. Biex jiġu evitati żbalji sistematiċi fid-distribuzzjoni tad-dud fil-kontenituri tal-ittestjar, l-omoġenità tal-popolazzjoni tat-test għandha tiġi ddeterminata billi jintiżnu b'mod individwali 20 dudu li ttieħed kampjun tagħhom b'mod każwali mill-popolazzjoni li minnha għandhom jittieħdu d-dud tat-test. Wara li tiġi żgurata l-omoġenità, jintgħażlu, jintiżnu u jiġu assenjati lottijiet ta' dud f'kontenituri tat-test permezz ta' proċedura ta' randomizzazzjoni. Wara ż-żieda tad-dud tat-test, għandu jitkejjel il-piż ta' kull kontenitur tal-ittestjar biex jiġi żgurat li jkun hemm piż inizjali li jista' jintuża bħala l-bażi għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija matul it-test kollu kif deskritt fil-paragrafu 30. Imbagħad il-kontenituri tat-test jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 9 u jitqiegħdu f'kompartiment tat-test.

27. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wieħed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 18 sa 24. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli ħlief li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti konsistenti ma' dawk użati fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu ieħor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test biex jiġi żgurat li l-veikolu ma għandu ebda piż fuq ir-riżultat.

Kundizzjonijiet tat-test

28. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. It-test jitwettaq taħt ċikli fid-dawl u fid-dlam kkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa fid-dawl u 8 sigħat fid-dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

29. Il-kontenituri tat-test mhumiex ossiġenati matul it-test iżda d-disinn tar-reċipjenti tat-test għandu jipprovdi opportunità għall-iskambju ta' gass filwaqt li jillimita l-evaporazzjoni ta' umdità (ara paragrafu 9).

30. Il-kontenut ta' ilma tas-sottostrat ta' ħamrija fil-kontenituri tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jerġgħu jiġu ppeżati l-kontenituri tat-test (mingħajr l-għotjien tagħhom) perjodikament. It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' ilma ma għandux ivarja b'aktar minn 10 % minn dak fil-bidu tat-test.

Tagħlif

31. Kwalunkwe ikel ta' kwalità li ntwera li huwa xieraq għal tal-inqas għaż-żamma tal-piż tad-dud matul it-test, huwa kkunsidrat aċċettabbli. L-esperjenza wriet li l-ħafur, id-demel tal-baqar jew iż-żwiemel huwa ikel adattat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumiex soġġetti għal medikazzjoni jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematiċidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod ħażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel tal-baqar miġbur b'mod proprju, peress li l-esperjenza wriet li d-demel tal-baqar disponibbli fil-kummerċ użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Id-demel għandu jitnixxef bl-arja, jintaħan irqiq u jiġi pasturizzat qabel l-użu.

32. Kull lott ġdid ta' ikel, għandu jintgħalef lil kultura tad-dud mhux tat-test qabel jintuża f'test biex jiġi żgurat li huwa ta' kwalità xierqa. It-tkabbir u l-produzzjoni ta' fosdqiet ma għandhomx jitnaqqsu meta mqabbel ma' dud miżmum f'sottostrat li ma fihx il-lott il-ġdid ta' ikel (kundizzjonijiet kif deskritti fil-metodu ta' ttestjar C.8(4)).

33. L-ikel l-ewwel huwa pprovdut jum wara ż-żieda tad-dud u l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madwar 5 g ta' ikel jinfirex fuq wiċċ il-ħamrija ta' kull kontenitur u jixxarrab b'ilma mhux dejonizzat (madwar 5 ml sa 6 ml f'kull kontenitur). Minn hemm 'il quddiem l-ikel huwa pprovdut darba f'ġimgħa matul il-perjodu ta' ttestjar ta' 4 ġimgħat. Jekk l-ikel jibqa' ma jittikilx, il-proporzjon għandu jitnaqqas biex jiġi evitat tkabbir jew iffurmar fungali. L-adulti jitneħħew mill-ħamrija fit-28 jum tat-test. Imbagħad jingħataw 5 g oħra ta' ikel f'kull kontenitur tat-test. Ma jsir ebda tagħlif ieħor matul l-4 ġimgħat li jifdal mit-test.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

34. L-għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn test akut (4) u/jew minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, test tas-sejba tal-medda jitwettaq pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (massa xotta tal-ħamrija). Replikat wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija ġimagħtejn u l-mortalità tiġi vvalutata fi tmiem it-test.

Disinn sperimentali

35. Peress li ma tistax tiġi predefinita statistika ta' sommarju unika għat-test, dan il-metodu ta' ttestjar jaħseb għad-determinazzjoni tal-NOEC u l-EC_x. X'aktarx li tkun meħtieġa NOEC minn awtoritajiet regolatorji għall-futur prevedibbli. Fil-futur qarib jista' jiġi adottat użu iktar mifrux tal-EC_x, li jirriżulta minn kunsiderazzjonijiet statistiċi u ekoloġiċi. Għalhekk, huma proposti tliet disinji, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test ta' metodu ta' ttestjar tar-riproduzzjoni tal-enchytraeids (17).

36. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames/tnax-il konċentrazzjoni f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 2,0.

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), huwa rakkomandat numru adegwat ta' konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi b'medja statistikament differenti b'mod sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjoni.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

Durata u kejliet tat-test

37. Fit-28 Jum, id-dud adult ħaj kien osservat u magħdud. Kwalunkwe imġiba mhux tas-soltu (eż. inabbiltà li jħaffru fil-ħamrija; u nuqqas ta' ċaqliq) u fil-morfoloġija (eż. feriti miftuħa) tiġi rreġistrata. Id-dud adult kollu mbagħad jitneħħa mir-reċipjenti tat-test u jingħadd u jintiżen. It-trasferiment tal-ħamrija li fiha d-dud lejn trej nadif qabel il-valutazzjoni jista' jiffaċilita t-tiftix għall-adulti. Id-dud estratt mill-ħamrija għandu jinħasel qabel ma jintiżen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit ħin fuq il-karta filtru. Kwalunkwe dudu li ma jinstabx f'dan il-ħin għandu jiġi rreġistrat bħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni.

38. Jekk il-ħamrija tneħħiet mill-kontenituri din terġa' titpoġġa' f'postha (mingħajr id-dud adult iżda b'kwalunkwe fosdqiet li ġew prodotti). Il-ħamrija mbagħad tiġi inkubata għal erba' ġimgħat oħra fl-istess kundizzjonijiet tat-test ħlief li t-tagħlif isir biss darba fil-bidu ta' din il-fażi tat-test (ara l-paragrafu 33).

39. Fi tmiem it-tieni perjodu ta' 4 ġimgħat, in-numru ta' fireħ li jfaqqsu mill-fosdqiet fil-ħamrija tat-test u n-numru ta' fosdqiet jiġi ddeterminat permezz tal-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Is-sinjali kollha ta' dannu jew ħsara lid-dudu għandhom jiġu rreġistrati wkoll matul il-perjodu tal-ittestjar kollu.

Test tal-limitu

40. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg. Test tal-limitu sejjer jipprovdi l-opportunità biex juri li l-NOEC għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll il-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

41. Għalkemm tingħata ħarsa ġenerali fl-Appendiċi 6, ma tingħata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.

42. Punt ta' tmiem minnhom huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex tithaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjħu mal-ħajt tal-ħġieġ tar-reċipjent tat-test) u l-morfoloġija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieħ. L-analiżi probit (18) jew ir-rigressjoni loġistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l-LC_{50}. Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (19), il-metodu Spearman-Karber trimmjat (20) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC_0 u LC_{100}, kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC_0 immoltiplikat b'LC_{100}).

43. Il-punt ta' tmiem l-ieħor hija l-fekondità (eż. numru ta' frieħ prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob il-medja aritmetika $\bar{x}$ u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.

44. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-gradi ta' libertà (df) jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima miksuba mill-varjanza raggruppata miksuba mill-ANOVA u l-gradi tiegħu ta' libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependix fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġeneralment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull reċipjent bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wieħed minn dawk, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat jekk sinifikament differenti (għat-testijiet xierqa, ikkunsidra paragrafu 47 u l-Appendiċi 6).

45. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omoġenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

Stima tal-NOEC

46. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wieħed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimattiv normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omossedastiċità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza ħafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal omossedastiċità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq l-esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet t multipli bħat-test ta' Williams (α = 0,05, naħa waħda) (21)(22) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (23)(24). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuġġerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minħabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotoniċità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm devjazzjonijiet mill-omossedastiċità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi iktar mill-qrib biex jiġi

deċiż jekk it-testijiet-t jistgħux jiġu applikati mingħajr it-telf ta' ħafna qawwa (25). Inkella, test-U multiplu, it-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (26), jew meta din id-dejta tesebixxi omossedastiċità iżda hija altrimenti konsistenti ma' rispons għad-doża monotonu sottostanti, test mhux parametriku ieħor [eż. Jonckheere-Terpstra (27)(28) jew Shirley (29) (30)) jistgħu jiġu applikati u ġeneralment ikunu ppreferuti minn testijiet-t b'varjanza inugwali. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 6).

47. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriċi (normalità, omoġenità), jista' jintuża t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (31).

Estimi ta' EC_x

48. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x, jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat-tkabbir tad-dud bħala rispons kontinwu, il-valuri EC_x- jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (32). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza u numru ta' wild prodotti), huma l-funzjonijiet sigmoid, loġistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi wħud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddaħħlet b'analiżi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal-EC_x billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analiżi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney f'18)) jew metodi xierqa moderni oħra.

49. Inkella, ir-rispons jiġi mmudellat bħala perċentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat bħala r-rispons tal-medja ta' kontroll. F'dawn il-każijiet, il-kurva sigmojd (loġistika, ta' Weibull) normali ħafna drabi malajr tista' tiddaħħal fir-riżultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (18). F'dawn il-każijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (33). Madankollu, jekk tkun osservata ormeżi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni loġistika jew ta' Weibull b'erba' parametri, imdaħħla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (34). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddaħħal mad-dejta, wieħed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l-EC_x, u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, bħall-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (19) u l-proċedura Spearman-Karber Trimmjata (20).

RAPPORT TAT-TEST

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

Sustanza kimika tat-test:

— deskrizzjoni definittiva tas-sustanza kimika tat-test, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;

— il-proprjetajiet tas-sustanza kimika tat-test (eż. log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba).

Organiżmi tat-test:

— l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet tat-tgħammir;

— l-età, il-medda tad-daqs (massa) tal-organiżmi tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— dettalji tal-preparazzjoni għall-ħamrija tat-test;

— il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija;

— deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-ħamrija;

— dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji tal-kalibrazzjoni għat-tagħmir tal-isprejjar, jekk ikun xieraq;

— deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;

— id-daqs tal-konterituri u l-volum tal-ħamrija tat-test;

— kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;

— deskizzjoni tar-reġim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;

— il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-ħamrija fil-bida u fi tmiem it-test.

Riżultati tat-test:

— il-mortalità tal-adulti (%) f'kull kontenitur tat-test fi tmiem l-ewwel 4 ġimgħat tat-test;

— il-massa totali ta' adulti fil-bidu tat-test f'kull kontenitur tat-test;

— il-bidliet fil-piż tal-ġisem tal-adulti ħajjin (% tal-piż inizjali) f'kull kontenitur tat-test wara l-ewwel erba' ġimgħat tat-test;

— in-numru ta' frieħ prodotti f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— deskrizzjoni tas-sintomi ovvji u patoloġiċi jew bidliet distinti fl-imġiba;

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

— l-LC_{50}, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC_{50}, EC_{10}) għar-riproduzzjoni jekk xi wħud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;

— plott tar-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons;

— ir-riżultati applikabbli għal kull kontenitur tat-test;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 — 282.

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Test tat-tossiċità akutatal-ħniex.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

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

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

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

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija.

LC_0 (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wieħed mill-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_0 hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC_{50} (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organiżmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{50} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija.

LC_{100} (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organiżmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC_{100} hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-ħamrija. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan ta' hawn fuq għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taħt l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata tar-riproduzzjoni: Numru medju ta' dud frieħ prodott għal numru ta' adulti matul il-perjodu tat-test.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija nstab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (1).

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qegħeda fuq xtelliera f'banju-marija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq, imxarrab ħafna ġewwa reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f \% ta' massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

(1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH (1).

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

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

Appendiċi 4

Kulturi ta' Eisenia fetida /Eisenia andrei

It-tnissil għandu preferibbilment isir f'kompartiment klimatiku f'20 °C ± 2 °C. F'din it-temperatura u bl-għoti ta' biżżejjed ikel, id-dud jimmatura wara madwar xahrejn sa 3 xhur.

Iż-żewġ speċijiet jistgħu jiġu kkulturati f'firxa wiesgħa ta' skart tal-annimali. Il-midjum ta' tnissil rakkomandat huwa taħlita ta' 50:50 ta' demel u pit taż-żwiemel jew annimali tal-ifrat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumiex soġġetti għal mediċini jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematiċidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod ħażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel awtomiġbur minn sors 'organiku', peress li l-esperjenza wriet li d-demel disponibbli fis-suq użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Il-midjum għandu jkollu valur ta' pH ta' madwar 6 sa 7 (aġġustat bil-karbonat tal-kalċju), konduttività jonika baxxa (inqas minn 6 mS/cm jew 0,5 % konċentrazzjoni ta' melħ) u ma għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonijaka jew awrina tal-annimali. Is-sottostrat għandu jkun umdu iżda mhux imxarrab wisq. Il-kaxex ta' tnissil ta' kapaċità ta' 10 sa 50 litru huma xierqa.

Biex jinkiseb dud ta' età u daqs standard (massa), l-aħjar huwa li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Ladarba tiġi stabbilita l-kultura, din tinżamm billi d-dud adult jitqiegħed f'kaxxa tat-tnissil b'sottostrat ġdid għal 14-il jum sa 28 jum biex ikunu jistgħu jiġu prodotti iktar fosdqiet. L-adulti mbagħad jitneħħew u d-dud frieħ prodott mill-fosdqiet jintuża bħala bażi għall-kultura li jmiss. Id-dud jingħalef kontinwalment bi ħmieġ tal-annimali u jiġi ttrasferit f'sottostrat ġdid minn żmien għall-ieħor. L-esperjenza wriet li demel tal-baqar jew il-ħnieżer mitħun irqiq, imnixxef bl-arja jew il-ħafur huwa ikel xieraq. Għandu jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel li minnhom jinkiseb id-demel mhumiex soġġetti għal trattament mediku b'sustanzi kimiċi, bħal promoturi tat-tkabbir, li jistgħu jaffettwaw ħażin id-dud matul kultura b'terminu twil. Id-dud li jfaqqas minn fosdqiet jintuża għall-ittestjar meta jkollu bejn xahrejn u 12-il xahar u huwa kkunsidrat adult.

Id-dud jista' jiġi kkunsidrat b'saħħtu jekk jiċċaqlaq fis-sottostrat, ma jippruvax jitlaq is-sottostrat u jirriproduċi kontinwament. L-eżawriment tas-sottostrat huwa indikat minn dud li jiċċaqlaq bil-mod ħafna u li jkollu tarf ta' wara isfar. F'dan il-każ, huwa rakkomandat il-provvediment ta' sottostrat ġdid u/jew tnaqqis fid-densità tal-ħażna.

Appendiċi 5

Tekniki għall-għadd ta' dud frieħ imfaqqas minn fosdqiet

It-tqassim bl-idejn ta' dud mis-sottostrat tal-ħamrija jieħu ħafna ħin. Għalhekk huma rakkomandati żewġ metodi alternattivi:

(a) Il-kontenituri tat-test jitqiegħdu f'banjumarija inizjalment f'temperatura ta' 40 °C li iżda titla' għal 60 °C. Wara perjodu ta' madwar 20 minuta, id-dud frieħ għandu jidher f'wiċċ il-ħamrija minn fejn jista' jitneħħa u jingħadd faċilment.

(b) Il-ħamrija tal-ittestjar jista' jinħasel billi jingħadda minn passatur permezz tal-metodu żviluppat minn van Gestel et al. (1) sakemm il-pit u d-demel jew il-ħafur miżjud mal-ħamrija kienu mitħuna għal trab irqiq. Żewġ passaturi b'daqs tax-xibka ta' 0,5 mm (dijametru ta' 30 cm) jitqiegħdu fuq xulxin. Il-kontenut tal-kontenitur tat-test jinħasel permezz tal-passaturi bi fluss qawwi ta' ilma tal-vit, u dan iħalli d-dud u l-fosdqiet żgħar fil-biċċa l-kbira tagħhom fil-passatur ta' fuq. Huwa importanti li jiġi nnotat li l-wiċċ ġdid tal-passatur ta' fuq jinżamm imxarrab matul din l-operazzjoni biex b'hekk id-dud frieħ iżomm f'wiċċ kisja ta' ilma, u b'hekk jiġi evitat li jgħaddi mill-pori tal-passatur. L-aqwa riżultati jinkisbu meta tintuża doċċja.

Ladarba s-sottostrat tal-ħamrija kollu jkun inħasel permezz tal-passatur, il-frieħ u l-fosdqiet jistgħu jitlaħalħu mill-passatur għal skutella. Il-kontenut tal-iskutella mbagħad jitħalla joqgħod biex b'hekk il-fosqdiet il-vojta jkunu jistgħu jżommu f'wiċċ l-ilma u l-fosqdiet sħaħ u d-dud żgħir ikun jista' jibqa' niżel s'isfel. L-ilma tal-wiċċ imbagħad jista' jitneħħa u d-dud u l-fosdqiet iż-żgħar jiġu ttrasferiti f'dixx petri li fih naqra ilma. Id-dud jista' jitneħħa għall-għadd permezz ta' labra jew par pinzetti.

L-esperjenza wriet li l-metodu (a) huwa iktar adattat għall-estrazzjoni ta' dud frieħ li jista' jitlaħlaħ anki permezz ta' passatur ta' 0,5 mm.

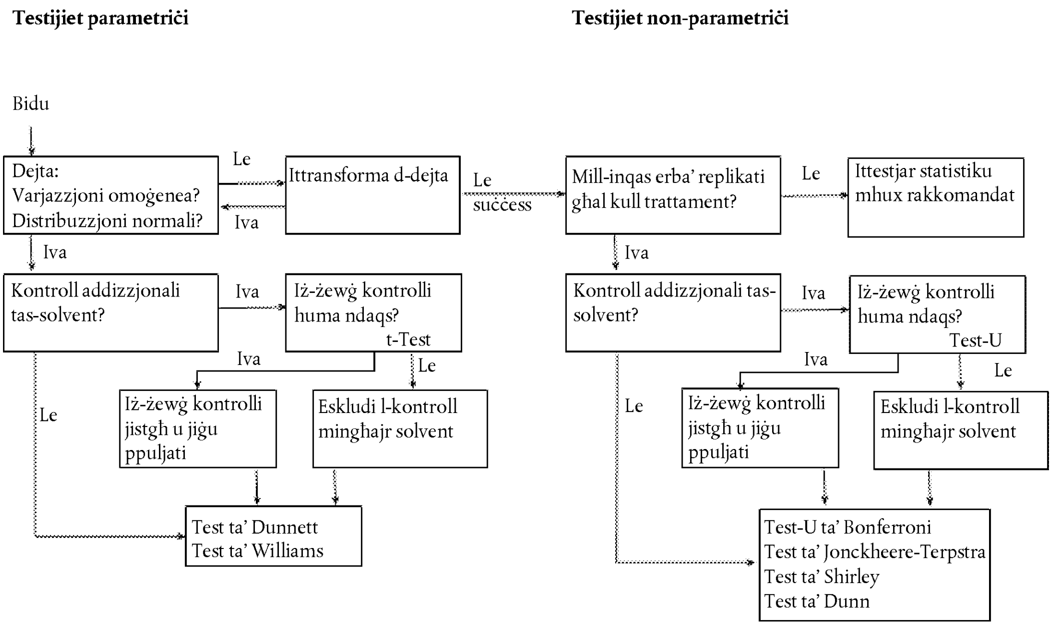
Għandha dejjem tiġi ddeterminata l-effiċjenza tal-metodu użat biex jitneħħa d-dud (u l-fosdqiet jekk ikun xieraq) mis-sottostrat tal-ħamrija. Jekk il-frieħ jinġabru permezz tat-teknika tal-issortjar bl-idejn, huwa rakkomandat li l-operazzjoni titwettaq darbtejn fuq il-kampjuni kollha.

REFERENZI:

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

Appendiċi 6

Ħarsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)



C.34. DETERMINAZZJONI TAL-INIBIZZJONI TAL-ATTIVITÀ TAL-BATTERJI ANAEROBIĊI — TNAQQIS FIL-PRODUZZJONI TAL-GASS MINN ĦAMA (DRENAĠĠ) B'DIĠESTJONI ANAEROBIKANTI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 224 tal-OECD (2007). Is-sustanzi kimiċi li jinħarġu fl-ambjent akkwatiku jgħaddu kemm miż-żoni aerobiċi u anaerobiċi, fejn jistgħu jiġu degradati u/jew jistgħu jinibixxu l-attività batterika; f'xi każijiet jistgħu jibqgħu f'żoni anaerobiċi mhux disturbati għal deċennji jew iktar. Fil-trattament tal-ilma mormi, l-ewwel stadju, l-abitat primarju, huwa ajrobiku fil-likwidu supernatanti u anaerobiku fil-ħama subnatanti. Dan huwa segwit fit-tieni stadju minn żona ajrobika fit-tank ta' arjazzjoni tal-ħama attivata u żona anaerobika fil-ħama tas-subnatanti fit-tank tas-soluzzjoni sekondarja. Il-ħama minn dawn iż-żewġ stadji ġeneralment hija soġġetta għal trattament anaerobiku li jipproduċi metan u dijossidu tal-karbonju li normalment jintużaw biex jipproduċu l-elettriku. Fl-ambjent usa', is-sustanzi kimiċi li jilħqu naqal f'bajjiet, f'estwarji u l-baħar x'aktarx jibqgħu f'dawn iż-żoni anaerobiċi indefinittivament jekk ma jkunux bijodegradabbli. Idealment, proporzjonijiet ikbar ta' xi wħud mis-sustanzi kimiċi sejrin jilħqu dawn iż-żoni minħabba l-proprjetajiet fiżiċi tagħhom, bħal solubbiltà baxxa fl-ilma, adsorbiment qawwi f'solidi sospiżi, kif ukoll l-inabbiltà li jiġu bijodegradati ajrobikament.

2. Filwaqt li huwa rakkomandabbli li s-sustanzi kimiċi li jinħelsu fl-ambjent għandhom ikunu bijodegradabbli kemm f'kundizzjonijiet ajrobiċi kif ukoll anaerobiċi, huwa essenzjali li tali sustanzi kimiċi ma jinibixxux l-attività ta' mikro-organiżmi f'xi żona minnhom. Fir-Renju Unit, kien hemm xi każijiet ta' inibizzjoni sħiħa tal-produzzjoni tal-metan ikkawżata minn, pereżempju, pentaklorofenol fl-iskariki industrijali, li jwassal għal trasport li jiswa ħafna flus ta' ħama inibita mid-diġesturi lejn siti 'sikuri' u l-importazzjoni ta' ħama b'diġestjoni tajba minn installazzjonijiet fil-qrib. Iżda kien hemm ħafna każijiet ta' tfixkil inqas sever tad-diġestjoni minn diversi sustanzi kimiċi oħrajn, inkluż aloidrokarburi alifatiċi (ħasil fix-xott) u deterġenti, li jwasslu għal indeboliment sinifikanti fl-effiċjenza tad-diġestur.

3. Metodu ta' ttestjar wieħed biss, C.11 (1), jittratta l-inibizzjoni tal-attività batterika (Respirazzjoni tal-ħama attivata), li jivvaluta l-effett tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata ta' teħid tal-ossiġenu fil-preżenza tas-sottostrat. Il-metodu ntuża b'mod wiesgħa biex jagħti twissija bikrija ta' effetti dannużi possibbli ta' sustanzi kimiċi fuq it-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, kif ukoll l-indikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet mhux inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fid-diversi testijiet għall-bijodegradabbiltà. Il-metodu ta' ttestjar C.43 (2) joffri opportunità limitata għad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test għall-produzzjoni tal-gass minn ħama anaerobika, imħallta ma' parti waħda minn għaxra mill-konċentrazzjoni normali tas-solidi għall-preċiżjoni meħtieġa fil-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà perċentwali. Peress li l-ħama dilwita tista' tkun iktar sensittiva għal sustanzi kimiċi inibitorji, il-grupp tal-ISO ddeċieda li jipprepara metodu li juża ħama mhux dilwita. Tal-inqas ġew eżaminati tliet testi (mid-Danimarka, il-Ġermanja u r-Renju Unit) u fl-aħħar nett ġew ippeparati żewġ standards tal-ISO, wieħed permezz ta' ħama mhux dilwita, ISO 13 641-1 (3) u l-ieħor permezz ta' ħama dilwita f'mitt parti, ISO 13 641-2 (4), biex jiġu rrappreżentati t-tajn u n-naqal li jkollhom popolazzjonijiet ta' batterji baxxi. Iż-żewġ metodi kienu soġġetti għal ring test (5); parti 1 kienet ikkonfermata bħala standard aċċettabbli iżda kien hemm nuqqas ta' qbil dwar il-parti 2. Ir-Renju Unit ikkunsidra li, peress li parti sinifikanti mill-parteċipanti ma rrapportaw ebda produzzjoni ta' gass jew ftit li xejn, parzjalment minħabba li l-ispazju perċentwali tal-gass kien għoli ħafna (f'75 %) għall-aħjar sensittività, il-metodu jeħtieġ iktar investigazzjoni.

4. Ħidma iktar bikrija fir-Renju Unit (6)(7) iddeskriviet metodu manometriku permezz ta' ħama ta' diġestjoni mhux dilwita, flimkien ma' ħama minn drenaġġ mhux ipproċessat, fi flasks ta' 500 ml; l-apparat kien ineffiċjenti u l-intiena tal-ħama mhux ipproċessata kienet qawwija. Iktar tard Wilson et al. applika b'suċċess l-apparat iktar kompatt u konvenjenti ta' Shelton and Tiedje (8) kif żviluppat minn Battersby and Wilson (9). (10). Kawahara et al (11) ipprepara b'suċċess iktar ħama standard fil-laboratorju għall-użu f'testijiet għal bijodegradabbiltà anaerobika u l-inibizzjoni minn numru ta' sustanzi kimiċi. Barra minn hekk, il-ħama mhux ipproċessata bħala s-sottostrat kienet issostitwita biex jitwettaq test jew b'ħama anaerobika dilwita f'mitt parti jew b'tajn, naqal eċċ. ta' attività batterjali baxxa.

5. Dan il-metodu jista' jipprovdi informazzjoni li hija utli fit-tbassir tal-effett probabbli ta' sustanza kimika tat-test fuq il-produzzjoni tal-gass f'diġesturi anaerobiċi. Mandakollu, testijiet itwal biss li jissimulaw id-diġesturi operattivi iktar mill-qrib jistgħu jindikaw jekk jistax iseħħ l-adattament tal-mikro-organiżmi għas-sustanza kimika tat-test jew jekk sustanzi kimiċi li x'aktar jiġu adsorbiti u adsorbiti fil-ħama jistgħux jakkumulaw sa konċentrazzjoni tossika f'perjodu ta' żmien itwal milli permess f'dan it-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Alikwoti ta' taħlita ta' ħama ta' diġestjoni anaerobika (20 g/l sa 40 g/l tas-solidi totali) u soluzzjoni ta' sottostrat degradabbli huma inkubati waħedhom u simultanjament ma' firxa ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'reċipjenti ssiġillati sa 3 ijiem. L-ammont ta' gass (metan flimkien ma' dijossidu tal-karbonju) prodott jitkejjel biż-żieda fil-pressjoni (Pa) fil-fliexken. L-inibizzjoni perċentwali tal-produzzjoni ta' gass li jġibu magħhom id-diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test hija kkalkolata mill-ammonti prodotti fil-fliexken tat-test u ta' kontroll rispettivi. L-EC_{50} u konċentrazzjonijiet effettivi oħrajn jiġu kkalkolati minn plotts tal-inibizzjoni perċentwali mal-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test jew, b'mod iktar komuni, il-logaritmu tagħha.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Is-sustanzi kimiċi tat-test normalment għandhom jintużaw fl-iktar forma pura li tkun faċilment disponibbli, peress li l-impuritajiet f'xi sustanzi kimiċi, eż. l-klorofenoli, jistgħu jkunu iktar tossiċi mis-sustanza kimika tat-test innifisha. Madankollu, għandhom jiġu kkunsidrati l-ħtiġijiet biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-forma li jiġu prodotti/jitqiegħdu għad-dispożizzjoni fis-suq biha. L-użu ta' prodotti formulati mhuwiex normalment rakkomandat, iżda għal sustanzi kimiċi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu tal-materjal formulat jaf ikun xieraq. Il-proprjetajiet tas-sustanza kimika tat-test li għandhom ikunu disponibbli jinkludu s-solubbiltà fl-ilma u xi solventi organiċi, il-pressjoni tal-fwar, il-koeffiċjent ta' adsorbiment, l-idroliżi u l-bijodegradabbiltà f'kundizzjonijiet anaerobiċi.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU

8. It-test huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi li jinħallu jew li ma jinħallux fl-ilma, inkluż sustanzi kimiċi volatili. Iżda attenzjoni speċjali hija meħtieġa b'materjali b'solubbiltà fl-ilma baxxa (ara ref. (12)) u ta' volatilità għolja. Barra minn hekk jistgħu jintużaw inokuli minn siti anaerobiċi oħrajn, eż. tajn, ħamriji saturati, naqal. Sistemi batteriċi anaerobiċi li preċedentement kienu ġew esposti għal sustanzi kimiċi tossiċi jistgħu jiġu adattati għaż-żamma tal-attività tagħhom fil-preżenza ta' sustanzi kimiċi ksenobijotiċi. Inokuli minn sistemi batteriċi adattati jaf juru tolleranza ikbar għas-sustanzi kimiċi tat-test meta mqabbla mal-inokuli miksuba minnn sistemi mhux adattati.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

9. Biex tiġi vverifikata l-proċedura, sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata billi jiġu kkonfigurati r-reċipjenti xierqa b'mod parallel bħala parti mit-twettiq ta' testijiet normali; 3, 5-diklorofenol intwera li huwa inibitur iktar konsistenti tal-produzzjoni tal-gass anaerobika, kif ukoll bħala konsum tal-ossiġenu mill-ħama attivata u reazzjonijiet bijokimiċi oħrajn. Żewġ sustanzi kimiċi oħrajn intwerew li huma iktar inibitorji għall-produzzjoni tal-metan milli 3, 5-diklorofenol, jiġifieri methylene bis-tjoċjanat u pentaklorofenol iżda r-riżultati bihom ma ġewx ivvalidati. Pentaklorofenol mhuwiex rakkomandat peress li mhuwiex faċilment disponibbli f'forma pura.

RIPRODUĊIBBILTÀ TAR-RIŻULTATI

10. F'ring test internazzjonali (5) kien hemm biss riproduċibbiltà ġusta fil-valuri EC_{50} bejn l-10 laboratorji parteċipanti għal 3, 5-diklorofenol u l-aċidu sulfoniku 2-bromo-etan. (Il-medda tal-ewwel wieħed kienet 32 mg/l sa 502 mg/l u għal tal-aħħar 220-2 190 mg/l.)

Numru ta' laboratorjii	Bħala mg/l			Bħala mg/g ta' ħama		
	medja	s.d.	cv(%)	medja	s.d.	cv(%)
	3, 5-Diklorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Aċidu sulfoniku 2-Bromo-etan					
10	1 058	896	85	34	26	76

Dejta EC_{50} minn ring test — ħama mhux dilwita

11. Il-koeffiċjenti għoljin ta' varjazzjoni bejn il-laboratorji sa ċertu punt jirriflettu d-differenzi fis-sensittività tal-mikro-organiżmi minħabba espożizzjoni minn qabel jew l-ebda espożizzjoni minn qabel għas-sustanza kimika tat-test jew sustanzi kimiċi kimikament relatati oħra. Il-preċiżjoni b'liema l-valur EC_{50} abbażi tal-konċentrazzjoni tal-ħama kienet iddeterminata kienet ftit iktar aħjar mill-valur 'volumetriku' (mg/l). It-tliet laboratorji li rrapportaw il-preċiżjoni tal-valuri EC_{50} tagħhom għal 3,5-diklorofenol urew koeffiċjenti ferm inqas ta' varjazzjoni (22, 9, u 18 % rispettivament għal EC_{50} mg/g) minn dawk tal-medji tal-għaxar laboratorji kollha. Il-medji individwali għat-tliet laboratorji kienu 3,1, 3,2 u 2,8 mg/g, rispettivament. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni iktar baxxi, aċċettabbli fi ħdan il-laboratorji meta mqabbel mal-koeffiċjenti ferm ogħla bejn il-valuri tal-laboratorju, jiġifieri 9-22 % cf. 92 %, jindikaw li hemm differenzi sinifikanti fil-proprjetajiet tal-ħama individwali.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

12. Huwa meħtieġ tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dan li ġej:

a) Inkubatur — li jiflaħ għall-isparks u kkontrollat fi 35 °C ± 2 °C;

b) Reċipjenti tal-ittestjar tal-ħġieġ reżistenti għall-pressjoni ta' daqs nominali xieraq ([1]), kull wieħed imdaħħal b'septum miksi li ma jgħaddix gass minnu, li jista' jiflaħ madwar 2 bar jew 2 × 10^5 Pa (għall-użu fil-kisi, eż. PTFE = politetrafluworeten). Il-fliexken tas-serum tal-ħġieġ b'volum nominali ta' 125 ml, b'volum reali ta' madwar 160 ml, issiġillati b'septa tas-serum ([2]) u huma rakkomandati ċrieki tal-aluminju rbattuti; iżda jistgħu jintużaw b'suċċess fliexken b'volum totali ta' bejn 0,1 u litru;

c) Miter tal-pressjoni bi preċiżjoni ([3]) u twaħħil mal-labra

Il-produzzjoni totali tal-gass (metan flimkien ma' dijossidu tal-karbonju) titkejjel permezz ta' miter tal-pressjoni adattat biex jippermetti l-kejl u l-ivventjar tal-gass prodott. Eżempju ta' strument xieraq huwa miter tal-pressjoni bi preċiżjoni li jinżamm fl-idejn imqabbad ma' labra ta' siringa; valv impermeabbli tridirezzjonali jiffaċilita r-rilaxx ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Huwa meħtieġ li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, biex b'hekk l-iżbalji introdotti minħabba li jiġi ttraskurat il-volum tat-tagħmir ikunu insinifikanti;

d) Kontenituri iżolati, għat-trasport tal-ħama ta' diġestjoni;

e) Valvs għar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali;

f) Passatur, li għandu xibka kwadra ta' 1 mm;

g) Kontenitur, għall-ħama ta' diġestjoni, flixkun tal-ħġieġ jew ta' polietilen b'densità għolja, b'kapaċità ta' madwar 5 litri, mgħammar b'ħawwad u faċilitajiet biex jingħadda fluss ta' gass tan-nitroġenu (ara l-paragrafu 13) mill-ispazju fil-wiċċ;

h) filtri tal-membrana (0,2 μm) għall-isterilizzazzjoni tas-sottostrat;

([1]) Id-daqs rakkomandat huwa 0,1 litru għal litru.

([2]) Huwa rakkomandat l-użu ta' septa tas-siliċju li ma jgħaddix gass minnhom. Huwa rakkomandat ukoll li l-impermeabbiltà għall-gass tal-għotjien, speċjalment is-septa tal-gomma tal-butil, tiġi ttestjata peress li diversi septa disponibbli fis-suq mhumiex impermeabbli biżżejjed għall-metan u xi septa ma jibqgħux impermeabbli meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.
— Huma rakkomandati septa miksija li ma jgħaddix gass minnhom, li għandhom jintużaw għal sustanzi kimiċi volatili (xi septa kummerċjali huma relattivament irqaq, inqas minn 0,5 cm, u ma jibqgħux impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu b'labra ta' siringa);
— Huma rakkomandati septa tal-gomma tal-butil (madwar 1 cm), jekk is-sustanzi tat-test ma jkunux volatili (dawn normalment jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu.)
— Qabel it-test, huwa rakkomandat li s-septa jiġu eżaminati b'attenzjoni għall-abbiltà tagħhom biex jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqbu.

([3]) Il-miter għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija meħtieġa ebda kalibrazzjoni fil-laboratorju. Dan għandu jiġi kkalibrat minn istitut illiċenzjat fl-intervalli rakkomandati. Il-preċiżjoni tal-kalibrazzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari f'1 × 10^5 Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati ta' kejl oħra (mingħajr kalibrazzjoni ċċertifikata mill-manifattur), hija rakkomandata konverżjoni tul il-medda totali f'intervalli regolari (Appendiċi 2).

i) mikro siringi, għall-konnessjoni impermeabbli għall-gass tat-transdjuser tal-pressjoni (ara l-paragrafu 12(c)) għall-ispazju fil-wiċċ tal-fliexken (ara l-paragrafu 12(b)); kif ukoll għaż-żieda ta' materjali tat-test b'likwidu li ma jinħallx fil-fliexken;

j) kompartiment tal-ingwanti, fakultattiv iżda rakkomandat, bi ftit pressjoni pożittiva tan-nitroġenu.

Reaġenti

13. Uża reaġenti tal-grad analitiku f'kull parti. Gass tan-nitroġenu, b'purità għolja b'kontenut ta' inqas minn 5 μl/l ta' ossiġenu, għandu jintuża f'kull parti.

Ilma

14. Jekk tkun meħtieġa dilwizzjoni f'xi stadju, uża ilma dejonizzat li kien qabel tneħħitlu l-arja minnu. Mhumiex meħtieġa kontrolli analitiċi, iżda kun żgur li l-apparat dejonizzanti jinżamm b'mod regolari. Uża ilma dejonizzanti anki għall-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ewlenin. Qabel iż-żieda ta' inokulu anaerobiku ma' kwalunkwe soluzzjoni jew dilwizzjoni tal-materjal tat-test, kun żgur li dawn ikunu mingħajr ossiġenu. Dan isir jew billi jingħadda gass tan-nitroġenu fl-ilma ta' dilwizzjoni (jew fid-dilwizzjonijiet) għal siegħa qabel ma jiżdied l-inokulu, jew inkella billi jissaħħan l-ilma ta' dilwizzjoni sal-punt tat-togħlija u jitberred għat-temperatura tal-kamra f'atmosfera mingħajr ossiġenu.

Ħama Diġerita

15. Iġbor il-ħama ta' diġestjoni attiva minn diġestur f'impjant tat-trattament tal-ilma mormi, jew inkella, minn diġestur tal-laboratorju, billi tittratta l-ħamra minn drenaġġ prinċipalment domestiku. Informazzjoni prattika dwar il-ħama minn diġestur tal-laboratorju tista' tinstab x'imkien ieħor (11). Jekk ikun maħsub l-użu ta' inkolu adattat, tista' tiġi kkunsidrata d-diġestjoni tal-ħama minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ industrijali. Uża fliexken b'għonq wiesgħa magħmula minn polietilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-ġbir tal-ħama. Żid il-ħama fil-fliexken tal-kampjun sa madwar 1 cm mill-parti ta' fuq nett tal-fliexken, issikkahom, preferibbilment b'valv tas-sigurtà (paragrafu 12(e)), u poġġihom f'kontenituri iżolati (paragrafu 12 (d)) biex tnaqqas il-qabża fit-temperatura, sakemm ma jiġux ittrasferiti f'inkubatur 35 °C ± 2 °C. Meta titfaħ il-fliexken, ara li tħalli toħroġ il-pressjoni tal-gass żejda jew billi tiftaħ b'attenzjoni s-siġill, jew permezz ta' valv tar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali (paragrafu 12(e)). Huwa preferibbli li l-ħama tintuża fi żmien sagħtejn mill-ġbir, inkella tinħażen f'35 °C ± 2 °C fi spazju fil-wiċċ tan-nitroġenu għal sa 3 ijiem, meta normalment iseħħ ftit telf ta' attività.

Twissija — Id-diġestjoni tal-ħama tipproduċi gassijiet li jaqbdu li jippreżentaw riskji ta' nar u splużjoni: fiha wkoll organiżmi potenzjalment patoġeniċi, b'hekk hu prekawzjonijiet xierqa waqt l-immaniġġar tal-ħama. Għal raġunijiet ta' sigurtà, tużax reċipjenti tal-ħġieġ għall-ġbir tal-ħama.

Inokulu

16. Eżattament qabel l-użu, ħallat il-ħamrija billi tħawwadha u tgħaddiha minn passatur b'xibka ta' 1 mm^2 (paragrafu 12(f)) fi fliexkun xieraq (paragrafu 12(g)) mill-ispazju fil-wiċċ li minnu jingħadda fluss ta' nitroġenu. Warrab kampjun għall-kejl tal-konċentrazzjoni ta' solidi xotti totali (ara eż. ISO 11 923 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti). B'mod ġenerali, uża l-ħama mingħajr dilwizzjoni. Il-konċentrazzjoni ta' solidi, ġeneralment tkun bejn 2 % u 4 % (w/v). Iċċekkja l-valur pH tal-ħama u, jekk ikun meħtieġ, aġġusta għal 7 ± 0,5.

Sottostrat tat-test

17. Ħoll 10 g brodu ta' nutrijenti (eż. Oxoid), 10 g ta' estratt tal-ħmira u 10 g ta' glukożju-D f'ilma dejonizzat u ddilwixxi sa 100 ml. Isterilizza b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,2 μm (paragrafu 12(h)) u uża minnufih u aħżen f'4 °C għal mhux iktar minn jum.

Sustanza kimika tat-test

18. Ipprepara soluzzjoni ewlenija għal kull sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma biex ikun fiha, pereżempju, 10 g/l tas-sustanza kimika f'ilma ta' dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14). Uża volumi xierqa ta' dawn is-soluzzjonijiet ewlenin biex tipprepara t-taħlitiet ta' reazzjoni li fihom konċentrazzjonijiet iggradati. Inkella, ipprepara serje ta' dilwizzjonijiet ta' kull soluzzjoni ewlenija biex b'hekk il-volum miżjud fil-fliexken ikun l-istess għal kull konċentrazzjoni finali meħtieġa. Il-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin għandu jkun aġġustat għal 7 ± 0,2, jekk ikun meħtieġ.

19. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jinħallux biżżejjed fl-ilma, ikkonsulta ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti. Jekk ikun meħtieġ li jintuża solvent organiku, evita solventi bħal kloroform u tetraklorur tal-karbonju, li huma magħrufa sew li jinibixxu l-produzzjoni ta' metan. Ipprepara soluzzjoni ta' konċentrazzjoni xierqa ta' sustanza kimika li ma tinħallx fl-ilma f'solvent volatili xieraq, pereżempju, aċetun, dietileter. Żid il-volumi meħtieġa ta' soluzzjoni tas-solvent fil-fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) u evapora s-solvent qabel iż-żieda tal-ħama. Għal trattamenti oħra uża ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti, iżda oqgħod attent li kwalunkwe aġent tensjoattiv użat biex jiġu prodotti emulsjonijiet jista' jkun inibotorju għall-produzzjoni ta' gass anaerobiku. Huwa maħsub li l-preżenza ta' solventi organiċi u l-aġenti emulsifikanti tikkawża artefatti, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied direttament mat-taħlita tal-ittestjar bħala trab jew likwidu. Is-sustanzi kimiċi volatili u s-sustanzi kimiċi tat-test b'likwidu li ma jinħallx fl-ilma jistgħu jiġu inokulati fi fliexken tas-serum, permezz ta' mikrosiringi (il-paragrafu 12(i)).

20. Żid is-sustanzi kimiċi tat-test fil-fliexken biex tagħti serje ġeometrika ta' konċentrazzjonijiet, pereżempju, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l u 15,6 mg/l. Jekk il-medda ta' tossiċità ma tkunx magħrufa minn sustanzi kimiċi simili, l-ewwel wettaq test preliminari tas-sejba tal-medda b'konċentrazzjoni ta' 1 000 mg/l, 100 mg/l u 10 mg/l biex taċċerta l-medda xierqa.

Sustanza kimika ta' referenza

21. Ipprepara soluzzjoni milwiema ta' 3,5-diklorofenol (10 g/l) billi żżid gradwalment l-ammont minimu ta' 5 mol/l soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju mas-solidu, waqt li tħawwad, sakemm jinħall. Imbagħad żid ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) sal-volum meħtieġ; is-sonikazzjoni tista' tgħin it-tidwib. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' referenza oħra meta tkun inkisbet il-medda medja tal-EC_{50} f'tal-inqas tliet testijiet b'inokuli differenti (sorsi differenti jew ħinijiet differenti ta' ġbir).

INTERFERENZA/ŻBALJI

22. Xi kostitwenti ta' ħama jistgħu preżumibbilment jirreaġixxu ma' inibituri potenzjali jagħmluhom indisponibbli għal mikro-organiżmi sabiex jagħtu inibizzjoni iżgħar jew ebda inibizzjoni. Barra minn hekk, jekk il-ħama diġà kien fiha sustanza kimika li hija inibitorja, jistgħu jinkisbu riżultati żbaljati meta dik is-sustanza kimika kienet soġġetta għat-test. Apparti minn dawn il-possibbiltajiet, hemm numru ta' fatturi identifikati li jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Dawn huma elenkati fl-Appendiċi 3, flimkien mal-metodi li jeliminaw jew tal-inqas inaqqsu l-iżbalji.

PROĊEDURA TAT-TEST

23. In-numru ta' repliki meħtieġa jiddependi fuq il-grad ta' preċiżjoni meħtieġa għall-indiċijiet ta' inibizzjoni. Jekk is-siġilli tal-fliexken huma suffiċjentement impermeabbli matul it-test, ikkonfigura lott wieħed biss (tal-inqas triplikati) tal-fliexken tat-test f'kull konċentrazzjoni meħtieġa. Bl-istess mod, ikkonfigura lott wieħed ta' fliexken b'sustanza kimika ta' referenza u sett wieħed ta' kontrolli. Madankollu, jekk is-siġilli tal-fliexken iridu jittaqqbu darba jew xi ftit drabi biss, ikkonfigura lott (eż. triplikati) tal-fliexken tat-test għal kull intervall (t) li għalihom huma meħtieġa riżultati għall-konċentrazzjonijiet kollha ta' sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata. Bl-istess mod, ikkonfigura lottijiet 't' tal-fliexken għas-sustanza kimika ta' referenza u għall-kontrolli.

24. Huwa rakkomandat l-użu ta' kaxxa tal-ingwanti (paragrafu 12(j)). Tal-inqas 30 minuta qabel ma jinbeda t-test, ibda fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-kaxxa tal-ingwanti li fiha t-tagħmir kollu meħtieġ. Assigura li t-temperatura tal-ħama hija fi ħdan 35 °C ± 2 °C matul l-immaniġġar u s-siġill tal-fliexken.

Test Preliminari

25. Jekk l-attività tal-ħama mhijiex magħrufa, huwa rakkomandat li jitwettaq test preliminari. Ikkonfigura l-kontrolli biex pereżempju, jagħtu konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 10 g/l, 20 g/l u 40 g/l, flimkien mas-sottostrat iżda ma jużaw ebda sustanza kimika tat-test. Barra minn hekk, uża volumi differenti ta' taħlita ta' reazzjoni sabiex ikollok tlieta sa erba' proporzjonijiet ta' volumi ta' spazju fil-wiċċ mal-volum tal-likwidu. Minn dawn ir-riżultati ta' volumi tal-gass prodotti f'diversi intervalli ta' żmien, il-kundizzjonijiet l-iktar xierqa li jippermettu żewġ kejliet kuljum li jipproduċu volumi sinifikanti ta' gass u jirrilaxxaw il-pressjoni kuljum fl-aqwa sensittività ([1]) mingħajr biża' ta' splużjonijiet.

([1]) Dan japplika għall-konfigurazzjoni sperimentali u l-kundizzjonijiet sperimentali fejn il-volumi ta' gass prodotti — u minn inbjanki tal-kontroll u minn reċipjenti li jindikaw inibizzjoni ta' 70 — 80 % — jistgħu jiġu stmati b'marġini ta' żball aċċettabbli.

Żieda ta' sustanzi kimiċi tat-test

26. Żid sustanzi kimiċi tat-test li jinħallu fl-ilma ma' fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) bħala soluzzjonijiet milwiema (paragrafu 18). Uża tal-inqas settijiet ta' triplikati ta' fliexken għal kull medda ta' konċentrazzjonijiet (paragrafu 20). Fil-każ ta' sustanza kimika tat-test li ma tinħallx u li ma tantx tinħall, injetta soluzzjonijiet ta' dawn f'solventi organiċi permezz ta' mikrosiringa fi fliexken vojta biex tagħti settijiet ta' repliki ta' kull ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Evapora s-solvent billi tgħaddi ġett ta' gass tan-nitroġenu fuq wiċċ is-soluzzjonijiet fil-fliexken tat-test. Inkella, żid sustanzi kimiċi solidi li ma jinħallux bħala ammonti mwieżna tas-solidu direttament mal-fliexken tat-test.

27. Jekk sustanzi kimiċi tat-test ta' likwidu ma jinħallux u li ma tantx jinħall fl-ilma ma jiżdidux ma' solvent, żidhom direttament b'mikrosiringa mal-fliexken tat-test wara li żżid l-inokulu u s-sottostrat tat-test (ara l-paragrafu 30). Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili jistgħu jiżdiedu bl-istess mod.

Żieda ta' inokulu u sottostrat

28. Ħawwad volum xieraq ta' ħama ta' diġestjoni mgħoddija minn passatur (ara l-paragrafu 16) fi fliexkun ta' 5 litri (il-paragrafu 12(g)), filwaqt li tgħaddi fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-ispazju fil-wiċċ. Laħlaħ il-fliexken tat-test, li fihom soluzzjonijiet milwiema jew soluzzjonijiet ta' solvent evaporati tas-sustanzi kimiċi tat-test, bi fluss ta' gass tan-nitroġenu, għal madwar żewġ minuti biex tneħħi l-arja. Ferra' l-alikwoti, eż. 100 ml, tal-ħama imħallta sew fil-fliexken tat-test permezz ta' pipetta b'ponta kbira jew ċilindru tal-kejl. Huwa essenzjali li timla l-pipetta f'pass wieħed sal-volum eżatt ta' ħama meħtieġa minħabba l-faċilità li biha s-solidi tal-ħama joqogħdu f'posthom. Jekk jittieħed ammont ikbar, battal il-pipetta u erġa' ibda.

29. Imbagħad żid soluzzjoni ta' sottostrat suffiċjenti (paragrafu 17) biex tagħti konċentrazzjoni ta' 2 g/l ta' kull brodu ta' nutrijenti, estratt tal-ħmira u glukożju-D fit-taħlita, filwaqt li n-nitroġenu jkun għadu qiegħed jitferra'. Dan li ġej huwa eżempju għal-lottijiet tal-ittestjar.

Konċentrazzjoni tal-massa finali tas-sustanza kimika tat-test fil-fliexken tat-test (mg/L)	Volum ta' sustanza kimika tat-test (ml)		Reaġenti u midjums (ml)		
	Soluzzjoni ewlenija a) 10 g/l para. 18	Soluzzjoni ewlenija b) 1 g/l para. 18	Ilma ta' dilwizzjoni para. 14	Inokulu para. 16	Sottostrat para. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volum totali tal-fliexkun = 160 ml. Volum tal-likwidu = 103 ml

Volum tal-gass = 57 ml, jew 35,6 % tal-volum totali.

30. Bl-istess mod aħsel b'gass tan-nitroġenu, fliexken tat-test vojta biżżejjed biex tindirizza kwalunkwe sustanza kimika tat-test ta' likwidu volatili u li ma jinħallx (ara l-paragrafu 27).

Kontrolli u sustanza kimika ta' referenza

31. Ikkonfigura tal-inqas settijiet triplikati ta' fliexken, li fihom ħama u sottostrat biss, biex jaġixxu bħala kontrolli. Ikkonfigura wkoll fliexken ta' repliki li fihom ħama u sottostrat flimkien ma' biżżejjed soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol (paragrafu 21) biex tirriżulta f'konċentrazzjoni finali ta' 150 mg/l. Din il-konċentrazzjoni għandha tinibixxi l-produzzjoni ta' gass b'madwar 50 %. Inkella, ikkonfigura medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika ta' referenza. Barra minn hekk, ikkonfigura erba' fliexken żejda għall-kejl tal-pH li fihom ħama, ilma mingħajr ossiġenu u sottostrat. Żid is-sustanza kimika tat-test maż-żewġ fliexken fl-ogħla konċentrazzjoni li tkun qiegħda tiġi ttestjata u żid ilma mingħajr ossiġenu maż-żewġ fliexken li jifdal.

32. Assigura li l-fliexken kollha — is-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza u l-kontrolli fihom l-istess volum (V_R) ta' likwidu; fejn ikun meħtieġ, żid ilma mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) biex tagħmel il-volum. L-ispażju fil-wiċċ għandu jkun bejn 10 % u 40 % tal-volum tal-flixkun, il-valur attwali jintgħażel mid-dejta miksuba mit-test preliminari. Wara li żżid il-kostitwenti kollha fil-fliexken, neħħi l-labra li tforni l-gass u ssiġilla kull flixkun b'tapp tal-gomma u għatu tal-aluminju (Paragrafu 12(b)), filwaqt li xxarrab it-tapp b'taqtira ta' ilma dejonizzat biex tiffaċilita d-dħul. Ħawwad il-kontenut ta' kull flixkun billi tħawdu.

Inkubazzjoni tal-fliexken

33. Ittrasferixxi l-fliexken lejn l-inkubatur ikkontrollat b'termostat, preferibbilment mgħammar b'xejker, u miżmum f'35 °C ± 2 °C. Il-fliexken huma inkubati fid-dlam. Wara madwar siegħa, ekwilizza l-pressjoni fil-fliexken sat-temperatura tal-atmosfera billi ddaħħal il-labra tas-siringa, imwaħħla mal-miter tal-pressjoni (paragrafu 12(c)), mis-siġill ta' kull flixkun, wara iftaħ il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra żero u fl-aħħar agħlaq il-valv. Il-labra għandha tiddaħħal f'angolu ta' madwar 45° biex tevita tnixxija ta' gass mill-fliexken. Jekk il-fliexken jiġu inkubati mingħajr xejker, ħawwad manwalment darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' inkubazzjoni totali biex tiġi ekwilibrata s-sistema. Inkuba l-fliexken u aqlibhom biex tevita kwalunkwe telf ta' gass mis-septum. Madankollu, il-qlib mhuwiex xieraq f'każijiet fejn is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jinħallux jistgħu jeħlu ma' qiegħ il-flask.

Ġestjoni tal-pressjoni

34. Meta l-fliexken jilħqu 35 °C ± 2 °C, kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' tnejn minn erba' fliexken ikkonfigurati għal dan il-għan u armi l-kontenut; kompli inkuba l-fliexken li jifdal fid-dlam. Kejjel u rreġistra l-pressjoni fil-fliexken darbtejn kuljum fl-48 siegħa sat-72 siegħa ta' wara billi ddaħħal il-labra tal-miter tal-pressjoni mis-siġill ta' kull flixkun, wara nixxef il-labra bejn il-kejliet. Żomm il-partijiet kollha tal-fliexken fit-temperatura ta' inkubazzjoni matul il-kejl, li għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun. Ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza u rreġistrah. Imbagħad iftaħ il-valv għal ventilazzjoni u agħlqu meta l-pressjoni taqra żero. Kompli t-test ġeneralment għal 48 siegħa mill-ħin tal-ewwel ekwalizzazzjoni tal-pressjoni, 'ħin 0' iddisinjat. In-numru ta' qari u ventilazzjonijiet għandu jkun limitat għal sustanzi kimiċi volatili għal wieħed (fi tmiem l-inkubazzjoni) jew tnejn biex jiġi minimizzat it-telf ta' sustanza kimika tat-test (10).

35. Jekk il-qari tal-pressjoni jkun negattiv, tiftaħx il-valv. Kultant takkumula umdità fil-labra tas-siringa u t-tubi, indikata minn qari tal-pressjoni ftit negattiv. F'dan il-każ neħħi l-labra, ħawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u waħħal labra ġdida.

Kejl tal-pH

36. Kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' kull flixkun wara l-kejl finali tal-pressjoni.

DEJTA U RAPPORTAR

Espressjoni tar-riżultati

37. Ikkalkola t-total u l-medja tal-pressjonijiet irreġistrati f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' fliexken ta' repliki u kkalkola l-medja grossa kumulattiva tal-pressjoni tal-gass f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' repliki. Ipplottja kurvi tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass (Pa) mal-ħin għall-kontroll, il-fliexken tat-test u ta' referenza. Agħżel ħin fuq il-parti lineari tal-kurva, ġeneralment 48 siegħa, u kkalkola l-inibizzjoni perċentwali (I) għal kull konċentrazzjoni mill-ekwazzjoni [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \qquad [1],$$

fejn

I inibizzjoni perċentwali, f' %;

P_t il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test f'ħin magħżul, f'Pascal (Pa);

P_c il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test fl-istess ħin, f'Pascal (Pa).

Jaf ikun rakkomandabbli li ż-żewġ plotts, jiġifieri Plott I jiddaħħlu mal-konċentrazzjoni u anki mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni biex b'hekk tintgħażel il-kurva li hija eqreb mal-linearità. Ivvaluta l-valur EC_{50} (mg/l) viżwalment jew b'analiżi tar-rigressjoni mill-kurva eqreb tal-linearità. Għal finijiet komparattivi, jaf ikun utli li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tiġi espressa bħala mg sustanza kimika/g tas-solidi xotta totali. Biex tikseb din il-konċentrazzjoni, aqsam il-konċentrazzjoni volumetrika (mg/l) bil-konċentrazzjoni volumetrika tas-solidi ta' ħama xotta (g/l) (paragrafu 16).

38. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali milħuqa mill-konċentrazzjoni unika tas-sustanza kimika ta' referenza użata jew l-EC_{50} jekk ikun ġie investigat numru biżżejjed ta' konċentrazzjonijiet.

39. Ikkonverti l-pressjoni medja tal-gass prodott fil-kontroll P_c(Pa) għall-volum b'referenza għall-kurva ta' kalibrazzjoni tal-miter tal-pressjoni (Appendiċi 2) u minn dan ikkalkola l-produzzjoni ta' gass, espressa bħala l-volum prodott f'48 siegħa minn 100 ml ta' ħama mhux dilwita f'konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 2 % (20 g/l) sa 4 % (40 g/l).

Kriterji tal-validità

40. Riżultati mill-prova interlaboratorja tal-ISO (5) urew li s-sustanza kimika ta' referenza (3,5-diklorofenol) ikkawżat 50 % inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass f'medda ta' konċentrazzjonijiet ta' 32 mg/l sa 510 mg/l medja 153 mg/l (paragrafu 10). Din il-medda tant hija wiesgħa li ma jistgħux jiġu stabbiliti b'kunfidenzjalità limiti sodi għall-inibizzjoni bħala kriterji ta' validità; dan għandu jkun possibbli meta l-iżviluppi jkunu wrew kif għandhom jiġu prodotti inokuli iktar konsistenti. Il-volumi ta' gass prodott fil-fliexken ta' kontroll f'48 siegħa varjaw minn 21 ml/g ta' materja xotta ta' ħama sa 149 ml/g (medja ta' 72 ml/g). Ma kien hemm ebda relazzjoni ovvja bejn il-volum ta' gass prodott u l-valur EC_{50} korrispondenti. Il-pH finali varja bejn 6,1 u 7,5.

41. It-test huwa kkunsidrat bħala validu, meta tinkiseb inibizzjoni ta' iktar minn 20 % fil-kontroll ta' referenza li jkun fih 150 mg/l ta' 3,5-diklorofenol, iktar minn 50 ml gass għal kull gramma materja xotta jiġi prodott fil-kontroll inbjank u l-valur pH jaqa' fil-medda ta' 6,2 sa 7,5 fi tmiem it-test.

Rapport tat-Test

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

Sustanza kimika tat-test

— isem komuni, isem tas-sustanza kimika, numru CAS, formula strutturali u proprjetajiet fiżiko kimiċi rilevanti;

— purità (impuritajiet) tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— volumi ta' kontenut ta' likwidu u ta' spazju fil-wiċċ fir-reċipjenti tat-test;

— deskrizzjonijiet tar-reċipjenti tat-test u kejl tal-gass (eż. tip ta' miter ta' pressjoni);

— applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza għas-sistema tat-test, il-konċentrazzjonijiet tat-test użati u l-użu ta' kwalunkwe solvent;

— dettalji tal-inokulu użat: isem l-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. temperatura operattiva, ħin ta' żamma tal-ħama, drenaġġ prinċipalment domestiku jew skart industrijali, eċċ.), konċentrazzjonijiet tas-solidi, attività ta' produzzjoni tal-gass ta' diġestur anaerobiku, espożizzjoni preċedenti jew adattament minn qabel possibbli għal sustanzi kimiċi tossiċi jew sit ta' ġbir tat-tajn, naqal eċċ;

— temperatura ta' inkubazzjoni u medda;

— numru ta' repliki.

Riżultati

— valuri tal-pH fi tmiem it-test;

— id-dejta kollha mkejla miġbura fir-reċipjenti ta' kontroll tas-sustanza kimika tat-test, ta' referenza u ta' inbjank, kif xieraq (eż. pressjoni f'Pa jew millibars) f'forma tabulari;

— inibizzjoni perċentwali fil-fliexken tat-test u ta' referenza, u l-kurvi ta' inibizzjoni/konċentrazzjoni;

— kalkolu tal-valuri EC_{50}, espress bħala mg/l u mg/g;

— produzzjoni tal-gass għal kull gramma ta' ħama fi 48 siegħa;

— raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;

— diskussjonijiet tar-riżultati, inkluż kwalunkwe devjazzjoni mill-proċeduri f'dan il-metodu ta' ttestjar u tiġi diskussa kwalunkwe devjazzjoni fir-riżultati tat-test minħabba l-interferenzi u l-iżbalji minn dak li jkun mistenni;

— jiġi indirizzat ukoll jekk il-fini ta' dan it-test kienx li jkejjel it-tossiċità għal mikro-organiżmi esposti minn qabel jew mhux esposti minn qabel.

LETTERATURA

(1) Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Ħama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tar-Respirazzjoni.

(2) Kapitolu C.43 ta' dan l-Anness: Bijodegradabilità anaerobika tal-komposti organiċi fil-ħama diġerita: metodu ta' kejl tal-produzzjoni tal-gass.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. INT Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

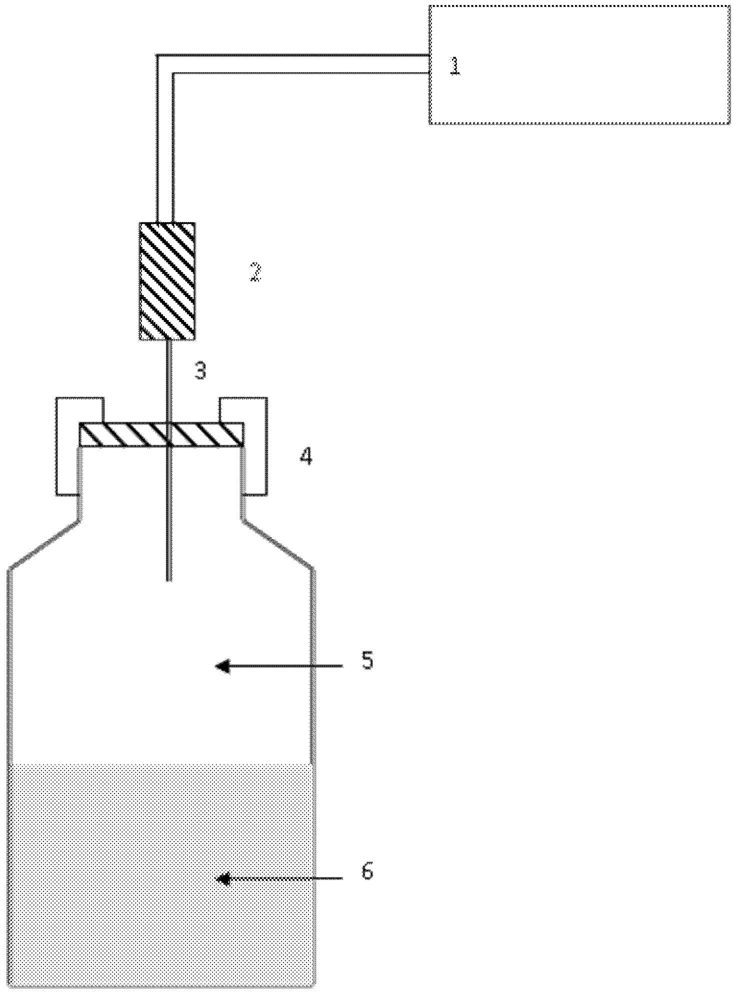
(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

Appendiċi 1

Eżempju ta' apparat biex titkejjel il-produzzjoni ta' bijogass skont il-pressjoni tal-gass



Spjega:

1 — Miter tal-pressjoni

2 — valv impermeabbli għall-gass b'żewġ direzzjonijiet jew tridirezzjonali

3 — Labra ta' siringa

4 — Siġill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)

5 — Spazju fil-wiċċ

6 — Inokulu ta' ħamrija diġerita

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' 35 °C ± 2 °C

Appendiċi 2

Konverżjoni tal-miter tal-pressjoni

Il-qari tal-miter tal-pressjoni jista' jkun relatat mal-volumi ta' gass permezz ta' kurva standard u minn dan jista' jiġi kkalkolat il-volum ta' gass prodott għal kull gramma ta' ħama xotta għal 48 siegħa. Dan l-indiċi ta' attività jintuża bħala wieħed mill-kriterji li permezz tiegħu tista' tiġi vvalutata l-validità tar-riżultati tat-test. Il-kurva ta' kalibrazzjoni tiġi prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufa ta' gass f'35 °C ± 2 °C fi fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma ugwali għal dak tat-taħlita ta' reazzjoni, V_R;

— Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f'35 °C ± 2 °C f'ħames fliexken tas-serum. Issiġilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C ± 2 °C sabiex jekwilibraw;

— Ixgħel il-miter tal-pressjoni, ħallih jistabbilizza, u aġġusta għal żero;

— Daħħal il-labra tas-siringa fis-siġill ta' wieħed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra' żero u agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Injetta 1 ml arja f'35 °C ± 2 °C f'kull flixkun. Daħħal il-labra (fuq il-miter) mis-siġill ta' wieħed mill-fliexken u ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni taqra' żero u mbagħad agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Irrepeti l-proċedura totali permezz ta' 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, u 50 ml arja;

— Ipplottja kurva ta' konverżjoni tal-pressjoni (Pa) mal-volum ta' gass injettat (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari matul il-medda 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml ta' produzzjoni tal-gass.

Appendiċi 3

Fatturi identifikati li jistgħu jwasslu għal riżultati foloz

(a) *Kwalità tat-tappijiet tal-fliexken*

Fis-suq huma disponibbli tipi differenti ta' septa għall-fliexken tas-serum; li ħafna minnhon, inkluża l-gomma tal-butil, tonqsilhom il-impermeabbiltà meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet ta' dan it-test. Xi drabi l-pressjoni tinżel bil-mod ħafna, ladarba s-septum jittaqqab bil-labra tas-siringa. Huwa rakkomandat l-użu ta' septa impermeabbli għall-gass biex jiġu evitati tnixxijiet (paragrafu 12(b)).

(b) *Umdità fil-labra tas-siringa*

Kultant takkumula umdità fil-labra tas-siringa u t-tubi, u hija indikata minn qari tal-pressjoni ftit negattiv. Biex tirrettifika dan, neħħi l-labra u ħawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u waħħal labra ġdid (paragrafi 12(c) u 35).

(c) *Kontaminazzjoni tal-ossiġenu*

Metodi anaerobiċi huma soġġetti għal żball minn kontaminazzjoni mill-ossiġenu, li tista' tikkawża produzzjoni ta' gass iktar baxxa. F'dan il-metodu, din il-possibbiltà għandha titnaqqas bl-użu ta' tekniċi strettament anaerobiċi, inkluż l-użu ta' kompartiment tal-ingwanti.

(d) *Sottostrati grossi fil-ħama*

Il-produzzjoni ta' gass anaerobiku u s-sensittività tal-ħama, huma influwenzati minn sottostrati li huma ttrasferiti mill-inokulu għall-fliexken tat-test. Il-ħama diġerita mid-diġesturi anaerobiċi domestiċi xorta waħda ħafna drabi jkun fiha materja rikonoxxibbli bħal xagħar u residwi tal-pjanti ta' ċelluloża, li għandhom tendenza li jagħmluha diffiċli biex jittieħdu kampjuni rappreżentattivi. Billi l-ħama tingħadda minn passatur, il-materja grossa li ma tinħallx tista' titneħħa, u dan iżid il-probabbiltà ta' kampjunar rappreżentattiv (paragrafu 16).

(e) *Sustanzi kimiċi tat-test volatili*

Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili sejrin jiġu rilaxxati fl-ispazju fil-wicc tal-fliexken tat-test. Dan jista' jirriżulta fit-telf ta' xi parti mill-materjal tat-test mis-sistema matul l-ivventjar wara l-kejliet tal-pressjoni, u dan jipproduċi b'mod qarrieqi valuri ta' EC_{50} għolja. B'għażla xierqa ta' proporzjon ta' volum ta' spazju fil-wiċċ mal-volum likwidu u billi ma jsirx ivventjar wara li jittieħdu l-kejliet tal-pressjoni, l-iżball jista' jitnaqqas (10).

(f) *Nuqqas ta' linearità tal-produzzjoni tal-gass*

Jekk il-plott tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass mal-ħin ta' inkubazzjoni ma tkunx bejn wieħed u ieħor lineari matul il-perjodu ta' 48 siegħa, l-eżattezza tat-test tista' titnaqqas. Biex jingħeleb dan, huwa rakkomandabbli li tintuża ħama ta' diġestjoni minn sors differenti u/jew li tiżdied konċentrazzjoni ikbar tal-brodu tan-nutrijenti u s-sottostrat tat-test, estratt tal-ħmira u glukożju (paragrafu 29).

Appendiċi 4

Applikazzjoni għall-kampjuni ambjentali ta' konċentrazzjoni tal-bijomassa baxxa — tajn anaerobiku, naqal, eċċ.

INTRODUZZJONI

A.1 B'mod ġenerali, l-attività mikrobjali speċifika (volum tal-gass prodott għal kull gramma solidi xotti) ta' tajn anaerobiku, naqal, ħamriji naturali, eċċ, hija ferm iktar baxxa minn dik ta' ħama anaerobika derivata mid-drenaġġ. Minħabba dan, meta jridu jitkejlu l-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi fuq dawn il-kampjuni inqas attivi, xi wħud mill-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu mmodifikati. Għal dawn il-kampjuni inqas attivi, hemm żewġ pjanijiet ta' azzjoni ġenerali possibbli:

(a) Wettaq test preliminari mmodifikat (paragrafu 25) bil-kampjun ta' tajn, ħamrija mhux dilwita, eċċ f'35 °C ± 2 °C jew fit-temperatura fl-istess sit tal-kampjun ta' ġbir, għal simulazzjoni iktar preċiża (bħal fil-Parti 1 tal-ISO 13 641);

(b) Jew wettaq it-test b'ħama ta' diġestur dilwita (1 f'100) biex tistimula l-attività baxxa mistennija mill-kampjun tal-ambjent, iżda żomm it-temperatura f'35 °C ± 2 °C (bħal fil-Parti 2 tal-ISO 13 641).

A.2 Opzjoni (a) tista' tintlaħaq billi jiġi segwit il-metodu deskritt hawnhekk (ekwivalenti għall-Parti 1 tal-ISO 13 641), iżda huwa essenzjali li jsir test preliminari (paragrafu 25) biex jiġu aċċertati l-aqwa kundizzonijiet, sakemm dawn ma jkunux diġà magħrufin minn ittestjar preċedenti. Il-kampjun ta' ħama jew naqal għandu jitħawwad sew, eż. fi blender, u, jekk ikun meħtieġ, dilwit bi proporzjon żgħir ta' ilma ta' dilwizzjoni li tneħħitlu l-arja (paragrafu 14) b'tali mod li jkun mobbli biżżejjed biex jiġi ttrasferit minn pipetta b'ponta ħoxna jew ċilindru tal-kejl. Jekk jitqies li n-nutrijenti jaf ikunu neqsin, il-kampjun tal-ħama jista' jiġi ċċentrifugat (f'kundizzjonijiet anaerobiċi) u sospiż mill-ġdid fil-midjum minerali li fih l-estratt tal-ħmira (A.11).

A.3 Opzjoni (b). Dan raġonevolment jimita l-attività baxxa ta' kampjuni ambjentali iżda jonqsu l-konċentrazzjoni għolja ta' solidi sospiżi li jinsabu f'dawn il-kampjuni. Ir-rwol ta' dawn is-solidi fl-inibizzjoni mhuwiex magħruf, iżda huwa possibbli li r-reazzjoni bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kostitwenti tat-tajn, kif ukoll l-adsorbiment tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solidi, jirriżultaw fi tnaqqis tat-tossiċita tas-sustanza kimika tat-test.

A.4 It-temperatura hija fattur importanti ieħor: għal simulazzjoni stretta, għandhom isiru testijiet fit-temperatura tas-sit tal-kampjun, peress li gruppi differenti ta' konsorzji ta' batterji li jipproduċu l-metan huma magħrufa li joperaw f'meded ta' temperatura differenti, jiġifieri termofili (~ 30-35 °C), mesofili (20-25 °C) u psikrofili (< 20 °C), li jistgħu jesebixxu mudelli inibitorji differenti.

A.5 Durata. Fit-test ġenerali, Parti 1, permezz ta' ħama mhux dilwita, il-produzzjoni ta' gass fil-jiem 2-4 dejjem kienet biżżejjed, filwaqt li fil-Parti 2 b'ħama dilwita f'mitt parti, ma ġiex prodott biżżejjed gass jew ma ġie prodott ebda gass, f'dan il-perjodu fir-ring test. Madsen et al (1996), fid-deskrizzjoni ta' dan l-aħħar test, jgħidu li tal-inqas għandhom jitħallew 7 ijiem.

Ittestjar b'konċentrazzjoni ta' bijomassa baxxa (Opzjoni b)

Għandhom isiru l-bidliet u l-emendi li ġejjin, li jżidu jew inaqqsu xi paragrafi u sottoparagrafi eżistenti tat-test ewlieni.

A.6 Żid ma' Paragrafu 6: Prinċipju tat-test;

'Din it-teknika tista' tintuża b'ħama anaerobika dilwita f'mitt parti, parzjalment biex tistimula l-attività baxxa tat-tajn u n-naqal. It-temperatura ta' inkubazzjoni tista' tkun 35 °C jew dik tas-sit minn fejn inġabar il-kampjun. Peress li l-attività batterjali hija ferm iktar baxxa fil-ħama mhux dilwita, il-perjodu ta' inkubazzjoni għandu jiġi estiż għal tal-inqas 7 ijiem.'

A.7 Żid ma' paragrafu 12 (a):

'l-inkubatur għandu jkun kapaċi jopera f'temperaturi ta' 15 °C.'

A.8 Żid reaġent żejjed wara l-Paragrafu 13:

'Aċidu fosforiku (H_3PO_4), 85 % b'massa fl-ilma.'

A.9 Żid fi tmiem il-Paragrafu 16:

'Uża konċentrazzjoni finali ta' 0,20 ± 0,05 g/l mit-total ta' solidi xotti fit-test.'

A.10 Paragrafu 17. Sottostrat tat-test

Dan is-sottostrat ma għandux jintuża, iżda huwa sostitwit minn estratt tal-ħmira (ara l-paragrafi 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Huwa meħtieġ midjum minerali, inklużi elementi ta' frak, għad-dilwizzjoni ta' ħama anaerobika, u għal konvenjenza, is-sottostrat organiku, l-estratt tal-ħmira, jiżdied ma' dan il-midjum.

Żid wara Paragrafu 17

'(a) Midjum minerali tat-test, b'estratt tal-ħmira.

Dan huwa ppreparat minn midjum tat-test ikkonċentrat għal 10 darbiet (paragrafu 17(b); A.12) b'soluzzjoni ta' element tal-frak (paragrafu 17(c); A.13). Uża nonaidrat tas-sulfur tas-sodju li jkun għadu kif ġie fornit (il-paragrafu 17(b); A.12) jew aħslu u nixxfu qabel l-użu, biex tiżgura li għandu kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. Jekk it-test jitwettaq mingħajr l-użu ta' kompartiment tal-ingwanti (paragrafu 12(j)), il-konċentrazzjoni ta' sulfur tas-sodju fis-soluzzjoni ewlenija għandha tiżdied għal 2 g/l (minn 1 g/l). Sodium sulphide jista' jiżdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija xierqa mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa, peress li din il-proċedura sejra tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni, biex tikseb konċentrazzjoni finali ta' 0,2 g/l. Inkella jista' jintuża ċ-ċitrat tat-titanju (III) (paragrafu 17(b)). Żidu mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa biex tikseb konċentrazzjoni ta' 0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l. Iċ-ċitrat tat-titanju (III) huwa aġent riduċenti effikaċi ħafna u b'tossiċità baxxa, li jiġi ppreparat kif ġej: Ħoll 2,94 g diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) (li jirriżulta f'soluzzjoni ta' 200 mmol/l) u żid 5 ml ta' soluzzjoni klorur tat-titanju (III) (ilma ta' dilwizzjoni ta' 15 g/100 ml) Innewtralizza għal pH 7 ± 0,5 b'karbonat tas-sodju u ferra' ġo flixkun tas-serum xieraq taħt fluss ta' gass tan-nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l. Uża l-midjum tat-test mill-ewwel jew aħżen f'4 °C għal mhux iktar minn jum.

A.12 (b) Midjum tat-test ikkonċentrat għal għaxar darbiet, ippreparat b'dan li ġej:

anhydrous potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	2,7 g
Fosfat tal-idroġenu tad-disodju (Na_2HPO_4)	4,4 g
(jew 11,2 g dodekaidrat)	5,3 g
ammonium chloride (NH_4Cl)	
klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
tetraidrat (II) tal-klorur tal-ħadid ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resażurina (indikatur tar-redox)	0,01 g
nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(jew (III) ċitrat tat-titanju) konċentrazzjoni finali	0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l
soluzzjoni ta' mikroelement (ara l-paragrafu 17 (c); A.13)	10,0 ml
estratt tal-ħmira	100 g
Ħoll f'ilma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml

A.13 (c) Soluzzjoni ta' mikroelement, ippreparata b'dawn li ġejjin:

tetraidrat (II) tal-klorur tal-ħadid ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
aċidu orto-boriku (H_3BO_3)	0,05 g

klorur taż-żingu ($ZnCl_2$)	0,05 g
(II) klorur tar-ram ($CuCl_2$)	0,03 g
diidrat tal-molibdat tas-sodju ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-nikil ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
disodium selenite (Na_2SeO_3)	0,05 g
Ħoll f'ilma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml'

A.14 Paragrafu 25: Test preliminari

Huwa essenzjali li jsir test preliminari kif deskritt fil-paragrafu 24, ħlief li l-konċentrazzjoni ta' solidi tal-ħama għandha tkun mitt darba iżgħar minn ta' dawk mogħtija, li huma 0,1 g/l, 0,2 g/l u 0,4 g/l. Id-durata tal-inkubazzjoni għandha tkun tal-inqas ta' 7 ijiem.

Nota: Fir-ring test (5) il-volum ta' spazju fil-wiċċ kien ferm ogħla f'volum totali ta' 75 %; dan għandu jkun fil-medda rakkomandata ta' 10 %-40 %. Il-kriterju rilevanti huwa dak li l-volum ta' gass prodott f'inibizzjoni ta' madwar 80 % għandu jkun jista' jitkejjel bi preċiżjoni aċċettabbli (eż. ± 5 % sa ± 10 %).

A.15 Paragrafu 26 sa 30: Żieda ta' sustanza kimika tat-test, inokulu u sottostrat.

Iż-żidiet isiru bl-istess mod kif deskritt f'dawn il-paragrafi, iżda s-soluzzjoni tas-sottostrat (paragrafu 17) tiġi ssostitwita bil-midjum tat-test flimkien ma' sottostrat ta' estratt tal-ħmira (A.11).

Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni finali ta' solidi ta' ħama xotta titnaqqas minn 2 g/l — 4 g/l sa 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Żewġ eżempji ta' żieda ta' komponenti mat-taħlita tat-test jingħataw fit-Tabellla A.1, li tieħu post it-tabella fil-paragrafu 29.

A.16 Paragrafu 33: Inkubazzjoni tal-fliexken

Minħabba r-rata iktar baxxa mistennija ta' produzzjoni tal-gass, l-inkubazzjoni ssir għal tal-inqas 7 ijiem.

A.17 Paragrafu 34: Kejliet tal-pressjoni

L-istess proċedura għall-kejl tal-pressjoni fl-ispazju fil-wiċċ tal-fliexken tintuża kif deskritt fil-paragrafu 34, jekk ikunu meħtieġa l-ammonti fil-fażi gassuża. Jekk għandhom jitkejlu l-ammonti totali ta' CO_2 flimkien ma' CH_4, il-pH tal-fażi likwida jitnaqqas għal madwar pH 2 bl-injezzjoni ta' H_3PO_4 f'kull flixkun rilevanti u l-kejl tal-pressjoni wara li jitħawwad għal madwar 30 minuta fit-temperatura tat-test. Madankollu, tista' tinkiseb iktar informazzjoni dwar il-kwalità tal-inokulu billi titkejjel il-pressjoni f'kull flixkun qabel u wara l-aċidifikazzjoni. Pereżempju, meta r-rata ta' produzzjoni ta' CO_2 tkun ferm ogħla minn dik tal-metan, is-sensittività tal-batterji fermentattivi tista' tinbidel u/jew il-batterji metanoġeniċi huma preferenzjalment affettwati mis-sustanza kimika tat-test.

A.18 Paragrafu 36: kejl tal-pH

Jekk sejjer jintuża H_3PO_4, għandhom jiġu kkonfigurati xi fliexken żejda, li magħhom ma għandu jiżdied ebda H_3PO_4, speċjalment għall-kejl tal-pH.

REFERENZA:

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

Tablella A.1.

Eżempji tal-konfigurazzjoni tat-test għal-lottijiet tat-test

Kostitwenti tat-Taħlita ta' Reazzjoni	Eżempju 1	Eżempju 2	Ordni normali taż-żieda
Konċentrazzjoni tal-inokulu ppreparat (g/l)	0,42	2,1	—
Volum tal-inokulu miżjud (ml)	45	9	4
Konċentrazzjoni tal-inokulu fil-fliexken tat-test (g/l)	0,20	0,20	—
Volum tal-midjum tat-test miżjud (ml)	9	9	2
Volum tal-ilma ta' dilwizzjoni miżjud (ml)	36	72	3
Konċentrazzjoni tal-estratt tal-ħmira fil-fliexken tat-test (g/l)	9,7	9,7	—
Volum tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml)	3	3	1
Volum totali tal-likwidu (ml)	93	93	—

Appendiċi 5

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

C.35 TEST TAT-TOSSIĊITÀ *LUMBRICULUS* TAN-NAQAL/ILMA PERMEZZ TA' NAQAL MIŻJUD

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ittestjar (TG) 225 tal-OECD (2007). Annimali endobentiċi li jieklu n-naqal huma soġġetti għal espożizzjoni potenzjalment għolja għal sustanzi kimiċi mwaħħla man-naqal u għalhekk għandhom jingħataw attenzjoni preferenzjali, eż. (1), (2), (3). Fost dawn l-inġesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fin-naqal tas-sistemi akkwatiċi. Permezz ta' bijoturbazzjoni tan-naqal u billi jservu bħala priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza qawwija fuq il-bijodisponibbiltà ta' dawn is-sustanzi kimiċi għal organiżmi oħra, eż. ħut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi andobentiċi (eż. *Lumbriculus variegatus*) iħaffru fin-naqal, u jieklu frak tan-naqal taħt wiċċ in-naqal. Dan jiżgura espożizzjoni tal-organiżmi tat-test għas-sustanza kimika tat-test permezz tar-rotot ta' teħid possibbli kollha (eż. kuntatt ma', u inġestjoni ta' frak tan-naqal kontaminat, iżda anki permezz tal-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jitfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni mtawla tal-oligoċaeti endobentiċi *Lumbriculus variegatus* (Müller) għal sustanzi kimiċi assoċjati man-naqal. Huwa bbażat fuq il-protokolli tat-test tal-bijoakkumulazzjoni u t-tossiċità tan-naqal eżistenti, eż. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Il-metodu huwa deskritt għal kundizzjonijiet tat-test statiċi. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa ż-żieda tan-naqal mas-sustanza kimika tat-test. L-użu ta' naqal miżjud huwa maħsub li jistimula naqal ikkontaminat b'sustanza kimika tat-test.

3. Is-sustanzi kimiċi li jeħtieġ li jiġu ttestjati għal organiżmi li jgħixu fin-naqal ġeneralment jippersistu f'dan il-kompartiment fuq perjodi ta' żmien twal. L-organiżmi li jgħixu f'dan in-naqal jistgħu jiġu esposti permezz ta' diversi rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u l-ħin li jittieħed għal kull waħda minnhom biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi fuq il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika kkonċernata u d-destin finali tagħha fl-annimal. Għal sustanzi kimiċi adsorbenti ħafna (eż. b'log $K_{ow} > 5$) jew għal sustanzi kimiċi li jeħlu b'mod kovalenti man-naqal, l-inġestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni sinifikanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' tali sustanzi kimiċi, l-ikel meħtieġ għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tal-ittestjar jiżdied man-naqal qabel l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (11). Il-metodu ta' ttestjar deskritt huwa ddettaljat biżżejjed biex ikun jista' jitwettaq it-test, filwaqt li jippermetti adattamenti fid-disinn sperimentali skont il-kundizzjonijiet f'laboratorji partikolari u d-diversi karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test.

4. Il-metodu ta' ttestjar għandu l-għan li jistabbilixxi l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u l-bijomassa tal-organiżmi tat-test. Il-parametri bijoloġiċi mkejla huma n-numru totali ta' dud li baqa' ħaj u l-bijomassa (piż xott) fi tmiem l-espożizzjoni. Din id-dejta tiġi analizzata permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % (eż. EC_{50}, EC_{25}, u EC_{10}), jew permezz ta' ipoteżi statistika bix tiġi ddeterminata l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u l-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC).

5. Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, 'Test tat-tossiċità kironomid tan-naqal/ilma permezz ta' naqal miżjud' (6), ipprovda ħafna dettalji essenzjali u utli għat-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tat-tossiċità tan-naqal ippreżentat. Għalhekk, dan id-dokument iservi bħala bażi li permezz tiegħu twettqu l-modifiki meħtieġa għat-twettiq tat-testijiet tat-tossiċita tan-naqal b'*Lumbriculus variegatus*. Dokumenti oħra li ssir referenza għalihom huma eż. il-Gwida Standard tal-ASTM għad-Determinazzjoni tal-Bijoakkumulazzjoni tal-Kontaminanti Assoċjati man-Naqal minn Invertebrati Bentiċi (3), il-Metodi tal-EPA tal-Istati Uniti għall-Kejl tat-Tossiċità u l-Bijoakkumulazzjoni ta' Kontaminanti Assoċjati man-Naqal b'Invertebrati tal-Ilma Ħelu (7), u l-Gwida Standard tal-ASTM għall-Ġbir, il-Ħażna, il-Karatterizzazzjoni, u l-Manipulazzjoni tan-Naqal għall-Ittestjar Tossikoloġiku u għall-għażla ta' kampjuni użati biex jinġabru l-invertebrati bentiċi (12). Barra minn hekk, l-esperjenza prattika miksuba matul ir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar ((13), ir-rapport dwar ir-ring test), u d-dettalji mid-dokumentazzjoni huma sorsi ewlenin ta' informazzjoni għat-tfassil ta' dan id-dokument.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI TA' GWIDA

6. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test bħal prekawzjonijiet dwar is-sigurtà, kundizzjonijiet ta' ħżin xierqa u metodi analitiċi qabel ma jinbeda l-istudju. F'(14) hija pprovduta gwida għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċli biex jitwettaq it-test.

7. Qabel ma jitwettaq test, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:

— isem komuni, isem tas-sustanza kimika (preferibbilment isem IUPAC), formola strutturali, numru tar-reġistru CAS, purità;

— il-pressjoni tal-fwar;

— solubbiltà fl-ilma.

8. L-informazzjoni addizzjonali li ġejja hija kkunsidrata utli qabel ma jinbeda t-test:

— koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma, K_{ow};

— koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma organiku, espress bħala K_{oc};

— idroliżi;

— fototrasformazzjoni fl-ilma;

— bijodegradabbiltà;

— tensjoni tal-wiċċ.

9. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar ċerti karatteristiċi tan-naqal li sejjer jintuża qabel ma jinbeda t-test (7). Għal dettalji ara l-paragrafi 22 sa 25.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Dud bi stat fiżjoloġiku simili (sinkronizzat kif deskritt fl-Appendiċi 5) huwa espost għal serje ta' konċentrazzjonijiet tossikanti applikati għall-fażi tan-naqal ta' sistema tan-naqal/ilma. Bħala midjums għandhom jintużaw naqal artifiċjali u ilma rikostitwit. Ir-reċipjenti tat-test mingħajr iż-żieda tas-sustanzi kimiċi tat-test jservu bħala kontrolli. Is-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki ta' kull livell ta' konċentrazzjoni, u l-organiżmi tat-test imbagħad jiġu introdotti fir-reċipjenti tat-test fejn ġew ekwilibrati n-naqal u l-konċentrazzjonijiet tal-ilma (ara l-paragrafu 29). L-annimali tat-test jiġu esposti għas-sistemi tan-naqal/ilma għal perjodu ta' 28 jum. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors ta' ikel (ara l-paragrafi 22 sa 23, u l-Appendiċi 4) biex jiġi żgurat li d-dud jikber u jirriproduċi ruħu f'kundizzjonijiet ta' kontroll. B'dan il-mod huwa żgurat li l-annimali tat-test jiġu esposti tul l-ilma u n-naqal kollu kif ukoll mill-ikel tagħhom.

11. Il-punt ta' tmiem ippreferut ta' dan it-tip ta' studju huwa EC_x (eż. EC_{50}, EC_{25}, u EC_{10}; il-konċentrazzjoni tal-effett, li taffettwa x % tal-organiżmi tat-test) għar-riproduzzjoni u l-bijomassa, rispettivament, meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, ta' min jinnota li fid-dawl tal-inċertezza qawwija ta' EC_x baxxa (eż. EC_{10}, EC_{25}) b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għoljin ħafna (eż. (15)) u s-setgħa statistika kkalkolata matul l-ittestjar tal-ipoteżi, l-EC_{50} titqies il-punt ta' tmiem l-iktar b'saħħtu. Barra minn hekk, tista' tiġi kkalkolata l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC), u l-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) għall-bijomassa, u r-riproduzzjoni, jekk id-disinn tat-test u d-dejta jappoġġjaw dawn il-kalkoli (ara l-paragrafi 34 sa 38). Il-fini tal-istudju, l-EC_x jew id-derivazzjoni tal-NOEC, sejrin jiddeterminaw id-disinn tat-test.

ITTESTJAR TA' REFERENZA

12. Il-prestazzjoni tal-organiżmi ta' kontroll hija mistennija li turi b'mod suffiċjenti l-kapaċità ta' laboratorju li jwettaq it-test, u jekk tkun disponibbli dejta storika, ir-repetibbiltà tat-test. Barra minn hekk, jistgħu jitwettqu testijiet ta' referenza tat-tossiċità f'intervalli regolari permezz ta' tossikanti ta' referenza biex tiġi vvalutata s-sensittività tal-organiżmi tat-test. Testijiet tat-tossiċità ta' referenza ta' 96 siegħa fl-ilma biss jistgħu juru b'mod sodisfaċenti, is-sensittività u l-kundizzjoni tal-annimali tat-test (4)(7). Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-pentaklorofenol (PCP) f'testijiet kompluti (espożizzjoni ta' 28 jum għal naqal miżjud) hija inkluża fl-Appendiċi 6, u fir-rapport dwar ir-ring test tal-Metodu ta' Ttestjar (13). It-tossiċità akuta, fl-ilma biss tal-PCP hija deskritta eż. f'(16). Din l-informazzjoni tista' tintuża għal paragun tas-sensittività tal-organiżmu tat-test f'testijiet ta' referenza b'PCP bħala t-tossikant ta' referenza. Il-klorur tal-potassju (KCl) jew is-sulfat tar-ram ($CuSO_4$) ġew rakkomandati bħala t-tossikanti ta' referenza b'*L. variegatus* (4)(7). S'issa, l-istabbiliment ta' kriterji tal-kwalità abbażi tat-tossiċità tad-dejta għall-KCl huwa diffiċli minħabba n-nuqqas ta' dejta mid-dokumentazzjoni għal *L. variegatus*. Informazzjoni dwar it-tossiċità tar-ram għal *L. variegatus* tista' tinstab f'(17) sa (21).

VALIDITÀ TAT-TEST

13. Għal test biex ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiżiti li ġejjin:

— Ring test (13) wera li għal Lumbriculus variegatus, in-numru medju ta' dud li baqa' ħaj għal kull replikat fil-kontrolli kellu jiżdied b'fattur ta' mill-inqas 1,8 fi tmiem l-espożizzjoni meta mqabbel man-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni.

— Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 matul it-test kollu.

— Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar ma għandhiex tkun ta' inqas minn 30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura tat-test matul it-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Sistema tat-test

14. Huma rakkomandati sistemi statiċi mingħajr tiġdid tal-ilma tal-madwar. Jekk il-proporzjon ta' naqal/ilma (ara l-paragrafu 15) huwa xieraq, arjazzjoni bil-mod sejra tkun normalment biżżejjed biex iżżomm il-kwalità tal-ilma f'livelli aċċettabbli għall-organiżmi tat-test (eż. jiġu massimizzati l-livelli ta' ossiġenu maħlula, tiġi minimizzata l-akkumulazzjoni ta' prodotti eskritorjali). Sistemi semistatiċi jew bi fluss kontinwu b'tiġdid intermittenti jew kontinwu tal-ilma tal-madwar għandhom jintużaw biss f'każijiet eċċezzjonali, peress li t-tiġdid regolari tal-ilma tal-madwar huwa mistenni li jaffettwa l-ekwilibriju tas-sustanza kimika (eż. telfiet tas-sustanza kimika tat-test mis-sistema tat-test).

Reċipjenti u apparat tat-test

15. L-espożizzjoni għandha ssir f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' eż. 250 ml li għandhom dijametru ta' 6 cm. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti tal-ħġieġ xierqa oħra, iżda dawn għandhom jiggarantixxu fond xieraq tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Kull reċipjent għandu jirċievi saff ta' madwar 1,5 — 3 cm ta' naqal formulat. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal mas-saff tal-ilma tal-madwar għandu jkun ta' 1:4. Ir-reċipjenti għandhom ikunu ta' kapaċità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri n-numru ta' dud tat-test miżjud ma' kull unità ta' ppeżar tan-naqal, (ara wkoll il-paragrafu 39).

16. Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrin jiġu f'kuntatt mas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jħollu, jadsorbu s-sustanzi kimiċi tat-test jew jiffiltraw sustanzi kimiċi oħrajn u jkollhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Għandu jintuża politetrafluworoetilen (PTFE), azzar inossidabbli u/jew ħġieġ għal kwalunkwe tagħmir li jkollu kuntatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi kimiċi organiċi magħrufa li jadsorbu mal-ħġieġ, jaf ikun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir sejjer ikollu jintrema wara l-użu.

Speċijiet tat-test

17. L-ispeċi tal-ittestjiar użata f'dan it-tip ta' studju hija l-oligoċaeta tal-ilma ħelu *Lumbriculus variegatus* (Müller). Din l-ispeċi tiflaħ għal firxa wiesgħa ta' tipi ta' naqal, u tintuża ħafna għat-tossiċità tan-naqal u l-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni [eż. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Għandu jiġi rrapportat l-oriġini tal-annimali tat-test, il-konferma tal-identità tal-ispeċijiet (eż. (36)) kif ukoll il-kundizzjonijiet tal-kultura. L-identifikazzjoni tal-ispeċi mhijiex meħtieġa qabel kull test, jekk l-organiżmi jkunu ġejjin minn kultura domestika.

Kulturi tal-organiżmi tat-test

18. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-twettiq tat-testijiet tat-tossiċità tan-naqal, huwa utli li d-dud jinżamm f'kultura tal-laboratorju permanenti. Il-gwida għall-metodi tal-kulturi tal-laboratorju għal *Lumbriculus variegatus*, u s-sorsi ta' kulturi li jibdew il-fermentazzjoni jingħataw fl-Appendiċi 5. Għal dettalji dwar il-kulturi ta' din l-ispeċi, ara r-referenzi (3), (7), (27).

19. Biex jiġi żgurat li t-testijiet jitwettqu b'annimali tal-istess speċi, huwa rakkomandat ħafna l-istabbiliment ta' kulturi tal-ispeċi uniċi. Assigura li l-kulturi u speċjalment id-dud użat fit-testijiet ma għandhom ebda mard u anormalitajiet osservabbli.

Ilma

20. Huwa rakkomandat ilma rikostitwit skont il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (37) għall-użu bħala ilma tal-madwar fit-testijiet; jista' jintuża wkoll għall-kulturi fil-laboratorju tad-dud (ara l-Appendiċi 2 għall-preparazzjonijiet). Jekk ikun meħtieġ, jista' jintuża ilma naturali. L-ilma magħżul għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti t-tkabbir u r-riproduzzjoni tal-ispeċi tat-test għal matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u ttestjar mingħajr ebda dehra jew imġiba anormali. *Lumbriculus variegatus* intwera li jibqa' ħaj, jikber, u jirriproduċi f'dan it-tip ta' ilma (30), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u l-kulturi. Jekk jintuża ilma rikostitwit, il-kompożizzjoni tiegħu għandha tiġi rrapportata, u l-ilma għandu jiġi kkaratterizzat qabel l-użu tal-inqas mill-pH, il-kontenut ta' ossiġenu, u l-ebusija (espressi bħala mg $CaCO_3$/l). Analiżi tal-ilma għall-mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu jaf tipprovdi informazzjoni utli (ara eż. Appendiċi 3).

21. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun fil-medda bejn 6,0 sa 9,0 (ara l-paragrafu 13). Jekk tkun mistennija żieda fl-iżvilupp tal-ammonja, huwa kkunsidrat utli li l-pH jinżamm bejn 6,0 u 8,0. Għall-ittestjar ta' eż. aċidi organiċi dgħajfa, huwa rakkomandabbli li l-pH jiġi aġġustat bl-ilqugħ tal-ilma li għandu jintuża fit-test, kif deskritt eż. f'(16). L-ebusija totali tal-ilma li għandu jintuża fit-test għandha tkun bejn 90 u 300 mg $CaCO_3$ għal kull litru għall-ilma naturali. L-Appendiċi 3 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizzjonali għal ilma tad-dilwizzjoni aċċettabbli skont il-Linja Gwida tal-OECD Nru. 210 (38).

Naqal

22. Peress li naqal naturali mhux ikkontaminat minn daqs tal-frak jaf ma jkunx disponibbli matul is-sena kollha, u organiżmi indiġeni kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluwenzaw it-test, għandu preferibbilment jintuża naqal ifformulat (imsejjaħ ukoll sendiment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). L-użu ta' naqal formulat inaqqas il-varjabbiltà tal-kundizzjonijiet tat-test kif ukoll l-introduzzjoni ta' fawna indiġena. In-naqal formulat li ġej huwa bbażat fuq in-naqal artifiċjali skont (6), (39) u (40). Huwa rakkomandat għall-użu f'dan it-tip ta' test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

(a) 4-5 % (piż xott) ta' pit ta' sfanju; huwa importanti li l-pit jintuża f'forma ta' trab, bi grad ta' dekompożizzjoni: 'midjum', mitħun irqiq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm), u mnixxef biss bl-arja.

(b) 20 ± 1 % (piż xott) tafal tal-kawlina (kontenut ta' kawlinite preferibbilment ta' iktar minn 30 %).

(c) 75-76 % (piż xott) ramel kwarzuż (ramel irqiq, daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 µm).

(d) Ilma dejonizzat, 30–50 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti ta' naqal xott.

(e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura ($CaCO_3$) sabiex jiġi aġġustat il-pH tat-taħlita finali tan-naqal.

(f) Il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) tal-piż xott tan-naqal u għandu jiġi aġġustat permezz ta' ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

(g) L-ikel, eż. weraq f'forma ta' trab ta' Ħurrieq (Urtica sp., skont l-istandards farmaċewtiċi, għall-konsum mill-bniedem), jew taħlita ta' weraq f'forma ta' trab ta' Urtica sp. b'alfaċelluloża (1:1), f'0,4 — 0,5 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti tan-naqal xott; għal dettalji ara l-Appendiċi 4.

23. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina, il-materjal tal-ikel, u r-ramel għandhom ikunu magħrufa. Minbarra l-punt g), Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness (6) jelenka materjali tal-pjanti alternattivi li għandhom jintużaw bħala sors ta' nutrijenti: weraq deidratati taċ-ċawsli (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*), jew ħaxix taċ-ċereali.

24. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jiżdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jippermetti għal tal-inqas riproduzzjoni aċċettabbli fil-kontrolli. Analiżi tan-naqal artifiċjali jew il-kostitwenti tiegħu għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu, tista' tipprovdi informazzjoni utli.

Eżempju għall-preparazzjoni tan-naqal formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 4. It-taħlit ta' kostitwenti xotta huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar, ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. iż-żamma fil-wiċċ ta' frak tal-pit), u li l-pit jew in-naqal huwa suffiċjentement kundizzjonat (ara wkoll il-paragrafu 25 u l-Appendiċi 4). In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-oriġini tal-kostitwenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ir-ramel perċentwali, il-ħama, u t-tafal), il-kontenut totali tal-karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox huwa fakultattiv.

25. Jekk ikun meħtieġ, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiku, in-naqal naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservi wkoll bħala naqal tat-test u/jew tal-kulturi (3). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-oriġini (sit ta' kollezzjoni), il-pH u l-ammonja tal-ilma interstizjali, il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) u l-kontenut ta' nitroġenu, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ramel perċentwali, ħama, u tafal) kontenut ta' ilma perċentwali (7), u ma għandu jkollu ebda kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu magħhom, jew jikkaċċjaw għall-organiżmi tat-test. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox u l-kapaċità tal-iskambju katjoniku huwa fakultattiv. Huwa rakkomandat ukoll li, qabel jiżdied bis-sustanza kimika tat-test, in-naqal naturali jkun soġġett għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu jeżistu fit-test sussegwenti. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema.

26. In-naqal li għandu jintuża għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti s-sopravivenza u r-riproduzzjoni tal-organiżmi ta' kontroll għad-durata tal-perjodu ta' espożizzjoni mingħajr ma tintwera ebda dehra jew imġiba anormali. Iż-żewġ dud għandhom iħaffru fin-naqal, u għandhom jieklu n-naqal. Ir-riproduzzjoni fil-kontrolli għandha tal-inqas tkun skont il-kriterju ta' validità kif deskritt fil-paragrafu 13. Il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar fuq wiċċ in-naqal, li tindika inġestjoni tan-naqal mid-dud, għandha tiġi rreġistrata u tista' tkun utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tal-mogħdijiet ta' espożizzjoni. Informazzjoni addizzjonali dwar l-inġestjoni tan-naqal tista' tinkiseb permezz tal-metodi deskritti f'(24), (25), (44), u (45), li jispeċifikaw l-inġestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-frak fl-organiżmi tat-test.

27. Il-proċeduri ta' manipulazzjoni għan-naqal naturali qabel l-użu fil-laboratorju huma deskritti f'(3), (7), u (12). Il-preparazzjoni u l-ħżin tan-naqal artifiċjali li huwa rakkomandat li jintuża fit-test ta' *Lumbriculus* huma deskritti fl-Appendiċi 4.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

28. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiżdied man-naqal. Peress li l-biċċa l-kbira tas-sustanzi kimiċi tat-test huma mistennija jkollhom solubbiltà baxxa fl-ilma, dawn għandhom jinħallu f'solvent organiku xieraq eż. aċetun, n-essan, ċikloessan) f'volum żgħir kemm jista' jkun sabiex tiġi ppreparata s-soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija għandha titħallat mal-istess solvent biex jiġu ppreparati s-soluzzjonijiet tat-test. It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent, u s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għażla ta' aġent solubilizzanti xieraq. Għal kull livell ta' konċentrazzjoni, għandu jintuża l-istess volum ta' soluzzjoni korrispondenti. In-naqal għandu jiżdied b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Kull waħda mis-soluzzjonijiet tat-test imbagħad titħallat ma' ramel kwarzuż kif deskritt fil-paragrafu 22 (eż. 10 g ta' ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test). Sabiex ir-ramel kwarzuż jixxarrab kompletament, volum ta' 0,20 — 0,25 ml għal kull gramma ta' ramel instab li huwa suffiċjenti. Minn hemm 'il quddiem, is-solvent għandu jiġi evaporat sa ma jinxef. Sabiex jitnaqqsu t-telfiet tas-sustanza kimika tat-test permezz tal-koevaporazzjoni (eż. skont il-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika), ir-ramel miksi għandu jintuża minnufih wara li jitnixxef. Ir-ramel xott jitħallat ma' ammont xieraq ta' naqal formulat tal-livell ta' konċentrazzjoni korrispondenti. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-taħlita ta' ramel u sustanza kimika tat-test għandu jitqies meta jiġi ppreparat in-naqal (jiġifieri n-naqal għandu għalhekk jiġi ppreparat b'inqas ramel). Il-vantaġġ ewlieni ta' din il-proċedura huwa dak li virtwalment ma jiddaħħal ebda solvent fin-naqal (7). Inkella, eż. għal naqal tal-għelieqi, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied b'porzjon xott u mitħun irqiq tan-naqal kif deskritt hawn fuq għar-ramel kwarzuż, jew billi s-sustanza kimika tat-test titħallat fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal tiġi distribwita sew u b'mod uniformi fin-naqal. Jekk ikun meħtieġ, jistgħu jiġu analizzati s-sottokampjuni biex jiġu kkonfermati l-konċentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal, u biex jiġi ddeterminat il-grad ta' omoġenità. Jaf ikun utli li jiġu analizzati s-sottokampjuni tas-soluzzjonijiet tat-test biex jiġu kkonfermati l-konċentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal. Peress li solvent jintuża għall-kisi tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-ramel kawrzuż, għandu jintuża kontroll tas-solvent li jiġi ppreparat bl-istess ammont ta' solvent bħan-naqal tat-test. Għandu jiġi rrapportat il-metodu użat għaż-żieda, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura ta' żieda speċifika minbarra dik deskritta hawn fuq. Il-metodu ta' żieda jista' jiġi adattat għall-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, eż. biex jiġi evitat telf minħabba volatilizzazzjoni matul iż-żieda jew l-ekwilibrazzjoni. Gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' żieda tingħata f'Environment Canada (1995) (46).

29. Ladarba n-naqal miżjud ikun ġie ppreparat, distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u mimli bil-ilma tat-test, huwa rakkomandabbli li tkun tista' ssir il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-fażi milwiema (eż. (3)(7)(9)). Dan preferibbilment għandu jsir fil-kundizzjonijiet ta' temperatura u arjazzjoni użati fit-test. Il-ħin ta' ekwilibrazzjoni xieraq huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanzi kimiċi, u jista' jkun f'ordni ta' sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat) (eż. (27)(47)). F'dan it-test, ekwilibriju mhuwiex mistenni, iżda huwa rakkomandat perjodu ta' ekwilibrazzjoni ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Għalhekk, il-ħin għad-degradazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer kemm jista' jkun jitnaqqas. Skont il-fini tal-istudju, eż. meta jridu jiġu imitati kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwilibrat jew jitqaddem għal perjodu itwal.

30. Fi tmiem dan il-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, għandhom jittieħdu kampjuni tal-inqas tal-ilma tal-madwar u n-naqal aggregat, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjonijiet u waħda iktar baxxa, għall-analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Dawn l-analiżjiet kwantitattivi tas-sustanza kimika tat-test għandhom jippermettu l-kalkolu tal-bilanċ tal-massa u espressjoni tar-riżultati abbażi tal-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu. B'mod ġenerali, il-kampjun ifixkel jew jeqred is-sistema tal-ilma/naqal. Għalhekk, ġeneralment mhuwiex possibbli li jintużaw l-istess repliki għall-kampjunar tan-naqal u d-dud. Għandhom jiġu stabbiliti reċipjenti 'analitiċi' ta' dimensjonijiet xierqa, li jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluż il-preżenza tal-organiżmi tat-test) iżda li ma jintużawx għal osservazzjonijiet bijoloġiċi. Id-dimensjonijiet tar-reċipjent għandhom jintgħażlu biex jipprovdu l-ammont ta' kampjuni meħtieġa mill-metodu analitiku. Dettalji tal-kampjunar huma deskritti fil-paragrafu 53.

TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

31. Jekk ma tkun disponibbli ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lumbriculus variegatus*, jaf ikun utli li jitwettaq esperiment preliminari sabiex tiġi ddeterminata l-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu ttestjati fit-test finali, u biex jittejbu l-kundizzjonijiet tat-test tat-test finali. Għal dan il-għan, tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet distanzjati tas-sustanza kimika tat-test. Id-dud jiġi espost għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għal perjodu (eż. 28 jum bħal fit-test finali) li jippermetti stima tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa; mhuma meħtieġa ebda repliki. L-imġiba tad-dud, pereżempju l-evitar tan-naqal, li jista' jiġi kkawżat mis-sustanza kimika tat-test u/jew in-naqal, għandha tiġi osservata u rreġistrata matul test preliminari. Il-konċentrazzjonijiet ogħla minn 1 000 mg/kg ta' piż xott tan-naqal ma għandhomx jiġu ttestjati fit-test preliminari.

Test finali

32. Fit-test finali, għandhom jintużaw u jintgħażlu tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet, eż. abbażi tar-riżultat tat-test preliminari tas-sejba tal-medda (paragrafu 31) u kif deskritt fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.

33. Isir kontroll (għar-replikazzjoni ara l-paragrafi 36, 37 u 38) li fih il-kostitwenti kollha, ħlief is-sustanza kimika tat-test, flimkien ma' serje ta' testijiet. Jekk jintuża xi aġent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, dan għandu jkollu effett sinifikanti fuq l-organiżmi tat-test kif żvelat minn kontroll addizzjonali b'solvent biss.

Disinn tat-test

34. Id-disinn tat-test huwa relatat mal-għażla tan-numru u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull konċentrazzjoni u n-numru ta' dud miżjud f'kull reċipjent. Id-disinji għall-istima tal-EC_x, għall-istima tal-NOEC, u għat-twettiq ta' test tal-limitazzjoni huma deskritti fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.

35. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu 'bracketed' bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-inqas konċentrazzjoni li taffettwa l-organiżmi tat-test jew iktar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha tiġi evitata. Jekk — f'każijiet eċċezzjonali — issir estrapolazzjoni bħal din, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa fir-rapport.

36. Jekk għandha tiġi stmata l-EC_x, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet u minimu ta' tliet repliki għal kull konċentrazzjoni; sitt repliki huma rakkomandati għall-kontroll jew — jekk jintuża — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà tal-kontroll. Xorta waħda huwa rakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet tat-test suffiċjenti biex ikun hemm stima tal-mudell tajba. Il-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun iktar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva konċentrazzjoni rispons għandha gradjent baxx). In-numru ta' repliki f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi fil-medda ta' 5 – 95 %. Iż-żieda fin-numru ta' repliki jew it-tnaqqis fid-daqs tal-intervalli tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom it-tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar għat-test.

37. Jekk għandhom jiġu stmati l-valuri LOEC/NOEC, għandhom jintużaw tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas erba' repliki (huma rakkomandati sitt repliki għall-kontroll jew — jekk jintuża — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà ta' kontroll), u l-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.

38. Jista' jitwettaq test tal-limitu (permezz ta' konċentrazzjoni tat-test waħda u l-kontrolli), jekk ma jkunu mistennija ebda effetti sa 1 000 mg/kg ta' piż xott tan-naqal (eż. minn test preliminari tas-sejba tal-medda), jew jekk l-ittestjar f'konċentrazzjoni waħda sejjer ikun adegwat biex jikkonferma valur ta' interess tal-NOEC. F'dan l-aħħar każ, għandu jiġi inkluż raġunament iddettaljat għall-għażla tal-konċentrazzjoni tal-limitu fir-rapport tat-test. Il-fini tat-test tal-limitu huwa li jitwettaq test f'konċentrazzjoni suffiċjentement għolja biex dawk li jieħdu d-deċiżjonijiet ikunu jistgħu jeskludu l-effetti tossiċi possibbli tas-sustanza kimika, u l-limitu huwa stabbilit f'konċentrazzjoni li mhijiex mistennija li tidher f'xi sitwazzjoni. Huwa rakkomandat 1 000 mg/kg (piż xott). Ġeneralment, tal-inqas huma meħtieġa sitt repliki kemm għat-trattament kif ukoll il-kontrolli. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Organiżmi tat-test

39. It-test jitwettaq b'tal-inqas 10 dud għal kull replikat użat għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi. Dan in-numru ta' dud jikkorrispondi għal madwar 50 — 100 mg ta' bijomassa mxarrba. Jekk wieħed jassumi kontenut xott ta' 17,1 % (48), dan jirriżulta f'madwar 9 — 17 mg ta' bijomassa xotta għal kull reċipjent. U.S. EPA (2000 (7)) trakkomanda li tintuża rata ta' tagħbija li ma taqbiżx 1: 50 (bijomassa xotta: TOC). Għan-naqal formulat deskritt fil-paragrafu 22, dan jikkorrispondi għal madwar 43 g ta' naqal (piż xott) għal kull 10 dud f'kontenut ta' TOC ta' 2,0 % ta' naqal xott. F'każijiet fejn jintużaw iktar minn 10 dud għal kull reċipjent, l-ammont ta' naqal u ilma tal-madwar għandu jiġi aġġustat kif xieraq.

40. Id-dud użat f'test għandu joriġina kollu mill-istess sors, u għandu jkun annimal fi stat psikoloġiku simili (ara l-Appendiċi 5). Għandu jintgħażel dud ta' daqs simili (ara l-paragrafu 39). Huwa rakkomandat li sottokampjun tal-lott jew l-istokk tad-dud jintiżen qabel it-test sabiex jiġi stmat il-piż medju.

41. Id-dud li għandu jintuża fit-test jitneħħa mill-kultura (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Annimali (adulti) kbar li ma juru ebda sinjali ta' frammentazzjoni riċenti jiġu ttrasferiti lejn dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Dawn jiġu sinkronizzati sussegwentement kif deskritt fl-Appendiċi 5. Wara riġenerazzjoni għal perjodu ta' 10 sa 14-il jum, għat-test għandu jintuża dud komplet intatt b'daqs simili, li jkun attivament qiegħed jgħum jew jitkaxkar wara stimulu mekkaniku bil-mod. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test huma differenti mill-kundizzjonijiet tal-kultura (eż. fit-temperatura, ir-reġim ta' dawl, u l-ilma tal-madwar), fażi ta' akklimazzjoni ta' eż. 24 siegħa f'temperatura, reġim tad-dawl, u permezz tal-istess ilma tal-madwar bħal fit-test għandha tkun suffiċjenti biex id-dud jiġi adattat għall-kundizzjonijiet tat-test. L-oligochaetes adattati għandhom jiġu allokati b'mod każwali għar-reċipjenti tat-test.

Tagħlif

42. Peress li l-ikel jiżdied man-naqal qabel (jew matul) l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, id-dud ma jerġax jingħalef matul it-test.

Dawl u temperatura

43. Il-fotoperjodu fil-kultura u t-test, ġeneralment huwa ta' 16-il siegħa (3), (7). L-intensità tad-dawl għandha tinżamm baxxa (eż. 100-500 lx) biex jiġu imitati kundizzjonijiet naturali f'wiċċ in-naqal, u titkejjel tal-inqas darba matul il-perjodu ta' espożizzjoni. It-temperatura għandha tkun ta' 20 °C ± 2 °C matul it-test kollu. F'data ta' kejl waħda partikolari, id-differenza tat-temperatura bejn ir-reċipjenti tat-test ma għandhiex tkun iktar minn ± 1 °C. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqiegħdu fl-inkubatur tal-ittestjar jew l-erja tal-ittestjar b'mod randomizzat, eż. sabiex titnaqqas l-imparzjalità tar-riproduzzjoni minħabba l-post tar-reċipjent.

Arjazzjoni

44. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jiġi arjat bil-mod (eż. 2 — 4 bużżieqa fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette li titqiegħed madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Wieħed għandu joqgħod attent li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu maħlul ma taqax taħt it-30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV). Il-provvista tal-arja għandha tiġi kkontrollata u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol.

Kejliet tal-kwalità tal-ilma

45. Il-parametri tal-kwalità tal-ilma li ġejjin għandhom jitkejlu fl-ilma tal-madwar:

Temperatura:	tal-inqas reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontrolli darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; jekk ikun possibbli, it-temperatura fil-midjum tal-madwar (l-arja tal-ambjent jew banjumarija) tista' tiġi rreġistrata eż. f'intervalli ta' siegħa;
Kontenut ta' ossiġenu dissolt:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontrolli darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espress bħala mg/l u % ASV (valur ta' saturazzjoni tal-arja);
Provvista tal-arja:	għandha tiġi kkontrollata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata;
pH:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontroll darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni;
Ebusija totali tal-ilma:	tal-inqas replikat wieħed tal-kontrolli u reċipjent tat-test wieħed bl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espressa bħala mg/l $CaCO_3$;
Kontenut totali ta' ammonijaka:	tal-inqas replikat wieħed tal-kontrolli u f'reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni, u sussegwentement 3 darbiet fil-ġimgħa; espress bħala mg/l NH_4^+ jew NH_3 jew ammonijaka-N totali.

Jekk il-kejl tal-parametri tal-ilma jeħtieġ it-tneħħija ta' kampjuni sinifikanti ta' ilma mir-reċipjenti, jaf ikun rakkomandabbli li jiġu stabbiliti reċipjenti separati għall-kejliet tal-kwalità tal-ilma sabiex ma jinbidilx il-proporzjon ta' volum ta' ilma/naqal.

Osservazzjonijiet bijoloġiċi

46. Matul l-espożizzjoni, ir-reċipjenti tat-test għandhom jiġu osservati sabiex tiġi vvalutata viżwalment kwalunkwe differenza fid-dud (eż. l-evitar tan-naqal, gerbub tal-ippurgar viżibbli fuq wiċċ in-naqal) meta mqabbel mal-kontrolli. L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati.

47. Fi tmiem it-test, kull replikat jiġi eżaminat (reċipjenti addizzjonali ddisinjati għall-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi jistgħu jiġu esklużi mill-eżaminazzjoni). Għandu jintuża metodu xieraq biex jiġi rkuprat id-dud kollu mir-reċipjent tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li d-dud kollu jiġi rkuprat mingħajr ma jweġġa'. Metodu possibbli partikolari huwa li d-dud jingħadda permezz ta' passatur min-naqal. Tista' tintuża xibka tal-azzar inossidabbli b'daqs xieraq tax-xibka. Il-parti l-kbira tal-ilma tal-madwar jitferra' b'attenzjoni, u n-naqal li jifdal u l-ilma jiġi aġitat biex jirriżulta f'sospensjoni magħquda, li jista' jingħadda mill-passatur. Permezz ta' xibka ta' 500 µm, il-parti l-kbira tal-frak tan-naqal sejjer jgħaddi mill-passatur malajr; madankollu, l-għarbil għandu jsir malajr, sabiex id-dud ma jkunx jista' jitkaxkar fix-xibka jew minn ġo fiha. Permezz ta' xibka ta' 250 µm, id-dud mhux sejjer ikun jista' jixkaxkar fix-xibka jew minn ġo fiha; madankollu, għandha tingħata attenzjoni biex kemm jista' jkun ftit frak tan-naqal jinżamm fuq ix-xibka. Is-sospensjoni magħquda li tingħadda minn passatur ta' kull reċipjent tar-replikat tista' tingħadda mill-passatur għal darb'oħra sabiex jiġi żgurat l-irkupru tad-dud kollu. Metodu alternattiv jista' jkun it-tisħin tan-naqal billi r-reċipjenti tat-test jitqiegħdu f'banjumarija f'50 — 60 °C; id-dud sejjer jitlaq min-naqal u jista' jinġabar minn wiċċ in-naqal permezz ta' pipetta b'fetħa wiesgħa illostrata bin-nar. Metodu alternattiv ieħor jista' jkun li tiġi prodotta sospensjoni magħquda tan-naqal u din titferra' f'dixx baxx ta' daqs xieraq. Mis-saff baxx ta' sospensjoni magħquda, id-dud jista' jinġabar permezz ta' labra tal-azzar jew pinzetta tal-arloġġiera (li għandha tintuża bħala furketta iktar milli pinzetti biex tiġi evitata ħsara fid-dud) u jiġu ttrasferiti lejn ilma nadif. Wara li d-dud jiġi sseparat mis-sospensjoni magħquda tan-naqal, dan jitlaħlaħ fil-midjum tat-test u jingħadd.

48. Indipendentement mill-metodu użat, il-laboratorji għandhom juru li l-persunal tagħhom jista' jirkupra medja ta' mill-inqas 90 % tal-organiżmi min-naqal kollu. Pereżempju, numru partikolari ta' organiżmi tat-test jista' jiżdied man-naqal ta' kontroll jew in-naqal tat-test, u l-ikupru jista' jiġi ddeterminat wara siegħa (7).

49. In-numru totali ta' individwi ħajjin u mejtin għal kull replikat għandu jiġi rreġistrat u vvalutat. Il-gruppi li ġejjin ta' dud huma kkunsidrati mejtin:

a) ma jkun hemm ebda reazzjoni wara stimulu mekkaniku bil-mod

b) ikun hemm sinjali ta' dekompożizzjoni (flimkien ma' 'a')

c) għadd ta' dud nieqes

Barra minn hekk, id-dud ħaj jista' jiġi assenjat għal wieħed minn tliet gruppi:

a) dud sħiħ kbir (adult) mingħajr partijiet tal-ġisem riġenerati

b) dud sħiħ b'partijiet tal-ġisem riġenerati, b'kulur iktar ċar (jiġifieri, b'parti ta' wara ġdida, b'parti ta' quddiem ġdida, jew biż-żewġ partijiet ġodda)

c) dud mhux sħiħ (jiġifieri, dud frammentat reċentement b'partijiet tal-ġisem mhux riġenerati)

Dawn l-osservazzjonijiet addizzjonali mhumiex obbligatorji, iżda jistgħu jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati bijoloġiċi (pereżempju, numru ikbar ta' dud assenjat lill-grupp ċ jista' jindika dewmien fir-riproduzzjoni jew ir-riġenerazzjoni fi trattament partikolari). Barra minn hekk, jekk tiġi osservata kwalunkwe differenza fid-dehra (eż. feriti tal-qoxra, partijiet tal-ġisem edematużi) bejn id-dud ittrattat u dak tal-kontroll, dawn għandhom jiġu rreġistrati.

50. Eżattament wara l-għadd/valutazzjoni, id-dud ħaj misjub f'kull replikat jiġi ttrasferit f'dixxijiet ta' użin mnixxfa, imwieżna minn qabel u ttikkettati (wieħed għal kull replikat), u maqtula permezz ta' qatra ta' etanol għal kull dixx ta' użin. Id-dixxijiet ta' użin jitqiegħdu f'forn tat-tnixxif f'temperatura ta' 100 ± 5 °C biex jinxfu matul il-lejl, li jintiżnu wara li jitberrdu f'dessikatur, (preferibbilment fi grammi, tal-inqas b'4 numri wara l-punt deċimali).

51. Minbarra l-piż xott totali, il-piż xott mingħajr irmied jista' jiġi ddeterminat kif deskritt f'(49) sabiex jitqiesu l-komponenti inorganiċi li joriġinaw minn naqal inġestit misjuba fil-passaġġ alimentari tad-dud.

52. Il-bijomassa hija ddeterminata bħala l-bijomassa totali għal kull replikat li jinkludi dud adult u ta' età żgħira. Id-dud mejjet ma għandux jitqies għad-determinazzjoni tal-bijomassa għal kull replikat.

Verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

Kampjunar

53. Għandhom jittieħdu tal-inqas kampjuni għall-analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test tal-ogħla konċentrazzjoni u waħda iktar baxxa, tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' ekwilibrazzjoni (qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test), u tal-inqas fi tmiem it-test. Tal-inqas in-naqal aggregat u l-ilma tal-madwar għandhom jiġu kkampjunati għall-analiżi. Għandhom jittieħdu tal-inqas żewġ kampjuni għal kull matriċi u trattament f'kull data tal-kampjunar. Wieħed mill-kampjuni tad-duplikati jista' jinħażen bħala riżerva (li għandha tiġi analizzata eż. f'każ li l-analiżi inizjali ma taqax fil-medda ± 20 % mill-konċentrazzjoni nominali). F'każ ta' proprjetajiet kimiċi speċifiċi, eż. jekk tkun mistennija degradazzjoni rapida tas-sustanza kimika tat-test, l-iskeda analitika tista' tiġi rfinata (eż. kampjunar iktar frekwenti, analiżi ta' iktar livelli ta' konċentrazzjoni) abbażi ta' ġudizzju espert. Imbagħad jistgħu jittieħdu kampjuni f'dati ta' kampjunar intermedji (eż. fis-seba' jum wara l-bidu tal-espożizzjoni).

54. L-ilma sovrastanti għandu jiġi kkampjunat b'dekantazzjoni jew billi l-ilma tal-madwar jingħadda b'attenzjoni f'sifun biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Il-volum tal-kampjuni għandu jiġi rreġistrat.

55. Wara li l-ilma sovrastanti jkun tneħħa, in-naqal għandu jiġi omoġenizzat u ttrasferit lejn kontenitur xieraq. Il-piż tal-kampjun tan-naqal imxarrab jiġi rreġistrat.

56. Jekk tkun meħtieġa wkoll analiżi tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma interstizjali, il-kampjuni tan-naqal omoġenizzati u ppeżati għandhom jiġu ċentrifugati biex jinkiseb l-ilma interstizjali. Pereżempju, madwar 200 ml min-naqal imxarrab jista' jimtela f'bekkijiet taċ-ċentrifugazzjoni ta' 250 ml. Minn hemm 'il quddiem, il-kampjuni għandhom jiġu ċċentrifugati mingħajr filtrazzjoni biex jiġi iżolat l-ilma interstizjali, eż. f'10 000 ± 600 × *g* għal 30 — 60 min f'temperatura li ma taqbiżx it-temperatura użata fit-test. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, is-supernatant jitferra' jew jisseffed, filwaqt li tingħata attenzjoni biex ma jiġi introdott ebda frak tan-naqal, u l-volum jiġi rreġistrat. Il-piż tal-gerbub tan-naqal li jifdal jiġi rreġistrat. Dan jista' jiffaċilita l-istima tal-bilanċ tal-massa jew l-irkupru ta-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma/naqal, jekk il-piż xott tan-naqal jiġi ddeterminat f'kull data ta' kampjunar. F'xi każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet fl-ilma interstizjali peress li l-kampjun tad-daqs ikun zgħir wisq.

57. Jekk ma ssirx analiżi minnufih, il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu b'metodu xieraq, eż. fil-kundizzjonijiet ta' ħżin rakkomandati għal degradazzjoni minima tas-sustanza kimika tat-test partikolari (eż. kampjuni ambjentali ġeneralment jinħażnu f'– 18 °C fid-dlam). Ikseb informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet ta' ħżin xierqa għas-sustanza kimika tat-test partikolari — pereżempju d-durata u t-temperatura tal-ħżin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ. — qabel ma tibda l-istudju.

Metodu analitiku

58. Peress li l-proċedura sħiħa hija essenzjalment irregolata mill-eżattezza, il-preċiżjoni u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza kimika tat-test, iċċekkja b'mod sperimentali li l-preċiżjoni u r-riproduċibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test minn kampjuni tal-ilma u tan-naqal huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari tal-inqas fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Barra minn hekk, iċċekkja li s-sustanza kimika tal-ittesjtar mhijiex identifikabbli fil-kompartimenti ta' kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla mil-limitu ta' kwantifikazzjoni. Jekk ikun meħtieġ, ikkoreġi l-konċentrazzjonijiet nominali għall-irkupri taż-żidiet ta' kontroll tal-kwalità (eż. fejn l-irkupru ma jaqax taħt 80 — 120 % tal-ammont miżjud). Immaniġġja l-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li titnaqqas il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test fl-apparat tal-kampjunar).

59. Għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, u l-limitu ta' detezzjoni fin-naqal u l-ilma.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

60. Il-varjabbli ta' rispons obbligatorji ewlenin tat-test li għandhom jiġu evalwati statistikament huma l-bijomassa u n-numru totali ta' dud għal kull replikat. B'mod fakultattiv, jistgħu jiġu evalwati wkoll ir-riproduzzjoni (bħala żieda fin-numru ta' dud) u t-tkabbir (bħala żieda fil-bijomassa xotta). F'dan il-każ, għandha tinkiseb stima tal-piż xott tad-dud fil-bidu tal-espożizzjoni eż. bil-kejl tal-piż xott ta' sottokampjun rappreżentattiv tal-lott tad-dud sinkronizzat li għandu jintuża għat-test.

61. Għalkemm il-mortalità mhijiex punt ta' tmiem ta' dan it-test, il-mortalitajiet għandhom jiġu evalwati kemm jista' jkun. Sabiex jiġu stmati l-mortalitajiet, in-numru ta' dud li ma jkollhomx reazzjoni għal stimulu mekkaniku bil-mod jew urew sinjali ta' dekompożizzjoni, u d-dud nieqes għandhom jiġu kkunsidrati mejta. Il-mortalijiet għandhom tal-inqas jiġu rreġistrati u kkunsidrati meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

62. Il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu espressi bħala mg/kg ta' piż xott tan-naqal. Jekk l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test imkejla fin-naqal, jew fin-naqal u l-ilma tal-madwar fil-bidu tal-espożizzjoni, huwa bejn 80 % u 120 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x, NOEC, LOEC) jistgħu jiġu espressi abbażi ta' konċentrazzjonijiet nominali. Jekk l-irkupru jiddevja mill-konċentrazzjonijiet nominali b'iktar minn ± 20 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x, NOEC, LOEC) għandhom ikunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu tal-espożizzjoni, eż. billi jitqies il-bilanċ tal-massa tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tat-test (ara l-paragrafu 30). F'dawn il-każijiet, tista' tinkiseb informazzjoni addizzjonali mill-analiżi tas-soluzzjonijiet ewlenin u/jew tal-applikazzjoni sabiex jiġi kkonfermat li n-naqal tat-test kien ippreparat sew.

EC_x

63. Valuri EC_xg għall-parametri deskritti fil-paragrafu 60 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). F'(15) u (50) tingħata gwida dwar l-evalwazzjoni statistika. EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament ($\overline{X}$) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

64. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tiddetermina l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa. B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġett tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'p ≤ 0,05. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin. F'(15) u (50) tingħata gwida dwar is-selezzjoni ta' metodi statistiċi xierqa.

65. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-test tal-Proporzjon ta' devjazzjoni tal-medda mill-istandard (test R/s) jew it-test Shapiro-Wilk (b'żewġ naħat, p ≤ 0,05). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'żewġ naħat, (p ≤ 0,05). Jekk il-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriċi (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettaq Analiżi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni f'koppji (eż. test-t ta' Dunnett) jew testijiet tat-tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti (p ≤ 0,05) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-punti tat-test. Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. it-test-U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġu ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

66. Jekk isir test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u kura waħda biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriku (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi (numru totali ta' dud, u l-bijomassa bħala piż xott tad-dud) jistgħu jiġu evalwati mit-Test tal-istudenti (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati. Fl-Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu.

67. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Interpretazzjoni tar-riżultati

68. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, jekk kien hemm devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar, u fejn jistgħu jseħħu konċentrazzjonijiet imkejla tal-konċentrazzjonijiet tat-test f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi nnotata.

Rapport tat-test

69. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test:*

— dejta tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (isem komuni, isem kimiku, formula strutturali, numru CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test; sors tas-sustanza kimika tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat.

— kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi kif miksub qabel il-bidu tat-test, (eż. is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal, jekk ikun disponibbli), il-log K_{ow}, l-istabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— *Speċijiet tat-test:*

— ismijiet xjentifiċi, sors, kwalunkwe trattament minn qabel, akklimazzjoni, kundizzjonijiet tal-kulturi, eċċ.

— *Kundizzjonijiet tat-test:*

— proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);

— id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kontenituri tat-test, il-volum ta' ilma għal kull reċipjent, il-massa tan-naqal u l-volum għal kull reċipjent, (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiċi: ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum tal-ilma), kwalunkwe arjazzjoni użata qabel u matul it-test, in-numru ta' repliki, in-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-kundizzjonament, l-ekwilibriju u l-perjodi ta' espożizzjoni, il-frekwenza ta' kampjunar);

— fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar;

— metodu tat-trattament minn qabel bis-sustanza kimika tat-test u żieda/applikazzjoni;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, id-dettalji dwar il-kampjunar għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi, u l-metodi analitiċi li permezz tagħhom inkisbu l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test;

— il-karatteristiċi tan-naqal kif deskritt fil-paragrafi 24 — 25, u kwalunkwe kejl ieħor li jittieħed; it-tħejjija tan-naqal formulat;

— it-tħejjija tal-ilma tal-ittestjar (jekk jintuża ilma rikostitwit) u l-karatteristiċi (l-ossiġenu, il-konċentrazzjoni, il-pH, il-konduttività, l-ebusija, u kwalunkwe kejl ieħor li jittieħed) qabel il-bidu tat-test;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-tagħlif inkluż it-tip ta' ikel, it-tħejjija, l-ammont u r-reġim ta' tagħlif;

— intensità tad-dawl u fotoperjodu/fotoperjodi;

— metodi użati għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi kollha (eż. kampjunar, spezzjoni, ippeżar tal-organiżmi tat-test) u l-parametri abijotiċi kollha (eż. parametri tal-kwalità tal-ilma u n-naqal);

— volumi u/jew piżijiet tal-kampjuni kollha għall-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni kollha għall-analiżi tas-sustanza kimika, inkluż dettalji dwar il-preparazzjoni, il-ħżin, il-proċeduri ta' żieda, l-estrazzjoni, u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanza kimika tat-test, u l-irkupri tas-sustanza kimika tat-test.

— *Riżultati:*

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test (il-pH, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlula, l-ebusija, il-konċentrazzjonijiet tal-ammonijaka, u kwalunkwe kejl ieħor li ttieħed);

— kontenut ta' karbunju organiku totali (TOC), il-proporzjon ta' piż xott ma' piż imxarrab, il-pH tan-naqal, u kwalunkwe kejl ieħor li ttieħed;

— in-numru totali, u jekk ikun iddeterminat, numru ta' dud sħiħ u mhux sħiħ f'kull kompartiment tal-ittestjar fi tmiem l-ittestjar;

— il-piż xott tad-dud ta' kull kompartiment tat-test fi tmien it-test, u jekk jitkejjel, il-piż xott ta' sottokampjun tad-dud fil-bidu tat-test;

— kwalunkwe imġiba anormali osservata bi tqabbil mal-kontrolli (eż. evitar tan-naqal, il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar);

— kwalunkwe mortalità osservata;

— stimi tal-punti ta' tmiem tossiċi (eż. EC_x, NOEC u/jew LOEC), u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-konċentazzjonijiet tat-test imkejla u r-riżultati tal-analiżijiet kollha biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test;

— kwalunkwe devjazzjoni mill-kriterji ta' validità.

— *Evalwazzjoni tar-riżultati:*

— konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 13;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) KE (2003). Dokument ta' Gwida Teknika b'appoġġ għad-Direttiva tal-Kummissjoni 93/67/KEE dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi ġodda nnotifikati, ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi eżistenti u d-Direttiva 98/8/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar it-tqegħid fis-suq tal-prodotti bijoċidali; Parti I — IV. L-Uffiċċju għall-Pubblikazzjonijiet Uffiċjali tal-KE (Kummissjoni Ewropea), il-Lussemburgu.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, 'Test tat-tossiċità bil-kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud'.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on 'Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes', 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Letteratura addizzjonali dwar il-proċeduri statistiċi:

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

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

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita.

Il-**perjodu ta' kundizzjonament** jintuża biex jistabbilizza l-komponent mikrobjali tan-naqal u biex eż. titneħħa l-ammonja li toriġina mill-komponenti tan-naqal; dan iseħħ qabel iż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal. Ġeneralment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-**EC_x** hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fin-naqal li tirriżulta f'effett ta' X % (eż. 50 %) fuq il-parametru bijoloġiku fi żmien perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat.

Il-**perjodu ta' ekwilibrazzjoni** jintuża biex jippermetti d-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-fażi solida, l-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar; dan iseħħ wara ż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal u qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test.

Il-**fażi ta' espożizzjoni** huwa ż-żmien li matulu l-organiżmi tat-test jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test.

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintentiku, huwa taħlita ta' materjali użati biex jiġu imitati l-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-**Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC)** hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test fejn is-sustanza kimika hija osservata għal effett tossiku sinifikanti (b'p < 0,05) meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Jekk dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlu l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-**Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC)** hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC li, meta mqabbla mal-kontroll, ma għandha ebda effett statistiku ($p \leq 0,05$), fil-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma** (K_{ow}; xi drabi espress ukoll bħala P_{ow}) huwa l-proporzjon ta' solubbiltà ta' sustanza kimika f'ottanol-n u fl-ilma f'ekwilibriju u jirrappreżenta l-lipofiliċità ta' sustanza kimika (Kapitolu A.24 ta' dan l-Anness). Il-K_{ow} jew il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni organika karbonju-ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' kimika fi/fuq il-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-kimika fl-ilma f'ekwilibriju.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jkopri n-naqal fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali huwa l-ilma li jokkupa spazju bejn in-naqal jew il-frak tal-ħamrija.

Naqal miżjud huwa naqal li miegħu żdiedet sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Kompożizzjoni tal-ilma rikostitwit rakkomandat

(adottat mill-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (1))

(a) *Soluzzjoni ta' klorur tal-kalċju*

Ħoll 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(b) *Soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju*

Ħoll 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(c) *Soluzzjoni tal-idroġenu karbonat tas-sodju*

Ħoll 2,59 g $NaHCO_3$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(d) *Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju*

Ħoll 0,23 g KCl f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż 10 μScm^{-1}.

jitħalltu 25 ml kull wieħed ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jiżdied sa 1 l b'ilma dejonizzat. It-totali tal-joni tal-kalċju u l-manjeżju f'dawn is-soluzzjonijiet hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $K_{S4.3}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlaħaq is-saturazzjoni tal-ossiġenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

REFERENZA

(1) Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Test tat-Tossiċità Akuta fil-Ħut.

Appendiċi 3

Karatteristiċi fiżiko-kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 μg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 μg/l
Klorin residwu	< 10 μg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l
(adottata minn OECD (1992) (1))	

REFERENZA

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

Appendiċi 4

Naqal artifiċjali rakkomandat — gwida dwar il-preparazzjoni u l-ħżin

Kostitwenti tan-naqal

Kostitwent	Karatteristiċi	% tan-naqal piż xott
Pit	*Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni: 'midjum', imnixxef bl-arja, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, mitħun irqiq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm)*	5 ± 0,5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 μm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	*Kontenut ta' kawlinite ≥ 30 %*	20 ± 1
Sors ta' ikel	*eż. Trab tal-Urtica (Folia urticae), weraq ta' Urtica dioica (ħurrieq), mitħuna rqaq (daqs tal-frak ≤ 0,5 mm); skont l-istandards tal-farmaċija, għall-konsum mill-bniedem; flimkien man-naqal xott*	0,4 — 0,5 %
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 ± 0,5
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, polverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Konduttività ≤ 10 μS/cm, flimkien man-naqal xott	30 — 50

Nota: Jekk ikunu mistennija konċentrazzjonijiet ta' ammonijaka għoljin, eż. jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jaf ikun utli li tissostitwixxi 50 % tat-trab tal-urtica b'ħafna nitroġenu b'ċelluloża (eż. trab ta' Celluloża-a, kimikament pur, daqs tal-frak ≤ 0,5 mm; (1) (2)).

Preparazzjoni

Il-pit jitnixxef bl-arja u mitħun għal trab irqiq. Tiġi ppreparata sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omoġenizzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni hija kundizzjonata għal tal-inqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex jiġi stabbilizzat komponent mikrobjali stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Imbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat ma' kosistwenti oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omoġenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Jittieħdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonja, in-naqal formulat jaf ikun kundizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal/ilma 1:4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel ma tiżdied is-sustanza kimika

tat-test, jiġifieri għandu jiżdied bl-ilma, li għandu jiġi arjat. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Minn hemm 'il quddiem, ir-ramel kwarzuż miżjud jitħallat man-naqal għal kull livell ta' trattament, in-naqal jiġi distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u miżjud mal-ilma tat-test. Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jiġi arjat.

Is-sors ta' ikel magħżul għandu jiżdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Dan jista' inizjalment jitħallat mas-sospensjoni tal-pit (ara hawn fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel iż-żieda tal-organiżmi tal-ittestjar — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibriju twil, tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn iż-żieda tal-ikel u l-bidu ta' espożizzjoni jinżamm kemm jista' jkun qasir. Sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ikel, is-sors tal-ikel għandu jitħallat bin-naqal mhux iktar tard mill-jum meta s-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal.

Ħżin

Il-kostitwenti xotti tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u frisk jew f'temperatura tal-kamra. In-naqal ippreparat miżjud bis-sustanza kimika tat-test għandu jintuża fit-test immedjatament. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet rakkomandanti għas-sustanzi kimiċi tat-test partikolari sal-analiżi.

REFERENZI

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Appendiċi 5

Metodi ta' kulturi għal lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbrikulidi, Oligoċaeta huwa abitant tan-naqal tal-ilma ħelu u jintuża ħafna fl-ittestjar ekotossikoloġiku. Jista' jiġi kkulturat faċilment f'kundizzjonijiet tal-laboratorju. F'dan li ġej tingħata deskrizzjoni tal-metodi ta' kulturi.

Metodi ta' kulturi

Il-kundizzjonijiet ta' kulturi għal *Lumbriculus variegatus* huma deskritti fid-dettall f'Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Hawn taħt jingħata sommarju fil-qosor ta' dawn il-kundizzjonijiet. Vantaġġ ewlieni ta' *L. variegatus* huwa r-riproduzzjoni rapida tiegħu, li tirriżulta f'bijomassa li tiżdied malajr f'popolazzjonijiet ikkulturati fil-laboratorju (eż. (1), (3), (4), (5)).

Id-dud jista' jiġi kkulturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) f'23 °C b'fotoperjodu ta' 16 L:8 D (100 — 1 000 lx) permezz ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-sottostrat huwa ppreparat billi jitqatgħu srievet tal-karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jitħalltu mal-ilma tal-kulturi għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħar tas-sottostrat tal-karta. Dan is-sottostrat imbagħad jista' jintuża direttament fl-akkwarji tal-kultura*Lumbriculus* billi titgħatta ż-żona ta' qiegħ it-tank, jew jinħażen iffriżat f'ilma dejonizzat biex jintuża iktar tard. Sottostrat ġdid fit-tank sejjer ġeneralment idum għal madwar xahrejn.

Kull kultura tad-dud, tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tingħalef sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ta' ikel tal-bidu tat-trota 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kulturi statiċi jew semi statiċi għandhom jirċievu rati ta' tagħlif iktar baxxi biex jiġi evitat tkabbir batterjali u fungali.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-kultura, is-soltu jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Inkella *Lumbriculus variegatus* jista' jiġi kkulturat f'sistema li tikkonsisti minn saff ta' ramel kwarzuż kif użat għan-naqal artifiċjali (fond ta' 1 — 2 cm), u ilma rikostitwit. Kontenituri tal-ħġieġ jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-kulturi. Il-korp tal-ilma għandu jkun arjat bil-mod (eż. 2 bżieżaq fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette pożizzjonata madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal. Biex tiġi evitata akkumulazzjoni eż. tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jiġi skambjat permezz ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba f'ġimgħa, manwalment. L-oligoċaeti jistgħu jinżammu f'temperatura tal-kamra b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' 100 — 1 000 lx) u 8 sigħat dlam. Fil-kultura semistatika (tiġdid tal-ilma darba f'ġimgħa), id-dud jintgħalef b'TetraMin darbtejn f'ġimgħa (eż. 0,6 — 0,8 mg għal kull cm^2 ta' wiċċ tan-naqal), li jista' jiġi applikat bħala sospensjoni ta' 50 mg TetraMin għal kull ml ta' ilma dejonizzat.

Lumbriculus variegatus jista' jitneħħa mill-kulturi eż. bit-trasferiment tas-sottostrat b'xibka irqiqa, jew organiżmi permezz ta' pipetta tal-ħġieġ bi ftuħ wiesgħa (dijametru ta' madwar 5 mm) illustrata bin-nar, lejn bekk separat. Jekk sottostrat jiġi ttrasferit lejn dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-sottostrat jitħalla għal matul il-lejl f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, li sejrin ineħħu s-sottostrat mill-bekk, filwaqt li d-dud jibqa' f'qiegħ ir-reċipjent. Dawn jistgħu jiġu introdotti f'tankijiet ta' kulturi li għadhom kif jiġu ppreparati, jew ipproċessati iktar kif deskritt f'(3) u (4), jew f'dan li ġej.

Kwistjoni li għandha titqies kritika meta jintuża *L. variegatus* f'testijiet tan-naqal huwa l-mod ta' riproduzzjoni tiegħu (arkitomija jew morfallassi, eż. (6)). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm ma tiġi ġġenerata l-parti ta' quddiem jew ta' wara (eż. (7), (8)). Dan ifisser li l-espożizzjoni ta' *L. variegatus* permezz ta' inġestjoni ta' naqal ikkontaminat ma sseħħx kontinwament.

Għalhekk, għandha titwettaq sinkronizzazzjoni biex jitnaqqsu r-riproduzzjoni u r-riġenerazzjoni mhux ikkontrollati, u l-varjazzjoni għolja sussegwenti fir-riżultati tat-test. Tali varjazzjoni tista' sseħħ meta xi individwi, li fframmentaw u għalhekk ma jieklux għal ċertu perjodu ta' żmien, ikunu inqas esposti għas-sustanza kimika tat-test minn individwi oħra, li ma jifframmentawx matul it-test (9), (10), (11). 10 sa 14-il jum qabel il-bidu tal-espożizzjoni, id-dud għandu jiġi fframmentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni). Id-dud (adult) kbir, li preferibbilment ma juri ebda sinjal ta' morfallassi riċenti għandu jintgħażel gias-sinkronizzazzjoni. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slajd tal-ħġieġ f'taqtira ta' ilma tal-kultura, u mifrud fil-parti tal-ġisem medjana bi skalpell. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkunu ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jitħallew jirriġeneraw irjus ġodda f'reċipjent tal-kultura li fih

l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-riġenerazzjoni ta' rjus ġodda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus riġenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Minn hemm 'il quddiem, l-organiżmi tat-test huma mistennija li jkunu fi stat fiżjoloġiku simili. Dan ifisser, li meta r-riproduzzjoni b'morfallassi sseħħ f'dud sinkronizzat matul it-test, virtwalment l-annimali kollha huma mistennija li jkunu esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tagħlif tad-dud sinkronizzat għandu jsir malajr kemm jista' jkun wara li d-dud jibda jħaffer fis-sottostrat, jew 7 ijiem wara d-dissezzjoni. Ir-reġim ta' tagħlif għandu jkun komparabbli mal-kulturi regolari, iżda huwa rakkomandabbli li d-dud sinkronizzat jintgħalef bl-istess sors ta' ikel li għandu jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm fit-temperatura tal-ittestjar f'20 ± 2 °C. Wara r-riġenerazzjoni, id-dud sħiħ intatt, li jkun qiegħed jgħum jew jitkaxkar permezz ta' stimulu mekkaniku bil-mod, għandu jintuża għall-ittestjar. Għanda tiġi evitata ħsara jew awtotomija fid-dud, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illustrati bin-nar, jew apparat dentali ta' qbid tal-azzar inossidabbli għall-immaniġġar ta' dan id-dud.

Sorsi ta' kulturi li jibdew l-fermentazzjoni għal Lumbriculus variegatus (indirizzi fil-forma adottata mill-Istati Uniti (4))

Ewropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Il-Finlandja

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Stati Uniti tal-Amerika

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

REFERENZI

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

Appendiċi 6

Sommarju tar-riżultati tar-ringtest

'Test tat-Tossiċità tan-Naqal b'*Lumbriculus variegatus*'

Tabella 1

Riżultati tar-ring test runs individwali: Numru medju ta' dud fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

	numru medju ta' dud fil-kontrolli	SD	CV (%)	n	numru medju ta' dud fil-kontrolli tas-solvent	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
medja interlaboratorja	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
mass	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

Tabella 2

Riżultati tar-ring test runs individwali: Medja tal-piż xott tad-dud għal kull replikat fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeff. ta' varjazzjoni.

	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli)	SD	CV (%)	n	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli tas-solvent)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
medja interlaboratorja	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
mass	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

Tabella 3

Tossiċità tal-PCP: Sommarju tal-punti ta' tmiem fir-ring test; medji laboratorji għal EC50, NOEC u LOEC; SD = devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

parametru bijoloġiku		Medja interlaboratorja (mg/kg)	min	mass	Fattur interlaboratorju	SD	CV (%)	medja ġeometrika (mg/kg)
numru totali ta' dud:	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
piż xott totali tad-dud	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
mortalità/sopravivenza	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
riproduzzjoni (żieda fin-numru ta' dud għal kull replikat)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
tkabbir (żieda fil-bijomassa għal kull replikat)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: differenza minima traċċabbli mill-valuri tal-kontroll matul l-ittestjar tal-ipoteżi; użata bħala kejl tas-setgħa statistika

REFERENZA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

C.36 **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAD-DUD PREDATORJU (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) FIL-ĦAMRIJA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 226 tal-OECD (2008). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-ħamrija fuq il-produzzjoni riproduttiva tad-dudu predatorju tal-ħamrija *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), u għalhekk jippermetti l-istima tal-inibizzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika tal-popolazzjoni (1,2). Il-produzzjoni riproduttiva tfisser in-numru ta' frieħ fi tmiem il-perjodu tal-ittestjar. *H. aculeifer* jirrappreżenta livell trofiku addizzjonali għall-ispeċi li diġà jkunu disponibbli għaliha metodi ta' ttestjar. Test tar-riproduzzjoni mingħajr diskriminazzjoni u kwantifikazzjoni tal-istadji differenti taċ-ċiklu riproduttiv huwa kkunsidrat adegwat għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Għal sustanzi kimiċi b'xenarju ta' espożizzjoni ieħor milli l-ħamrija, l-approċċi tal-ħamrija l-oħra jaf ikunu xierqa (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* huwa kkunsidrat rappreżentant rilevanti tal-fawna tal-ħamrija u d-dud predatorju b'mod partikolari. Huwa mxerred madwar id-dinja (5) u jista' jinġabar u jitrabba faċilment fil-laboratorju. Sommarju tal-bijoloġija ta' *H. aculeifer* huwa pprovdut fl-Appendiċi 7. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-ispeċi ta' dud u l-użu f'ittestjar ekotossikoloġiku (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. In-nisa adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta ma' ħamrija. It-test jinbeda b'10 nisa adulti għal kull reċipjent ta' replikat. L-irġiel ma jiġux introdotti fit-test, peress li l-esperjenza wriet li n-nisa jitgħammru immedjatament jew ftit wara li jfaqqsu mill-istadju ta' dewtonimfa, jekk ikun hemm l-irġiel. Barra minn hekk, l-inklużjoni tal-irġiel, ittawwal it-test b'tali mod li tkun meħtieġa diskriminazzjoni impenjattiva tal-istadji ta' etajiet. Għalhekk, it-tgħammir innifsu mhuwiex parti mit-test. In-nisa jiġu introdotti fit-test 28-35 jum wara l-bidu tal-perjodu ta' bidien fis-sinkronizzazzjoni (ara l-Appendiċi 4), peress in-nisa mbagħad jistgħu jiġu kkunsidrati bħala diġà mgħammrin u li għaddew mill-istadju ta' qabel l-ovipożizzjoni. F'20 °C it-test jintemm fl-14-il jum wara l-introduzzjoni tan-nisa (jum 0), li jippermetti l-ewwel wild ta' kontroll jilħaq l-istadju ta' dewtonimfa (ara l-Appendiċi 4). Għall-varjabbli ewlieni mkejjel, jiġi ddeterminat in-numru ta' frieħ għal kull reċipjent tat-test flimkien man-numru ta' nisa li jibqgħu ħajjin. Il-produzzjoni riproduttiva tad-dud espost għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontrolli sabiex tiġi ddeterminata l-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}) jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet), skont id-disinn sperimentali (ara l-paragrafu 29). Ħarsa ġenerali tal-iskeda tal-ittestjar tingħata fl-Appendiċi 8.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa s-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma ħamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, bħar-rati ta' degradazzjoni bijotika u abjotika.

5. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer ikun differenti skont dan. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

VALIDITÀ TAT-TEST

6. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli mhux ittrattati għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

— Il-medja ta' mortalità tan-nisa adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test;

— In-numru medju ta' frieħ għal kull replikat (b'10 nisa adulti introdotti) għandu jkun tal-inqas 50 fi tmiem it-test;

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta'dud frieħ għal kull replikat ma għandux ikun ogħla minn 30 % fi tmiem it-test finali.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. L-ECx u/jew l-NOEC ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test fil-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test ma nbidilx maż-żmien. Dimethoate (CAS 60-51-5) huwa sustanza kimika ta' referenza xierqa li uriet li taffettwa d-daqs tal-popolazzjoni (4). L-aċidu boriku (CAS 10043-35-3) jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza alternattiva. Inkisbet inqas esperjenza b'din is-sustanza kimika. Huma possibbli żewġ opzjonijiet ta' disinn:

— Is-sustanza kimika ta' referenza tista' tiġi ttestjata b'mod parallel għad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' kull sustanza kimika tat-test f'konċentrazzjoni partikolari, li għandha tintwera qabel fi studju ta' rispons għad-doża biex tirriżulta f'effett ta' tnaqqis ta' > 50 % ta' wlied. F'dan il-każ, in-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak tal-kontrolli (ara l-paragrafu 29).

— Inkella, is-sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata bejn darba u darbtejn fis-sena f'test ta' rispons għad-doża. Skont id-disinn magħżul, in-numru ta' konċentrazzjonijiet u repliki u l-fattur ta' spazjar ivarjaw (ara l-paragrafu 29), iżda għandu jintlaħaq rispons ta' effett ta' 10 — 90 % (fattur ta' spazjar ta' 1,8). L-EC_{50} għal dimetoat abbażi tan-numru ta' frieħ għandha taqa' fil-medda bejn 3,0 u 7,0 mg a.s./kg ta' ħamrija (piż xott). Abbażi tar-riżultati miksuba bl-aċidu boriku s'issa, l-EC50 ibbażata fuq in-numru ta' frieħ għandha taqa' fil-medda bejn 100 u 500 mg/kg ta' piż xott ta' ħamrija.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Reċipjenti tat-test u tagħmir

8. Għandhom jintużaw reċipjenti tat-test b'dijametru ta' 3 — 5 cm (għoli ta' ħamrija ta' ≥ 1,5 cm), magħmula bil-ħġieġ jew materjal kimikament inerti ieħor u li għandhom għatu li jingħalaq sew. L-għotjien bil-kamin huma ppreferuti u f'dak il-każ, ir-reċipjenti jistgħu jiġu arjati darbtejn f'ġimgħa. Inkella, jistgħu jintużaw għotjien li jippermettu skambju gassuż dirett bejn is-sottostrat u l-atmosfera (eż. garża). Peress li l-kontenut ta' umdità għandu jinżamm għoli biżżejjed matul it-test, huwa essenzjali li jiġi kkontrollat il-piż ta' kull reċipjent sperimentali matul it-test u li jerġa' jimtela bl-ilma jekk meħtieġ. Dan jista' jkun speċjalment importanti jekk ma jkunu disponibbli ebda għotjien bil-kamin. Jekk jintuża reċipjent tat-test mhux trasparenti, l-għatu għandu jkun magħmul minn materjal li jippermetti l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jevita li d-dud jaħrab. Id-daqs u t-tip tar-reċipjent tat-test jiddependi fuq il-metodu tal-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Jekk tiġi applikata estrazzjoni bis-sħana lir-reċipjent tat-test, allura tista' tiżdied xibka tal-qiegħ b'daqs ta' xibka xieraq (issiġillata sal-estrazzjoni), u l-fond tal-ħamrija għandu jkun suffiċjenti biex jippermetti gradjent tat-temperatura u l-umdità.

9. Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

— preferibbilment reċipjenti tal-ħġieġ b'għotjien bil-kamin;

— kabinett tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— xkupilji għat-trasferiment tad-dud

— miter tal-pH u luxmetru;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mgħottija bl-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira b'kontroll tat-temperatura;

— tagħmir għall-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5) (13)

— pannell tad-dawl fil-għoli b'kontroll tad-dawl

— vażetti tal-ġbir għad-dud estratt.

Preparazzjoni tal-ħamrija artifiċjali

10. Għal dan it-test, tintuża ħamrija artifiċjali. Il-ħamrija artifiċjali tikkonsisti mill-komponenti li ġejjin (il-valuri kollha huma bbażati fuq il-massa xotta):

— 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mitħun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' $CaCO_3$ (ara hawn taħt), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.

— < 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-ħamrija u għandu jiġi ddeterminat billi jitkejjel il-pH tas-sottokampjuni tal-ħamrija eżattament qabel it-test (14).

Nota 2: Il-kontenut ta' pit tal-ħamrija artifiċjali jiddevja minn metodi ta' ttestjar fuq l-organiżmi tal-ħamrija, fejn fil-biċċa l-kbira tad-drabi jintuża 10 % pit (eż. (15)). Madankollu, skont l-EPPO (16), ħamrija agrikola tipika ma għandhiex iktar minn 5 % tal-materja organika, u għalhekk it-tnaqqis fil-kontenut tal-pit jirrifletti t-tnaqqis fil-possibbiltajiet ta' ħamrija naturali għal sorbiment tas-sustanza kimika tat-test mal-karbonju organiku.

Nota 3: Jekk ikun meħtieġ, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiċi, il-ħamrijiet naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservu wkoll bħala sottostrat tal-ittestjar u/jew tal-kultura. Madankollu, jekk tintuża ħamrija naturali, din għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas bl-oriġini (sit tal-ġbir), il-pH, il-konsistenza (distribuzzjoni tad-daqs tal-frak) u l-kontenut ta' materja organika. Jekk ikun disponibbli, għandu jiġi inkluż it-tip u l-isem tal-ħamrija skont il-klassifikazzjoni tal-ħamrija, u l-ħamrija ma għandu jkollha ebda kontaminazzjoni. F'każ li s-sustanza kimika tat-test hija metall jew metall organiku, għandha tiġi ddeterminata l-kapaċità tal-iskambju katjoniku (CEC) tal-ħamrija naturali. Għandha tingħata attenzjoni speċjali biex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità peress li l-informazzjoni ta' sfond dwar il-ħamriji naturali ġeneralment hija rari.

11. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (14) u Appendiċi 3). Jekk il-ħamrija hija iktar aċidika mill-medda meħtieġa (ara l-paragrafu 10), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq, din tista' tiġi aġġustata b'żieda ikbar tat-taħlita li tinkludi l-ewwel tliet komponenti deskritti fil-paragrafu 10, iżda li teskludi s-$CaCO_3$.

12. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jumejn sa sebat ijiem qabel il-bidu tat-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel biż-żieda ta' biżżejjed ilma distillat jew dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 sa 60 % tad-WHC massima. Il-kontenut ta' umdità huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massimu biż-żieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-żieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 16-18). Verifika approssimattiva addizzjonali tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija għandha tinkiseb billi l-ħamrija tingħafas bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umdità jkun korrett, għandhom jidhru qtar żgħar tal-ilma bejn is-swaba'.

13. Il-kontenut ta' umdità fil-ħamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test billi jitnixxef għal piż kostanti f'105 C skont l-ISO 11465 (17) u l-pH tal-ħamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (14). Dawn il-kejliet għandhom jitwettqu f'kampjuni addizzjonali mingħajr dud, kemm mill-ħamrija ta' kontroll kif ukoll minn kull waħda mill-ħamriji ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-ħamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċidużi jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi r-reċipjenti jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 20 u 24).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi użata f'dan it-test hijia *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Biex jinbeda t-test huwa meħtieġ dud nisa adult, miksub minn koorti sinkronizzata. Id-dud għandu jiġi introdott madwar 7-14-il jum wara li jsir adult, 28 — 35 jum wara l-bidu tat-tqegħid tal-bajd fis-sinkronizzazzjoni (ara l-paragrafu 3 u l-Appendiċi 4). Is-sors tad-dud jew il-fornitur u ż-żamma tal-kultura tal-laboratorju għandhom jiġu rreġistrati. Jekk tinżamm kultura tal-laboratorju, huwa rakkomandat li l-identità tal-ispeċi tiġi kkonfermata tal-inqas darba f'sena. Skeda ta' identifikazzjoni hija inkluża bħala l-Appendiċi 6.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

15. Is-sustanza kimika tat-test titħallat fil-ħamrija. Is-solventi organiċi użati fit-trattament tal-għajnuna tal-ħamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossiċità baxxa tagħhom għad-dud u kontroll tas-solventi xieraq għandhom jiġu inklużi fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 29).

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

16. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità meħtieġ, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 12). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test titħawwad sew b'lott wieħed ta' ħamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

17. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma iżda li jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Meta jintużaw tali veikoli, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha u l-kontroll għandu jkun fihom l-istess ammont tal-veikolu. Il-veikolu jiġi sprejat fuq ammont imħalllat b'ammont żgħir, pereżempju 10 g, ta' ramel kwarzuż irqiq. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taħt għata tad-dħaħen għal tal-inqas siegħa. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ħamrija mxarrba minn qabel u titħawwad sew billi jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umdità meħtieġa. It-taħlita finali tiġi introdotta fir-reċipjenti tat-test. Wieħed għandu jinnota li xi solventi jaf ikunu tossiċi għad-dud. Għalhekk, huwa rakkomandat li jintuża kontroll tal-ilma addizzjonali mingħajr veikolu jekk it-tossiċità tas-solvent għad-dud ma tkunx magħrufa. Jekk jintwera b'mod adegwat li s-solvent (fil-konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu applikati) ma għandu ebda effett, il-kontroll tal-ilma jista' jiġi eskluż.

Sustanza kimika tat-test li ma tantx tinħall fl-ilma u solventi organiċi

18. Għal sustanzi kimiċi li ma tantx jinħallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwivalent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq f'kull reċipjent tat-test (pereżempju 10 g ta' ramel kwarzuż irqiq għal erba' repliki) jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test xierqa. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umdità meħtieġ. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.

PROĊEDURA

Gruppi tat-test u kontrolli

19. Huma rakkomandati għaxar nisa adulti f'massa xotta ta' 20 g ta' ħamrija artifiċjali għal kull reċipjent ta' kontroll u ta' trattament. L-organiżmi tat-test għandhom jiżdiedu fi żmien sagħtejn wara l-preparazzjoni tas-sottostrat finali tat-test (jiġifieri wara l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test). F'każijiet speċifiċi (eż. meta t-tixjiħ huwa kkunsidrat bħala fattur determinanti) il-ħin bejn il-preparazzjoni tas-sottostat tal-ittestjar finali u ż-żieda tad-dud jista' jittawwal (għal dettalji ta' tali tixjiħ, ara (18)). Madankollu, f'tali każijiet għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika.

20. Wara ż-żieda tad-dud tal-ittestjar mal-ħamrija, id-dud jiġi pprovdut bl-ikel u l-piż inizjali ta' kull reċipjent tat-test għandu jitkejjel biex jintuża bħala referenza għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umdità tal-ħamrija matul it-test kif deskritt fil-paragrafu 24. Ir-reċipjenti tat-test imbagħad jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 8 u jitqiegħdu fil-kompartiment tat-test.

21. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wieħed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 15 sa 18. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli ħlief li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti bħal fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu ieħor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test f'każ li t-tossiċità tas-solvent ma tkunx magħrufa (ara l-paragrafu 17).

Kundizzjonijiet tat-test

22. It-temperatura tat-test għandha tkun ta' 20 ± 2 °C. It-temperatura għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum u jekk ikun meħtieġ tiġi aġġustata. It-test jitwettaq f'ċikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux qrib ir-reċipjenti tat-test. Għal raġunijiet ta' tqabbil, dawn il-kundizzjonijiet huma l-istess bħal f'testijiet ekotossikoloġiċi tal-ħamrija oħrajn (eż. (15)).

23. L-iskambju gassuż għandu jiġi ggarantit bl-arjazzjoni tar-reċipjenti tat-test tal-inqas darbtejn f'ġimgħa f'każ li jintużaw għotjien li jingħalqu bil-kamin. Jekk jintużaw għotjien b'garża, għandha tingħata attenzjoni speċjali għaż-żamma tal-kontenut ta' umdità tal-ħamrija (ara l-paragrafi 8 u 24).

24. Il-kontenut tal-ilma tas-sottostrat tal-ħamrija fir-reċipjenti tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jintiżen u jekk ikun meħtieġ kull ċertu żmien ir-reċipjenti tat-test jerġgħu jissaqqu (eż. darba f'ġimgħa). It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' umdità matul it-test ma għandux ikun differenti b'iktar minn 10 % mill-valur tal-bidu.

Tagħlif

25. Id-dud tal-ġobon (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) intwera li huwa sors ta' ikel xieraq. Kollemboli żgħar (eż. *Folsomia candida* Willem żgħar, 1902 jew Onychiurus *fimatus* (19), (20), enkitraeidi (eż. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) jew nematodi (eż. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) jistgħu jkunu xierqa wkoll (21). Huwa rakkomandat li l-ikel jiġi vverifikat qabel jintuża f'test. It-tip u l-ammont ta' ikel għandu jiggarantixxi numru adegwat ta' frieħ sabiex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità (paragrafu 6). Għall-għażla tal-priża, għandu jiġi kkunsidrat il-mod ta' azzjoni tal-oġġett tat-test (eż. akariċida tista' tkun tossika għad-dud tal-ikel ukoll, ara l-paragrafu 26).

26. Għandu jiġi pprovdut ikel *ad libitum* (jiġifieri kull darba ammont żgħir (ponta ta' spatula)). Għal dan il-għan, jista' jintuża wkoll exhaustor b'ġibda baxxa kif propost fit-test tal-kollemboli jew pinzell irqiq. Il-forniment ta' ikel fil-bidu tat-test u darbtejn sa tliet darbiet fil-ġimgħa ġeneralment sejjer ikun suffiċjenti. Meta l-oġġett tal-ittestjar jidher li huwa tossiku għall-priża, għandha tiġi kkunsidrata żieda fir-rata ta' tagħlif mu/jew sors ta' ikel alternattiv.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

27. L-għarfien minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, jitwettaq test tas-sejba tal-medda b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fil-medda ta' 0,1 — 1 000 mg/kg ta' ħamrija xotta, b'tal-inqas replikat wieħed għat-trattamenti u l-kontroll. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda huwa ta' 14-il jum, fejn wara tiġi ddeterminata l-mortalità tad-dud adult u n-numru ta' frieħ. Idealment, il-medda ta' konċentrazzjoni fit-test finali għandha tintgħażel b'tali mod li tinkludi konċentrazzjonijiet li fihom huma affettwati n-numru ta' frieħ filwaqt li l-ġenerazzjoni tal-ommijiet le. Madankollu, dan jaf ma jkunx possibbli għal sustanzi kimiċi li jikkawżaw effetti letali jew kważi letali f'konċentrazzjonijiet kważi simili. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu 'bracketed' bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li taffettwa l-organiżmi tat-test jew ikbar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha ssir biss f'każijiet eċċezzjonali, u għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa fir-rapport.

Disinn sperimentali

Testijiet ta' rispons għad-doża

28. Huma proposti tliet disinji tat-test, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test ieħor (Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraeidi (22)). L-adegwatezza ġenerali ta' dawn id-disinji kollha kienet ikkonfermata mill-eżitu tal-validazzjoni ta' *H. aculeifer*.

29. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 2,0.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

Test tal-limitu

30. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija), it-test tar-riproduzzjoni finali jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija. Test tal-limitu sejjer jipprovdi l-opportunità biex juri li l-NOEC jew l-EC_{10} għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll il-kontroll.

Durata u kejliet tat-test

31. Għandha tiġi rreġistrata kwalunkwe differenza osservata fl-imġiba u l-morfoloġija tad-dud fil-kontroll u r-reċipjenti ttrattati.

32. Fl-14-il jum id-dud li baqa' ħaj jiġi estratt mill-ħamrija permezz ta' estrazzjoni bis-sħana/dawl jew b'metodu xieraq ieħor (ara l-Appendiċi 5). In-numru ta' frieħ (jiġifieri larvi, protonimfi u dewtonimfi) u adulti jingħaddu separatament. Kwalunkwe dudu rqiq li ma jinstabx f'dan il-ħin għandu jiġi rreġistrat bħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni. L-effiċjenza tal-estrazzjoni għandha tkun ivvalidata darba jew darbtejn f'sena fil-kontrolli b'numru magħruf ta' adulti u frieħ. L-effiċjenza għandha tkun iktar minn 90 % bħala medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha (ara l-Appendiċi 5). L-għadd ta' adulti u frieħ mhumiex aġġustati għall-effiċjenza.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

33. Informazzjoni dwar il-metodi statistiċi li jistgħu jintużaw għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar tingħata fil-paragrafi 36 sa 41. Barra minn hekk, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-'Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni' (31).

34. Il-punt ta' tmiem ewlieni tat-test hija l-produzzjoni riproduttiva, hawnhekk in-numru ta' frieħ prodotti f'kull reċipjent tat-test tar-replikat (b'10 nisa adulti introdotti). L-analiżi statistika teħtieġ il-medja aritmetika (X) u l-varjanza (s^2) għall-produzzjoni riproduttiva li għandha tiġi kkalkolata għal kull trattament u għal kull kontroll. X u s^2 jintużaw għall-proċeduri ANOVA bħat-test t tal-Istudent, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams kif ukoll għall-kalkolu ta' intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %.

Nota: Dan il-punt ta' tmiem ewlieni huwa ekwivalenti għall-fekondità mkejla bħala n-numru ta' frieħ ħajjin prodotti matul it-test diviż min-numru ta' nisa parentali introdotti fil-bidu tat-test.

35. In-numru ta' nisa li baqgħu ħajjin fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità ewlieni u għandu jiġi ddokumentat. Bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' ħsara l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll.

EC_x

36. Il-valuri EC_x inkluż il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru deskritt fil-paragrafu 34 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Karber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

37. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa (skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġett tal-ittestjar meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżgħar) bi tmiem wieħed f'p ≤ 0,05. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin.

38. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-Test tal-proporzjon tad-devjazzjoni tal-medda mill-istandard (R/s-test) jew it-test Shapiro-Wilk (żewġ naħat, p ≤ 0,05). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'żewġ naħat, (p ≤ 0,05). Jekk il-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametriku (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettaq Analiżi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni multipli (eż. test-t ta' Dunnett) jew testijiet ta' tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams fil-każ ta' relazzjoni monotona bejn bejn id-doża u r-rispons) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti (p ≤ 0,05) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-oġġetti tal-ittestjar (l-għażla tat-test rakkomandat skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni). Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. it-test-U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġu ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

39. Jekk jitwettaq test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u trattament wieħed biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriku (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-Test ta' Student (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati.

40. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

41. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test*

  — l-identità tas-sustanza kimika tat-test, l-isem, il-lott, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;

  — il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow}, is-solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija).

— *Organiżmi tat-test*

  — identifikazzjoni u fornitur tal-organiżmi tal-ittestjar, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-kulturi;

  — medda ta' etajiet tal-organiżmi tal-ittestjar.

— *Kundizzjonijiet tat-test*

  — deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;

  — dettalji tal-preparazzjoni għall-ħamrija tal-ittestjar; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża ħamrija naturali (oriġini, storja, distribuzzjoni tad-daqs tal-frak, pH, kontenut tal-materja organika u jekk tkun disponibbli l-klassifikazzjoni tal-ħamrija)

  — il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija;

  — deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-ħamrija;

  — dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

  — id-daqs tar-reċipjenti tat-test u l-massa xotta tal-ħamrija tat-test għal kull reċipjent;

  — kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;

  — deskizzjoni tar-reġim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;

  — il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-ħamrija fil-bidu u matul it-test (kontroll u kull trattament)

  — deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni l-effiċjenza tal-estrazzjoni.

— *Riżultati tat-test*

  — in-numru ta' frieħ iddeterminat f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

  — in-numru ta' nisa adulti u l-mortalità tal-adulti (%) f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test

  — deskrizzjoni tas-sintomi ovvji jew bidliet distinti fl-imġiba;

  — ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

  — statistika fil-qosor (EC_x u/jew NOEC) inkluż limiti ta' kunfidenza ta' 95 % u deskrizzjoni tal-metodu tal-kalkolu;

  — plott tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons;

  — devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition. Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

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

(15) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness -. Toxicity for Earthworms..

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Il-Kapitolu C.32 ta' dan l-Anness- Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraeidi.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with 'good genes' in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test il-konċentrazzjonijiet tal-effetti kollha huma espressi bħala massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test):

Sustanza kimika tfisser sustanza jew taħlita

NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għal effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Sustanza Kimika tat-Test hija sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma tal-ħamrija huwa kkunsidrat bħala xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Ħamrija — Effetti tas-sustanzi li jniġġsu fuq il-ħniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni (23)).

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-ħamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qiegħda fuq xtelliera f'banju-marija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuż mitħun irqiq, imxarrab ħafna ġewwa reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat li jinxef). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC}\ (\text{f \% ta' massa xotta}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

Appendiċi 3

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Determinazzjoni tal-pH (16).

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

Appendiċi 4

Trobbija ta' *(Geolaelaps) aculeifer,* dud tal-ikel u sinkronizzazzjoni tal-kultura

Trobbija ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Il-kulturi jistgħu jinżammu f'reċipjenti tal-plastik jew vażetti tal-ħġieġ mimlija b'taħlita (9:1) ta' plaster bil-ġibs ta' Paris / trab tal-faħam. Il-ġibs jista' jinżamm umdu billi jiżdiedu ftit qtar ta' ilma distillat jew dejonizzat jekk ikun meħtieġ. It-temperaturi tat-trobbija huma ottimali bejn 20 ± 2 °C, reġim fid-dawl / dlam mhuwiex rilevanti għal din l-ispeċi. Il-priża tista' tkun dud Typrophagus putrescentiae jew Caloglyphus sp.(id-dud tal-ikel għandu jiġi mmaniġġjat b'attenzjoni peress li jista' jikkawża allerġiji fil-bnedmin), iżda nematodi, enkitraeidi u kollembolani huma adattati wkoll bħala priża. Is-sors tagħhom għandu jiġi rreġistrat. L-iżvilupp tal-popolazzjoni jista' jibda b'mara waħda peress li l-irġiel jiżviluppaw f'bajd mhux fertilizzat. Il-ġenerazzjonijiet jikkoinċidu ħafna. Mara tista' tgħix tal-inqas 100 jum u tista' tbid madwar 100 bajda matul il-ħajja tagħha. Rata ta' bidien massima tintlaħaq bejn l-10 u l-40 jum (wara li jsiru adulti) u tammonta għal 2,2 nisa tal-bajd^{-1} jum^{-1}. Iż-żmien ta' żvilupp minn bajda għal mara adulta huwa madwar 20 jum f'20 °C. Iktar minn kultura waħda għandha tiġi tinżamm minn qabel.

Trobbija ta' Typrophagus putrescentiae:

Id-dud jinżamm f'reċipjent tal-ħġieġ mimli bi trab irqiq tal-ħmira tal-birreriji li jitqiegħed f'barmil tal-plastik mimli b'soluzzjoni KNO_3 sabiex jiġi evitat li jaħrab. Id-dud tal-ikel jitqiegħed fuq wiċċ dan it-trab. Wara, jitħallat b'attenzjoni mat-trab (li għandu jitbiddel darbtejn fil-ġimgħa) permezz ta' spatula.

Sinkronizzazzjoni tal-kultura:

Il-kampjuni li jintużaw fit-test għandhom ikunu tal-istess età (ca. 7 ijiem wara l-ilħuq tal-istadju adult). F'temperatura ta' trobbija ta' 20 °C, din tintlaħaq billi

Ittasferixxi n-nisa lejn reċipjent tat-trobbija u żid biżżejjed ikel

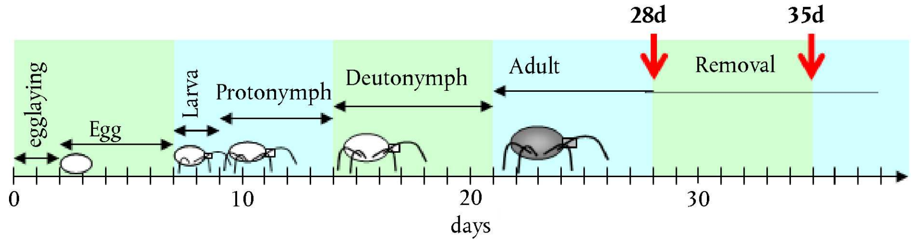
— Ħalli jumejn sa tliet ijiem għall-bidien tal-bajd, neħħi n-nisa

— Ħu n-nisa adulti għall-ittestjar bejn it-28 u l-35 jum wara li tibda tqiegħed l-adulti nisa f'reċipjenti ta' trobbija nodfa.

In-nisa adulti jistgħu jintgħarfu faċilment mill-irġiel u stadji ta' żvilupp oħra mid-daqs ikbar, il-forma minfuħa u t-tarka dorsali kannella tagħhom (l-irġiel huma irqaq u ċatti), in-nisa immaturi jkunu bojod għal kulur il-krema. L-iżvilupp tad-dud isegwi bejn wieħed u ieħor il-mudell deskritt hawn taħt f'20 °C (figura): Bajda 5 ijiem, Larva jumejn, Protonimfa 5 ijiem, Dewtonimfa 7 ijiem, perjodu ta' qabel il-bidien tal-mara jumejn. Wara, id-dud isir adult.

Figura

Żvilupp ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer f'20 °C. (tneħħija = nisa użati għat-test)



L-annimali tal-ittestjar adulti jitneħħew mill-kultura sinkronizzata u introdotti fir-reċipjenti tat-test bejn it-28 u l-35 jum wara li l-nisa ġenituri jkunu bdew ibidu l-bajd (jiġifieri 7 — 14-il jum wara li saru adulti). Dan jiżgura li l-annimali tal-ittestjar diġà jkunu għaddew mill-perjodu ta' preovipożizzjoni u tgħammru ma' rġiel li diġà jinsabu fir-reċipjent tal-kultura. Osservazzjonijiet fil-kulturi tal-laboratorju jissuġġerixxu li n-nisa jitgħammru eżatt jew ftit wara li jsiru adulti jekk ikun hemm l-irġiel (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Il-perjodu ta' sebat ijiem jintgħażel biex jiffaċilita l-integrazzjoni fir-rutina tal-laboratorju u biex joffri protezzjoni kontra l-varjabbiltà tal-iżvilupp individwali fost id-dud. Il-bidien għandu jinbeda b'tal-inqas l-istess numru ta' nisa li huma eventwalment meħtieġa għat-test (Jekk pereżempju jkunu meħtieġa 400 mara fit-test, tal-inqas 400 mara għandhom jitħallew ibidu l-bajd għal minn jumejn sa tlett ijiem. Tal-inqas 1 200 bajda għandhom ikunu l-punt ta' bidu għall-popolazzjoni sinkronizzata (proporzjon tas-sess madwar 0,5, mortalità madwar 0,2). Biex jiġi evitat il-kannibaliżmu, huwa iktar fattibbli li ma jinżammux iktar minn 20-30 mara li jbidu l-bajd f'reċipjent wieħed.

Appendiċi 5

Metodi ta' estrazzjoni

Għal mikroartropodi, estrazzjoni bis-sħana hija metodu xieraq għal kampjuni separati mill-ħamrija / sottostrat (ara l-figura ta' hawn taħt). Il-metodu huwa bbażat fuq l-attività tal-organiżmi, b'hekk il-kampjuni mobbli biss sejjer ikollhom il-possibbiltà li jiġu rreġistrati. Il-prinċipju tal-estrazzjoni bis-sħana huwa li jagħmel l-kundizzjonijiet għall-organiżmi gradwalment agħar fil-kampjun, biex b'hekk jitilqu mis-sottostrat u jaqgħu f'likwidu ta' ffissar (eż. etanol). Il-punti kruċjali huma d-durata tal-estrazzjoni u l-gradjent ta' kundizzjonijiet tajbin sa moderati sa ħżiena għall-organiżmi. Id-durata tal-estrazzjoni għat-testijiet ekotossikoloġiċi għandha tkun kemm jista' jkun qasira, peress li kwalunkwe tkabbir fil-popolazzjoni matul il-ħin tal-estrazzjoni jiffalsifika r-riżultati. Min-naħa l-oħra, it-temperatura u l-kundizzjonijiet ta' umdità fil-kampjun għandhom dejjem ikunu f'medda li tħalli lid-dud jiċċaqlaq. It-tisħin ta' kampjun tal-ħamrija jwassal għat-tnixxif ta' sottostrat. Jekk it-tnixxif ikun rapidu wisq, xi dud jaf ukoll jinxef qabel ikun irnexxilu jaħrab.

Għalhekk, hija proposta l-proċedura li ġejja (24) (25):

Apparat: Lembut Tullgren jew metodi paragunabbli bħal eż. McFadyen (tisħin minn fuq, il-kampjun jitpoġġa fuq lembut)

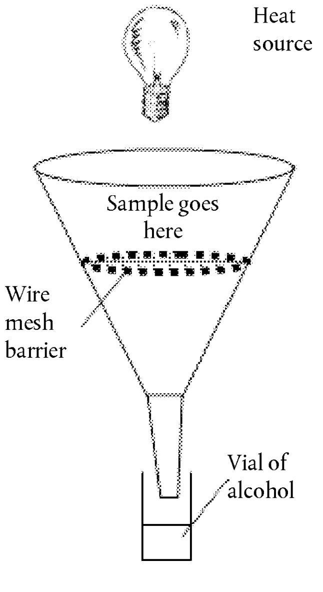
Reġim ta' tisħin: 25 °C għal 12-il siegħa, 35 °C għal 12-il siegħa, 45 °C għal 24 siegħa (total ta' 48 siegħa). It-temperatura għandha titkejjel fis-sottostrat.

Likwidu ta' ffissar: 70 % etanol

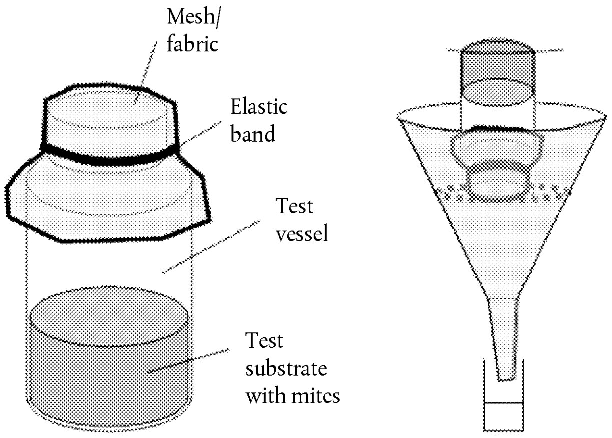
Dettalji: Ħu l-kunjett tal-ħġieġ li ntuża għat-test. Neħħi l-għatu u dawwar biċċa xibka jew drapp madwar il-ftuħ. It-tessut għandu jkollu daqs tax-xibka ta' 1,00 sa 1,5 mm. Waħħal id-drapp b'lasktuwa. Bil-mod dawwar il-kunjett rasu 'l isfel u qiegħdu fl-apparat tal-estrazzjoni. It-tessut iwaqqaf is-sottostrat milli joqgħod iqattar fil-likwidu ta' ffissar iżda jippermetti lid-dud jitlaq mill-kampjun. Ibda r-reġim ta' tisħin wara li tkun daħħalt il-kunjetti kollha. Temm l-estrazzjoni wara 48 siegħa. Neħħi l-kunjetti ta' ffissar u għodd id-dud permezz ta' mikroskopju tat-tnixxif.

L-effiċjenza fl-estrazzjoni tal-metodu magħżul għandha tkun ġiet ipprova darba jew darbtejn fis-sena permezz tar-reċipjenti li jkun fihom numru magħruf ta' frieħ u dud adult miżmuma f'sottostrat tat-test mhux ittrattat. L-effiċjenza għandha tkun ≥ 90 % mill-medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha.

Apparat ta' estrazzjoni tat-tip Tullgren



Kif tipprepara l-kunjett tat-test wara li jintemm it-test, qabel l-estrazzjoni



Appendiċi 6

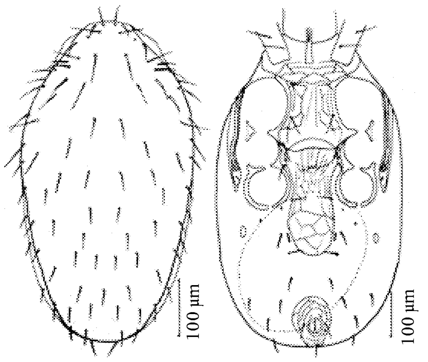
Identifikazzjoni ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Sottoklassi/ordni/sotto-ordni:	Familja:	Ġene/sottoġene/speċji:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

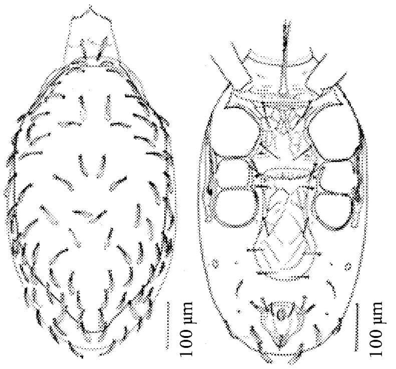
Awtur u Data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007

Letteratura użata:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

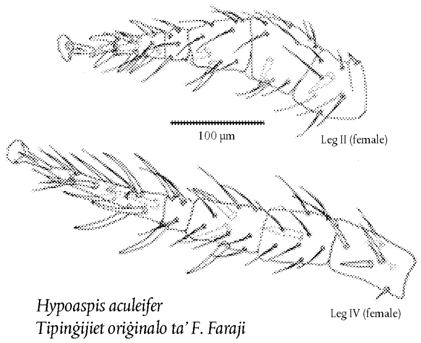
Karatteristiċi deterministiċi:	Tektum b'tarf tas-snin tond; skanalaturi ipostomali b'iktar minn 6 snin żgħar; setae dorsali tad-denb ta' Z4 mhux twil ħafna; setae setiform dorsali; kisi ġenitali normali, mhux imkabbar ħafna u li ma jilħaqx il-kisja anali; nofs ta' wara tal-kisja dorsali mingħajr setae mhux abbinati; saqajn II u IV b'xi macrosetae ħoxnin; seta dorsali Z5 madwar darbtejn itwal minn J5; numru fiss ta' cheli-cera bi 12-14-il sinna u numru mobbli b'2 sinniet; Idiosoma b'tul ta' 520-685 µm. Hypoaspis miles jintuża wkoll fil-kontroll bijoloġiku u jista' jitħawwad ma' H. aculeifer. Id-differenza ewlenija hija: H. miles jagħmel parti mis-sottoġeneru Cosmolaelaps u għandu setae dorsali qisu sikkina filwaqt li H. aculeifer jagħmel parti mis-sottoġeneru Geolaelaps u għandu setae dorsali setiform.



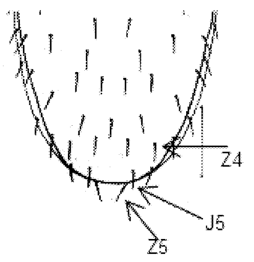
Hypoaspis aculeifer Wara Hughes, 1976



Hypoaspis miles Wara Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Tipinġijiet oriġinalo ta' F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
tarka dorsali b'setas karatteristiċi

Appendiċi 7

Informazzjoni bażika dwar il-bijoloġija ta' *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer jagħmel parti mill-familja Lealapidae, ordni Acari (dud), klassi Arachnida, tribù Arthropoda. Dawn jgħixu f'kull tip ta' ħamrija u jieklu dud ieħor, nematodi, enkitraeidi u kollembolani (26). F'każ ta' nuqqas ta' ikel, dawn jeqilbu għall-kannibaliżmu (27). Id-dud predatorju jitqassam f'segmenti f'idiosoma u gnatosoma. Distinzjoni ċara bejn idjosoma fil-prosoma (ras) u opistosoma (addome) ma teżistix. Il-gnatosoma (kisja tar-ras) fiha l-istrumenti għat-tagħlif bħal palps u chelicera. Il-chelicers jitqassmu fi tliet partijiet u jkollhom snin twal bil-ponta b'għamliet differenti. Minbarra l-inġestjoni, l-irġiel jużaw il-chelicers tagħhom prinċipalment biex jittrasferixxu l-ispermatofori lin-nisa. Kisja dorsali tkopri kważi kompletament l-idjosoma. Parti kbira mill-idiosoma tal-mara hija okkupata mill-organi riproduttivi, li huma b'mod partikolari evidenti ftit qabel ma jbidu l-bajd. Fuq iż-żaqq, jistgħu jinstabu żewġ kisjiet, il-kisja sternali u dik ġenitali. Is-saqajn kollha jiġu pprovduti b'lanżit u xewk. Il-lanżit jintuża biex ikunu jistgħu jeħlu meta jimxu fuq wiċċ il-ħamrija jew ġo fiha. L-ewwel par saqajn jużawhom prinċipalment bħala antenni. It-tieni par saqajn ma jużawhomx biss biex jiċċaqalqu iżda anki biex jifgħu l-priża. Ix-xewk tar-raba' par jista' jservi bħala protezzjoni kif ukoll 'mutur għaċ-ċaqliq' (28). L-irġiel huma twal 0,55 — 0,65 mm u jiżnu 10 — 15 µg. In-nisa huma twal 0,8 — 0,9 mm u jiżnu 50 — 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Fig. 1

In-nisa, l-irġiel, il-protonimfa u l-larvi ta' H. aculeifer.

F'23 °C, id-dud isir sesswalment matur wara 16-il jum (nisa) u 18-il jum (irġiel), rispettivament (6). In-nisa jġorru l-isperma fis-solenostom fejn imbagħad sejrin jiġu ttrasferiti lejn l-ovar. Fl-ovar l-isperma timmatura u sejrin jinħażnu. Il-fertilizzazzjoni ssir biss wara l-maturazzjoni tal-isperma fl-ovar. In-nisa sejrin ibidu l-bajd fertilizzat jew mhux fertilizzat f'ċapep jew b'mod separat, preferibbilment fi xquq jew toqob. In-nisa li għaddew minn kopulazzjoni jistgħu jġorru frieħ taż-żewġ sessi, filwaqt li minn bajd tan-nisa li ma għaddewx minn kopulazzjoni sejrin ifaqqsu frieħ irġiel biss. Biex isiru adulti, dawn iridu jgħaddu minn erba' fażijiet (bajda — larva, larva — protonimfa, protonimfa — dewtonimfa, dewtonimfa — adult).

Il-bajda tkun ta' kulur abjad bħall-ħalib, ijalina, ellissa u b'tul ta' madwar 0,37 mm b'mantell solidu. Skont (8), il-larvi għandhom daqs ta' bejn 0,42 — 0,45 mm. Dawn għandhom biss tliet pari saqajn. Fil-parti tar-ras, jiżviluppaw chelicers u palps. Il-chelicers, li jkollhom xi ftit snin zgħar (denticles), jintużaw biex ikunu jistgħu joħorġu mill-bajda. Wara l-ewwel tqaxxir, bejn jum u jumejn wara t-tfaqqis, jiġu żviluppati l-protonymphs. Dawn huma bojod ukoll, b'daqs ta' 0,45 — 0,62 mm (8) u għandhom erba' pari saqajn. Fuq il-chelicers, is-snin ikunu jidhru kompletament. Meta jingħata bidu għal dan l-istadju, id-dud jibda jagħlef. Għal din ir-raġuni l-kutikula tal-priża tittaqqab bil-chelicers u tiddaħħal sekrezzjoni għal diġestjoni intestinali żejda fil-priża. Il-maxx tal-ikel tista' mbagħad tiġi mirdugħa mid-dudu. Il-chelicers jistgħu jintużaw ukoll biex jitqatgħu frak ikbar minn biċċiet tal-ikel (28). Wara tqaxxir ieħor, jiġu żviluppati d-dewtonimfi. Dawn ikollhom daqs ta' 0,60 — 0,80 mm (8) u b'kulur isfar għal kannella ċar. Meta jingħata bidu għal din il-fażi, dawn jistgħu jiġu separati f'nisa u rġiel. Wara tqaxxir ieħor, li matulu l-annimali huma inattivi u tkun qiegħda tiżviluppa l-kisja kannella (wara madwar 14-il jum), id-dud isir adult (28) (29) (30). It-tul ta' ħajja tagħhom huwa bejn 48 u 100 jum f25 °C (27).

Appendiċi 8

Sommarju u skeda taż-żmien tal-azzjonijiet ewlenin li għandhom jittieħdu sabiex jitwettaq it-test ta' Hypoaspis

Żmien (jiem) bidu tat-test = jum 0	Attività / kompitu
Jum – 35 sa – 28	Ittrasferixxi n-nisa mill-kultura ewlenija lejn reċipjenti nodfa biex tibda s-sinkronizzazzjoni jumejn wara: neħħi n-nisa darbtejn jew tliet darbiet fil-ġimgħa: fornihom b'biżżejjed ikel
Jum – 5 (+/– 2)	Ipprepara l-ħamrija artifiċjali
Jum – 4 (+/– 2)	Iddetermina d-WHC tal-ħamrija artifiċjali Nixxef mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kampjuni u kkalkola d-WHC
Jum – 4 (+/– 2)	Xarrab minn qabel il-ħamrija artifiċjali biex tilħaq 20 — 30 % ta' WHC
Jum 0	Ibda t-test: żid is-sustanza kimika tat-test mal-ħamrija artifiċjali Introduċi 10 nisa f'kull replikat Iżen kull replikat Stabbilixxi kontrolli abjotiċi għall-kontenut ta' umdità u l-pH, 2 repliki għal kull trattament Nixxef il-kontrolli tal-umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli tal-umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 3, 6, 9, 12 (madwar)	Forni kull replikat b'ammont suffiċjenti ta' organiżmi tal-priża Iżen kull replikat u eventalment żid ilma evaporat
Jum 14	Spiċċa t-test, stabbilixxi l-estrazzjoni bir-repliki kollha flimkien mal-kontrolli tal-effiċjenza tal-estrazzjoni Nixxef il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 16	Ittermina l-estrazzjoni
Jum 16 +	Irreġistra n-numru ta' adulti u frieħ fil-materjal estratt Irrapporta r-riżultati fuq it-tabelli ta' mudell Irrapporta l-proċedura tal-ittestjar fl-iskedi tal-protokoll tat-test

C.37. **ASSAĠĠ FUQ 21 JUM TAL-ĦUT: SKRINJAR FUQ PERJODU QASIR GĦAL ATTIVITÀ ESTROĠENIKA U ANDROĠENIKA, U INIBIZZJONI TAL-AROMATAŻI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 230 tal-OECD (2009). Il-ħtieġa li jiġi żviluppat u vvalidat assaġġ tal-ħut li jkun jista' jidentifika ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali ġejja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawżaw effetti avversi kemm fil-bnedmin kif ukoll fl-organiżmi slavaġ minħabba l-interazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi mas-sistema endokrinali. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għall-iskrinjar u l-ittestjar ta' sustanzi li potenzjalment ifixklu s-sistema endokrinali. Element minnhom tal-attività kien li tiġi żviluppata Linja Gwida tat-Test għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali tal-ispeċi tal-ħut. L-Assaġġ fuq 21 jum tal-Iskrinjar tas-Sistema Endokrinali tal-Ħut għadda minn programm estensiv ta' validazzjoni li jikkonsisti fi studji interlaboratorji b'sustanzi kimiċi magħżula biex jintwerew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ fid-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi u li jinibixxu l-aromatażi (1, 2, 3, 4, 5) fit-tliet speċijiet ta' ħut investigati (il-karpjun buras, il-medaka Ġappuniża u ż-żebra); id-detezzjoni ta' attività androġenika hija possibbli fil-karpjun buras u fil-medaka, iżda mhux fiż-żebra. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jippermettix id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi antiandroġeniċi. Il-ħidma ta' validazzjoni ġiet riveduta permezz ta' evalwazzjoni bejn il-pari minn bord ta' esperti maħtura mill-Koordinaturi Nazzjonali tal-Programm tal-Linji Gwida tat-Test (6). L-assaġġ mhuwiex imfassal biex jidentifika mekkaniżmi speċifiċi ta' tfixkil ormonali peress li l-annimali tat-test għandhom assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali (HPG) intatta, li jista' jkollha rispons għal sustanzi kimiċi li għandhom impatt fuq l-assi HPG f'livelli differenti. L-assaġġ tar-Riproduzzjoni tal-Ħut Fuq Żmien Qasir (TG 229 tal-OECD) jinkludi l-fekondità u, kif xieraq, l-istopatoloġija gonadali għall-karpjun buras, kif ukoll il-punti ta' tmiem kollha inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar. It-TG 229 tal-OECD jipprovdi skrinjar tas-sustanzi kimiċi li jaffettwaw ir-riproduzzjoni permezz ta' mekkaniżmi varji inklużi l-modalitajiet endokrinali. Dan għandu jiġi kkunsidrat qabel ma jintagħżel l-aktar metodu xieraq ta' ttestjar.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi assaġġ ta' skrinjar *in vivo* li fih ħut maskili sesswalment matur u ħut femminili li jkun qed ibid jinżammu flimkien u jiġu esposti għal sustanza kimika matul sehem limitat miċ-ċiklu tal-ħajja tagħhom (21 jum). Fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni ta' 21 jum, skont l-ispeċi li tkun qed tintuża, jitkejjel punt ta' tmiem bijomarkatur wieħed jew tnejn fl-irġiel u n-nisa bħala indikatur ta' inibizzjoni estroġenika, tal-aromatażi jew tal-attività androġenika tas-sustanza kimika tat-test; dawn il-punti ta' tmiem huma l-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji. Il-vitelloġenina titkejjel fil-karpjun buras, fil-medaka Ġappuniża u fiż-żebra, filwaqt li l-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u l-medaka Ġappuniża biss.

3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ ta' skrinjar *in vivo* għal ċerti modi ta' kif taħdem is-sistema endokrinali u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-'Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali' (28).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Normalment il-vitelloġenina tiġi prodotta mill-fwied ta' vertebrati ovipari nisa bħala rispons għall-estroġenu endoġenu li jkun qed jiċċirkola. Hija prekursur tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demm u tidħol fl-ovarji, fejn tiġi assorbita u modifikata mill-bajd li jkun qed jiżviluppa. Il-vitelloġenina hija kważi intraċċabbli fil-plażma ta' ħut femminili u maskili immaturi għaliex m'għandhomx biżżejjed estroġenu jiċċirkola; madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi l-vitelloġenina bħala rispons għal stimulazzjoni tal-estroġenu eżoġenu.

5. Il-kejl tal vitelloġenina jservi għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom diversi modi ta' azzjoni estroġenika. Id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi tista' ssir bil-kejl tal-induzzjoni tal-vitelloġenina fil-ħut maskili, u ġiet dokumentata sew fil-letteratura xjentifika evalwata bejn il-pari (eż. (7)). L-induzzjoni tal-vitelloġenina ntweriet ukoll wara espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli(8, 9). Tnaqqis fil-livell ta' estroġenu li jiċċirkola fin-nisa, pereżempju permezz tal-inibizzjoni tal-aromatażi li tikkonverti l-androġenu endoġenu f'estroġenu naturali 17β-estradjol, jikkawża tnaqqis fil-livellta' vitelloġenina, li jintuża għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom karatteristiċi inibitorji tal-aromatażi (10, 11). Ir-rilevanza bijoloġika tar-rispons tal-vitelloġenina wara inibizzjoni estroġenika/tal-aromatażi hija stabbilita u ġiet dokumentata b'mod estensiv. Madankollu, huwa possibbli wkoll li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità.

6. Ġew żviluppati b'suċċess diversi metodi ta' kejl u dawn ġew standardizzati għall-użu ta' rutina. Dan huwa l-każ fil-metodi ta' Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku (ELISA) speċifiċi għall-ispeċi li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-vitelloġenina prodotta f'kampjuni żgħar tad-demm jew tal-fwied miġbura minn ħut individwali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Għall-kejl tal-VTG jittieħed kampjun tad-demm tal-karpjun buras, id-demm taż-żebra jew l-omoġenat tar-ras/denb, u l-fwied tal-medaka. Fil-medaka, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla mid-demm u mill-fwied (19). L-Appendiċi 6 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għall-analiżi tal-vitelloġenina. Kits għall-kejl tal-vitelloġenina jistgħu jinkisbu faċilment; dawn il-kits għandhom ikunu bbażati fuq metodu ELISA vvalidat li jkun speċifiku għall-ispeċi.

7. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji f'ħut maskili ta' ċerti speċijiet jidhru fuq barra, huma kwantifikabbli u jirrispondu għal-livelli ta' androġeni endoġeni li jiċċirkolaw; dan huwa l-każ għall-karpjun buras u l-medaka — iżda mhux għaż-żebra, li m'għandhiex karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli. In-nisa jżommu l-kapaċità li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji maskili, meta jiġu esposti għal sustanzi kimiċi androġeniċi fl-ilma. Hemm bosta studji disponibbli fil-letteratura xjentifika li jiddokumentaw dan it-tip ta' rispons fil-karpjun buras (20) u fil-medaka (21). Tnaqqis fil-karatteristiċi sesswali sekondarji fl-irġiel għandu jiġi interpretat b'kawtela minħabba saħħa statistika dgħajfa, u għandu jkun ibbażat fuq ġudizzju espert u l-piż tal-evidenza. Hemm limitazzjonijiet dwar l-użu taż-żebra f'dan assaġġ, minħabba n-nuqqas ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli li jirrispondu għal sustanzi kimiċi b'effetti androġeniċi.

8. Fil-karpjun buras, l-indikatur ewlieni ta' espożizzjoni androġenika eżoġena huwa l-għadd ta' tuberkuli tan-namra (*nuptial tubercles*) li jinsabu fuq imnieħer il-ħuta femminili. Fil-medaka, l-għadd ta' proċessi papillari jikkostitwixxi l-markatur ewlieni ta' espożizzjoni eżoġena għal sustanzi kimiċi androġeniċi f'ħut femminili. L-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B jindikaw il-proċeduri rrakkomandati li għandhom jiġu segwiti għall-valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali fil-karpjun buras u fil-medaka, rispettivament.

9. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Fl-assaġġ, il-ħut maskili u dawk femminili li jkunu fi stat riproduttiv jiġu esposti f'reċipjenti tat-test flimkien. L-istat adult u riproduttiv tagħhom jippermetti sabiex issir differenzjazzjoni ċara bejn is-sessi, u b'hekk tkun tista' ssir analiżi relatata mas-sess ta' kull punt ta' tmiem, u jiżgura s-sensittività tagħhom lejn sustanzi kimiċi esoġeni. Fi tmiem it-test, is-sess jiġi kkonfermat permezz ta' eżami makroskopiku tal-gonadi wara ftuħ ventrali tal-addome b'imqass. Fl-Appendiċi 2 tingħata ħarsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tal-bijoassaġġ. Normalment l-assaġġ jinbeda b'kampjun ta' ħut minn popolazzjoni li tkun f'kundizzjoni riproduttiva; m'għandhomx jintużaw annimali li qed jixjieħu. Fis-sezzjoni dwar l-Għażla tal-ħut hija pprovduta gwida dwar l-età tal-ħut u dwar l-istatus riproduttiv. L-assaġġ isir permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi li jintużaw għall-espożizzjoni kif ukoll kontroll tal-ilma, u kontroll tas-solvent jekk ikun hemm bżonn. Għal kull trattament jintużaw żewġ reċipjenti jew repliki (kull reċipjent ikun fih 5 irġiel u 5 nisa) fil-medaka u ż-żebra, filwaqt li fil-karpjun buras jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 2 irġiel u 4 nisa). Dan isir biex tiġi akkomodata l-imġiba territorjali tal-karpjun buras maskili filwaqt li jinżamm assaġġ b'saħħtu biżżejjed. L-espożizzjoni ssir għal 21 jum u l-kampjunar tal-ħut isir fil-21 jum ta' espożizzjoni.

11. Mal-kampjunar fil-jum 21, l-annimali kollha jinqatlu bla tbatija. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka (ara l-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B); fiż-żebra u l-karpjun buras jinġabru kampjuni tad-demm għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, inkella jistgħu jinġabru r-ras/denb għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina fiż-żebra (Appendiċi 6); fil-medaka l-fwied jinġabar għall-analiżi tal-VTG (Appendiċi 6).

IL-KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI TAT-TEST

12. Biex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità fil-kontrolli tal-ilma (jew tas-solvent) m'għandhiex taqbeż l-10 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni;

— matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha tilħaq minimu ta' 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV);

— it-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test qatt m'għandha tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C matul il-perjodu ta' espożizzjoni u din għandha tinżamm fi ħdan 2 °C tal-meded ta' temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);

— l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

13. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) ossiġenometri u apparati li jkejlu l-pH;

(b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u l-alkalinità tal-ilma;

(c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;

(d) tankijiet magħmulin minn materjal kimiku inerti u ta' kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 2);

(e) sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras u ż-żebra, l-Appendiċi 4 jagħti d-dettalji neċessarji;

(f) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa ± 0,5mg).

Ilma

14. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma tad-dilwizzjoni ma jinfluwenzax bla bżonn ir-riżultat tat-test (pereżempju billi jbiddel is-sustanza kimika tat-test; kull ċertu żmien għandhom jittieħdu kampjuni biex jiġu analizzati). Fejn l-ilma tad-dilwizzjoni ikun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità, il-kejl ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, u Ni), ta' anjoni u katjoni ewlenin (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, u SO_4^{2-}), ta' pestiċidi (eż. pestiċidi organofosforiċi totali u pestiċidi organokloriniċi totali), ta' karbonju organiku u ta' solidi sospiżi totali għandu jsir, pereżempju, kull tliet xhur. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma hija kostanti matul tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma b'dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 3.

Is-soluzzjonijiet tat-test

15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi ppreparata permezz ta' sempliċi tħallit jew tħeżżiż tas-sustanza kimika tat-test f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija konċentrata adegwata jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità). L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess ħin għandu jsir solvent ta' kontroll ukoll, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi. Għal sustanzi kimiċi tat-test diffiċli, teknikament solvent jista' jkun l-aħjar soluzzjoni; għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli (22). L-għażla tas-solvent tiġi determinata mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 µl/l, li għandu jiġi osservat. Madankollu reviżjoni reċenti (23) enfasizzat fuq tħassib addizzjonali meta jintużaw solventi għall-ittestjar tal-attività fis-sistema endokrinali. Għalhekk, huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent, jekk ikun meħtieġ, tiġi minimizzata meta dan ikun teknikament fattibbli (skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test).

16. Għandha tintuża sistema ta' test bi fluss kontinwu. Sistema bħal din tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u tal-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu ċċekkjati kull ċertu żmien, idealment kuljum, matul it-test u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik ta' grad baxx jew materjal ieħor li jista' jkun fih sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi. Meta jkun qed jintgħażel il-materjal għas-sistema bi fluss kontinwu, għandha titqies il-possibilità li s-sustanza kimika tat-test tiġi adsorbita f'dan il-materjal.

Iż-żamma tal-ħut

17. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn popolazzjoni tal-laboratorju, idealment minn stokk wieħed, li jkun idderra għal mill-inqas ġimgħatejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test. Importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-istokkjar (għad-definizzjonijiet, ara l-Appendiċi 1) jkunu xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 2).

18. Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-ħut jitħallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem oħra; jekk ikun hemm mortalità ogħla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott jiġi aċċettat

19. Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, fil-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, jew matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-ħut m'għandux jingħata kura għal mard.

Preespożizzjoni u l-għażla tal-ħut

20. Huwa rrakkomandat li jkun hemm perjodu ta' preespożizzjoni ta' ġimgħa, li matulu l-annimali jitqiegħdu f'reċipjenti simili għal dawk tat-test innifsu. Matul il-perjodu ta' żamma u matul il-fażi ta' espożizzjoni l-ħut għandhom jintemgħu *ad libitum*. Il-fażi ta' espożizzjoni tinbeda b'ħut adulti sesswalment dimorfiku minn provvista tal-laboratorju ta' annimali maturi biżżejjed għar-riproduzzjoni (eż. b'karatteristiċi sesswali sekondarji li jidhru fir-rigward tal-karpjun buras u l-medaka), u li jkunu qed ibidu b'mod attiv. Għal gwida ġenerali biss (u dan ma għandux jitqies mingħajr l-osservazzjoni tal-istatus riproduttiv propju ta' lott partikolari ta' ħut), il-karpjuni buras għandu jkollhom madwar 20 (± 2) ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkolturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Il-medaka Ġappuniża għandu jkollha madwar 16 (± 2)–il ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul ħajjithom. Iż-żebra għandu jkollhom madwar 16 (± 2)-il ġimgħa, jekk wieħed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 26 ± 2 °C matul ħajjithom.

ID-DISINN TAT-TEST

21. Jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, kontroll wieħed (tal-ilma) u, jekk ikun hemm bżonn, kontroll tas-solvent. Id-dejta tista' tiġi analizzata sabiex jiġu determinati differenzi statistikament sinifikanti bejn ir-risponsi għat-trattament u għall-kontroll. Dawn l-analiżijiet ser jindikaw jekk hemmx il-ħtieġa ta' ittestjar ulterjuri aktar fit-tul għal effetti avversi (jiġifieri, sopravivenza, żvilupp, tkabbir u riproduzzjoni) għas-sustanza kimika, aktar milli għall-użu fil-valutazzjoni tar-riskju (24).

22. Għaż-żebra u l-medaka, fil-jum 21 tal-esperiment, l-irġiel u n-nisa minn kull livell ta' trattament (5 irġiel u 5 nisa f'kull wieħed miż-żewġ repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji, fejn applikabbli. Għall-karpjun buras, fil-jum 21 ta' espożizzjoni, l-irġiel u n-nisa (2 irġiel u 4 nisa f'kull wieħed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitelloġenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

23. Għall-finijiet ta' dan it-test, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tiġi stabbiliti mill-konċentrazzjoni massima tollerata (MTC) li tiġi ddeterminata minn *range finder* jew minn dejta oħra dwar it-tossiċità, jew 10 mg/l, jew is-solubilità massima fl-ilma, skont liema tkun l-aktar baxxa. L-MTC hija definita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li twassal għal mortalità ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li teżisti dejta empirika dwar tossiċità akuta jew dejta oħra dwar it-tossiċità li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC tista' ma tkunx eżatta u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali.

24. Huma meħtieġa tliet konċentrazzjonijiet tat-test, spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx l-10, u kontroll ta' ilma tad-dilwizzjoni (u kontroll tas-solvent jekk ikun meħtieġ). Huwa rrakkomandat li l-fatturi ta' spazjar jkunu f'firxa ta' bejn 3.2 u 10.

PROĊEDURA

L-għażla u l-użin tal-ħut tat-test

25. Huwa importanti li fil-bidu tal-assaġġ tiġi minimizzata l-varjazzjoni fil-piż tal-ħut. Il-meded ta' daqsijiet adattati għall-ispeċi differenti rrakkomandati għall-użu f'dan it-test huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Għal-lott kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali għall-ħut maskili u femminili fil-bidu tat-test għandha, jekk possibbli, tinżamm bejn ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Huwa rrakkomandat li qabel it-test jintiżen sottokampjun tal-istokk tal-ħut sabiex jiġi stmat il-piż medju.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Durata

26. It-test idum għaddej 21 jum, wara perjodu ta' preespożizzjoni. Il-perjodu rrakkomandat ta' preespożizzjoni huwa ta' ġimgħa.

Tmigħ

27. Il-ħut għandhom jintemgħu *ad libitum* b'ikel adattat (Appendiċi 2) b'rata suffiċjenti biex tinżamm il-kundizzjoni tal-ġisem. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tkabbir mikrobiku u turbidità fl-ilma. Bħala gwida ġenerali, ir-razzjon ta' kuljum jista' jinqasam f'żewġ jew tliet porzjonijiet ugwali għal tmigħ multiplu kuljum, separat b'mill-inqas tliet sigħat bejn kull tmigħ. Huwa aċċettabbli li jingħata razzjon akbar uniku b'mod partikolari għat-tmiem il-ġimgħa. Il-ħut m'għandux jingħata x'jiekol għal 12-il siegħa qabel il-kampjunar/nekroskopija.

28. L-ikel tal-ħut għandu jiġi evalwat għall-preżenza ta' kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarboni aromatiċi poliċikliċi (PAHs), bifenili poliklorinati (PCBs). Għandu jiġi evitat ikel b'livell għoli ta' fitoestroġeni li jista' jikkomprometti r-rispons tal-assaġġ għal agonisti magħrufa tal-estroġenu (eż. 17-beta estradiol).

29. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandu jitneħħa mir-reċipjent tat-test tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa, eż. billi l-qiegħ ta' kull tank jitnaddaf sew permezz ta' sifun.

Dawl u temperatura

30. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u tal-kejl

31. Qabel jibda l-perjodu ta' espożizzjoni, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi kollha meħtieġa, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli regolari, kif ġej: idealment, ir-rati tal-fluss tas-soluzzjoni ewlenija dilwenti u tossikanti għandhom jiġu vverifikati kuljum, iżda tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa, u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test innifsu jitkejlu fir-reċipjenti kollha fil-bidu tat-test u f'intervalli ta' ġimgħa wara dan.

32. Huwa rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla.

33. Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu jiġu ffiltrati (eż., bl-użu ta' pori ta' 0,45 μm) jew jiġu ċentrifugati. Jekk ikun hemm bżonn, imbagħad iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rrakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tat-test ma jiġix adsorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

34. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, it-temperatura, u l-pH għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-ebusija u l-alkalinità totali għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed fl-ogħla konċentrazzjoni tal-anqas darba fil-ġimgħa. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tat-test.

Osservazzjonijiet

35. Għadd ta' risponsi ġenerali (eż. sopravivenza) u r-risponsi bijoloġiċi ewlenin (eż. il-livelli tal-vitelloġenina) jiġu vvalutati matul l-assaġġ jew fi tmiem l-assaġġ. Il-kejl u l-valutazzjoni ta' dawn il-punti ta' tmiem u l-utilità tagħhom huma deskritti hawn taħt.

Sopravivenza

36. Matul il-perjodu tat-test, il-ħut għandu jiġi eżaminat kuljum u kwalunkwe mortalità għandha tiġi rreġistrata u l-ħut mejjet għandu jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-ħut mejjet m'għandux jiġi sostitwit la fir-reċipjent tal-kontroll u lanqas fir-reċipjent tat-trattament. Is-sess tal-ħut li jmut matul it-test għandu jiġi determinat permezz ta' evalwazzjoni makroskopika tal-gonadi.

Imġiba u dehra

37. Għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe mġiba abnormali (relatata mal-kontrolli); din tista' tinkludi sinjali ta' tossiċità ġenerali inklużi iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, telf tal-bilanċ, u inattività jew tmigħ mhux tas-soltu. Barra minn hekk għandha tittieħed nota ta' anormalitajiet esterni (bħal emorraġija, skolorazzjoni). Dawn is-sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu kkunsidrati bir-reqqa waqt l-interpretazzjoni tad-dejta peress li jistgħu jindikaw konċentrazzjonijiet li fihom il-bijomarkaturi ta' attività endokrinali ma jkunux affidabbli. Dawn l-osservazzjonijiet tal-imġiba jistgħu anke jipprovdu informazzjoni kwalitattiva biex jinkiseb tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. Per eżempju, fil-karpjuni buras, f'irġiel normali jew f'nisa b'karatteristiċi maskili ġiet osservata aggressività territorjali matul espożizzjoni androġenika; fiż-żebra, l-imġiba karatteristika ta' tgħammir u riproduzjoni wara jinxtegħel id-dawl tiddgħajjef jew tiġi mfixkla minn espożizzjoni estroġenika jew antiandroġenika.

38. Peress li xi aspetti tad-dehra (primarjament il-kulur) jistgħu jinbidlu malajr bit-tqandil, importanti li l-osservazzjonijiet kwalitattivi jsiru qabel ma l-annimali jitneħħew mis-sistema tat-test. L-esperjenza miksuba s'issa bil-karpjuni buras tissuġġerixxi li għall-ewwel xi sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi esterni li ġejjin: il-kulur tal-ġisem (ċar jew skur), mudelli ta' kolorazzjoni (il-preżenza ta' strixxi vertikali), u l-forma tal-ġisem (ir-ras u r-reġjun pettorali). Għalhekk, l-osservazzjonijiet dwar id-dehra fiżika tal-ħut għandhom isiru matul it-test, u fi tmiem l-istudju

Il-qtil bla tbatija tal-ħut

39. Fil-jum 21, jiġifieri fi tmiem l-espożizzjoni, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' Trikaina (Trikaina metan sulfonat, Metakaina, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l ibbaferjat bi 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonat tas-sodju, CAS 144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni fil-membrana mukuża; imbagħad jittieħed kampjun tad-demm jew it-tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina, kif spjegat fis-sezzjoni tal-Vitelloġenina.

Osservazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji

40. Ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (l-għadd ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras maskili, il-proċessi papillari fil-medaka maskili). B'mod partikulari, sustanzi kimiċi li jkollhom ċerti modi ta' azzjoni jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fl-annimali tas-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal trenbolon, metiltestosteron u diidrotestosteron, jistgħu jwasslu sabiex il-karpjuni buras femminili jiżviluppaw tuberkuli tan-namra prominenti jew sabiex il-medaka femminili tiżviluppa proċessi papillari (11, 20, 21). Ġie rrapportat ukoll li l-agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd tat-tuberkuli tan-namra u d-daqs tal-kuxxinett tal-kozz dorsali f'irġiel adulti (25, 26). Dawn l-osservazzjonijiet morfoloġiċi grossi jistgħu jipprovdu tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv siewi biex jingħata tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-ħut. L-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras u l-proċessi papillari fil-medaka jistgħu jiġu kkwantifikati b'mod dirett jew b'mod aktar prattiku f'kampjuni ppreservati. Il-proċeduri rrakkomandati għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka huma disponibbli mill-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B, rispettivament.

Vitelloġenina (VTG)

41. Id-demm jinġabar mill-arterja/vina kawdali permezz ta' tubulu kapillari mikroematokritiku eparinizzat, jew inkella permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa. Skont kemm hi kbira l-ħuta, il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw bejn 5 u 60 μl għal kull ħuta individwali għall-karpjuni buras u minn 5-15 μl għal kull ħuta individwali għaż-żebra. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni, u tinħażen ma' inibituri tal-proteażi f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina. Inkella, fil-medaka jintuża l-fwied, u fiż-żebra l-omoġenat tar-ras/denb jista' jintuża bħala sors ta' tessut għad-determinazzjoni tal-vitelloġenina (Appendiċi 6). Il-kejl tal-VTG għandu jkun imsejjes fuq metodu ELISA omologu vvalidat, bl-użu ta' standard omologu tal-VTG u antikorpi omologi. Huwa rrakkomandat li jintuża metodu li jkun kapaċi jiskopri livelli ta' VTG baxxi daqs ftit ng/ml fil-plażma (jew ng/mg fit-tessut), li huwa l-livell ta' sfond f'ħut maskili li ma jkunx ġie espost.

42. Il-kontroll tal-kwalità tal-analiżi tal-vitelloġenina jintlaħaq permezz tal-użu ta' standards, bjanki u tal-anqas analiżijiet duplikati. Għal kull metodu ELISA, għandu jsir test għall-effett matriċi (effett ta' dilwizzjoni ta' kampjun) biex jiġi determinat il-fattur minimu tad-dilwizzjoni tal-kampjun. Kull platt ELISA li jintuża għall-assaġġi tal-VTG għandu jinkludi l-kampjuni tal-kontroll tal-kwalità li ġejjin: tal-anqas 6 standards ta' kalibraġġ li jkopru l-firxa ta' konċentrazzjonijiet mistennija tal-vitelloġenina, u tal-anqas bjank tal-assaġġ mhux speċifiku wieħed (analiżi duplikata). L-assorbiment ta' dawn il-bjanki għandu jkun ta' anqas minn 5 % tal-assorbiment standard massimu ta' kalibrazzjoni. Minn kull kampjun ta' dilwizzjoni jiġu analizzati tal-anqas żewġ alikwoti (*well-duplicates*). *Well-duplicates* li jvarjaw b'aktar minn 20 % għandhom jerġgħu jiġu analizzati.

43. Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (R^2) għall-kurvi ta' kalibrazzjoni għandu jkun ta' aktar minn 0,99. Madankollu, korrelazzjoni għolja mhijiex biżżejjed biex tiggarantixxi tbassir adegwat tal-konċentrazzjoni fil-meded kollha. Minbarra li jkun hemm korrelazzjoni għolja biżżejjed għall-kurva ta' kalibrazzjoni, il-konċentrazzjoni ta' kull standard, kif ikkalkolata mill-kurva ta' kalibrazzjoni, dejjem għandha taqa' bejn 70 u 120 % tal-konċentrazzjoni nominali tiegħu. Jekk il-konċentrazzjonijiet nominali jxaqilbu lil hinn mil-linja ta' rigressjoni tal-kalibrazzjoni (eż. f'konċentrazzjonijiet inqas), jista' jkun hemm bżonn li l-kurva ta' kalibrazzjoni tinqasam f'meded baxxi u għoljin jew li jintuża mudell nonlineari li jaqbel b'mod adegwat mad-dejta dwar l-assorbiment. Jekk il-kurva tinqasam, iż-żewġ segmenti tal-linja għandu jkollhom $R^2 > 0{,}99$.

44. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku, u l-limitu ta' kwantitazzjoni (LOQ) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku mmoltiplikata bl-inqas fattur ta' dilwizzjoni.

45. F'kull jum li fih isiru l-assaġġi tal-vitelloġenina għandu jiġi analizzat kampjun ta' fortifikazzjoni permezz ta' standard ta' referenza interassaġġi (Appendiċi 7). Il-proporzjon tal-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

DEJTA U RAPPORTAR

Valutazzjoni tar-Risponsi tal-Bijomarkatur permezz ta' Analiżi tal-Varjanza (ANOVA)

46. Biex tiġi identifikata l-attività endokrinali potenzjali ta' sustanza kimika, ir-risponsi jitqabblu bejn il-gruppi ta' trattament u ta' kontroll permezz ta' analiżi tal-varjanza (ANOVA). Meta jintuża kontroll tas-solvent, għandu jsir test statistiku xieraq bejn il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u l-kontroll tas-solvent għal kull punt ta' tmiem. Gwida dwar kif titratta d-dejta dwar il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u dik dwar is-solvent fl-analiżi statistika sussegwenti tista' tinstab fl-OECD, 2006c (27). Id-dejta kollha dwar ir-rispons bijoloġiku għandha tiġi analizzata u rrapportata separatament skont is-sess. Jekk ma jintlaħqux is-suppożizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi — distribuzzjoni mhux normali (eż. it-test ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (it-test ta' Bartlett jew it-test ta' Levene), għandha tiġi kkunsidrata l-possibilità li d-dejta tiġi konvertita f'varjanzi omoġenizzati qabel ma ssir l-ANOVA, jew qabel ma ssir ANOVA ppeżata. It-test ta' Dunnett (parametriku) fuq tqabbiliet multipli bejn pari jew it-test ta' Mann-Whitney b'aġġustament Bonferroni (mhux parametriku) jista' jintuża għal rispons mhux monotonu għad-doża. Jekk ir-rispons għad-doża ikun kważi monotonu jistgħu jintużaw testijiet statistiċi oħra (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test ta' Williams). Fl-Appendiċi 8 ġiet ipprovduta flowchart statistika biex tgħin fid-deċiżjoni dwar l-aktar test statistiku xieraq li għandu jintuża. Tagħrif addizzjonali jista' jinkiseb ukoll mid-Dokument tal-OECD dwar Approċċi Attwali lejn l-Analiżi Statistika ta' Dejta dwar l-Ekotossiċità (27).

Rapportar tar-riżultati tat-test

47. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Il-faċilità ta' ttestjar:

— Persunal responsabbli u r-responsabbiltajiet ta' studju tagħhom

— Kull laboratorju għandu jkun wera profiċjenza fl-użu ta' firxa ta' sustanzi kimiċi rappreżentattivi

Is-sustanza kimika tat-test:

— Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

— In-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti

— Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test

— Informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-bijodegradabilità

Solvent:

— Karatterizzazzjoni tas-solvent (in-natura, il-konċentrazzjoni użata)

— Ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent (jekk ma jkunx ilma)

Annimali tat-test:

— L-ispeċi u r-razza

— Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur

— L-età tal-ħut fil-bidu tat-test u l-istatus ta' riproduzzjoni

— Dettalji tal-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali

— Il-piż tal-ġisem tal-ħut fil-bidu tal-espożizzjoni (minn sottokampjun tal-istokk tal-ħut)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-proċedura tat-test użata (it-tip tat-test, ir-rata tat-tagħbija, id-densità tal-istokkjar, eċċ.);

— Il-metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u r-rata tal-fluss;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test imkejla kull ġimgħa u l-metodu analitiku użat, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard fir-reċipjenti tat-test u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni (inkluż il-pH, l-ebusija, l-alkalinità, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul, il-livelli ta' klorin residwu, il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi u kwalunkwe kejl ieħor li jkun sar)

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu maħlul;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont li ngħata u l-frekwenza u analiżijiet għal kontaminanti relevanti jekk disponibbli (eż. PCBs, PAHs u pestiċidi organoklorurati).

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Dejta dwar il-mortalitajiet li jseħħu fi kwalunkwe konċentrazzjoni tat-test u fil-kontroll;

— Tekniki analitiċi statistiċi użati, it-trattament tad-dejta u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati;

— Dejta dwar osservazzjonijiet bijoloġiċi ta' morfoloġija grossa, inklużi l-karatteristiċi sesswali sekondarji u l-vitelloġenina;

— Riżultati tal-analiżi tad-dejta, idealment f'forma tabulari u grafika;

— Inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli kkawżat mis-sustanza kimika tat-test

GWIDA GĦALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

48. Din is-sezzjoni fiha ftit kunsiderazzjonijiet li għandhom jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għad-diversi punti ta' tmiem imkejla. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela fejn is-sustanza kimika tat-test tidher li tkun qed tikkawża tossiċità evidenti jew li qed ikollha impatt fuq il-kundizzjoni ġenerali tal-annimal tat-test.

49. Meta tkun qed tiġi stabbilita l-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, għandha tingħata attenzjoni biex ma tinqabiżx il-konċentrazzjoni massima tollerata biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Importanti li tal-anqas ikun hemm trattament wieħed li fih ma jkunx hemm sinjali ta' effetti tossiċi. Sinjali ta' mard u sinjali ta' effetti tossiċi għandhom jiġu vvalutati u rrapportati f'ċertu dettall. Pereżempju, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata wkoll mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità. Madankollu, l-interpretazzjoni tal-effetti tista' tiġi sostnuta minn livelli oħra ta' kura li ma jitfixklux mit-tossiċità sistemika.

50. Hemm xi aspetti li wieħed irid iqis għall-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test. Bħala gwida, il-livelli tal-VTG fi gruppi ta' kontroll tal-irġiel u tan-nisa għandhom ikunu distinti u separati b'madwar tliet ordnijiet ta' kobor fil-karpjun buras u fiż-żebra, u b'madwar ordni uniku ta' kobor għall-medaka. Eżempji tal-medda ta' valuri li wieħed jista' jiltaqa' magħhom fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura huma disponibbli fir-rapporti ta' validazzjoni (1, 2, 3, 4). Valuri għolja tal-VTG fl-irġiel ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-rispons tal-assaġġ u l-kapaċità tiegħu li jiskopri agonisti dgħajfa tal-estroġenu. Valuri baxxi tal-VTG fin-nisa ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-assaġġ u l-ħila tiegħu li jiskopri inibituri tal-aromatażi u antagonisti tal-estroġenu. Biex tinbena dik il-gwida ntużaw l-istudji ta' validazzjoni.

51. Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-ħut jew tal-fornitur) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika. Huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi kimiċi li jkopru firxa ta' modi ta' azzjoni jew impatti fuq għadd tal-punti ta' tmiem tat-test. Fil-prattika, kull laboratorju huwa mħeġġeġ jibni dejta storika ta' kontroll propja għall-irġiel u għan-nisa u biex jagħmel kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività estroġenika (eż. 17β-estradjol f'doża ta' 100 ng/l, jew agonist dgħajjef magħruf) li twassal għal żieda fil-VTG fil-ħut maskili, kimika ta' kontroll pożittiv għall-inibizzjoni tal-aromatażi (eż. fadrozole jew prochloraz f'doża ta' 300 μg/l) li twassal għal tnaqqis fil-VTG fil-ħut nisa, u kimika ta' kontroll pożittiv għall-attività androġenika (eż. 17β-trenbolon f'doża ta' 5 μg/l) li twassal għall-induzzjoni ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka femminili. Din id-dejta kollha tista' titqabbel ma' dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni (1, 2, 3) biex tiġi żgurata l-profiċjenza tal-laboratorju.

52. B'mod ġenerali, il-kejl tal-vitelloġenina għandu jitqies pożittiv jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti fil-VTG fl-irġiel ($p < 0,05$), jew tnaqqis statistikament sinifikanti fin-nisa ($p < 0,05$) tal-anqas fl-ogħla doża ttestjata meta mqabbla mal-grupp ta' kontroll, u fin-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità ġenerali. Riżultat pożittiv jikseb sostenn ikbar meta jintwera li hemm relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u l-kurva tar-rispons. Kif intqal qabel, it-tnaqqis fil-vitelloġenina jaf ma jkollux oriġini kompletament endokrinali; madankollu, ġeneralment riżultat pożittiv għandu jiġi interpretat bħala evidenza ta' attività endokrinali *in vivo*, u normalment għandu jagħti bidu għal azzjonijiet għal kjarifika ulterjuri.

LETTERATURA

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (aċċessat fit-18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Kxif b'suċċess ta' inibituri (anti-) androġeniċi u aromatase f'karpjuni buras adulti qabel ir-riproduzzjoni (Pimephales promelas) permezz ta' punti ta' tmiem li jitkejlu faċilment ta' żvilupp sesswali. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Applikazzjoni ta' ELISA għall-kwantifikazzjoni ta' konċentrazzjonijiet ta' vitelloġenin f'karpjuni buras (Pimephales promelas) esposti għal kimiċi li jfixklu l-endokrina. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23 (3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as 'signposts,' not 'traffic lights,' in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

Appendiċi 1

Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet

Sustanza Kimika: Sustanza jew taħlita

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni.

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku.

Rata ta' tagħbija: Piż bil-likwidu tal-ħut f'kull volum ta' ilma.

Densità tal-istokkjar: L-għadd ta' ħut f'kull volum ta' ilma.

VTG (Vitelloġenina): Prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

Assi HPG: Assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

MTC: Konċentrazzjoni Massima Tollerata, li tirrappreżenta madwar 10 % tal-LC_{50}.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġ tal-iskrinjar tas-sistema endokrinali tal-ħut

1. Speċijiet Rakkomandati	**Karpjun buras** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Żebra** (*Danio rerio*)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 μE/m²/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 μE/m²/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 μE/m²/s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu (it-tranżizzjonijiet bejn tlugħ ix-xemx / nżul ix-xemx huma fakultattivi, madanakollu ma jitqisux neċessarji)	16-il siegħa ta' dawl, 8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam
7. Rata ta' tagħbija	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l
8. Daqs tal-kompartiment tat-test	10 l (minimu)	2 l (minimu)	5 l (minimu)
9. Volum tas-soluzzjoni tat-test	8 l (minimu)	1,5 l (minimu)	4 l (minimu)
10. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' 6 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum
11. Età tal-organiżmi tat-test	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20
12. Piż imxarrab approssimattiv tal-ħut adulti (g)	Nisa: 1,5 ± 20 % Irġiel: 2,5 ± 20 %	Nisa: 0,35 ± 20 % Irġiel: 0,35 ± 20 %	Nisa: 0,65 ± 20 % Irġiel: 0,4 ± 20 %
13. Nru ta' ħut f'kull reċipjent tat-test	6 (2 irġiel u 4 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)
14. Nru ta' trattamenti	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)
15. Nru ta' reċipjenti għal kull trattament	Minimu ta' 4	Minimu ta' 2	Minimu ta' 2
16. Nru ta' ħut għal kull konċentrazzjoni tat-test	16-il mara adulta u 8 irġiel (4 nisa u 2 irġiel f'kull reċipjent replika)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikat)

17. Reġim ta' tmigħ	Gambli adulti jew nauplii tal-ilma mielaħ ħajjin jew iffriżati darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielaħ darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew taħlita ta' dawn ta' hawn fuq
18. Ossiġenazzjoni	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn ħlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taħt is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja
19. Ilma tad-dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif
20. Perjodu ta' preesporżizzjoni	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati
21. Durata tal-espożizzjoni kimika	21 jum	21 jum	21 jum
22. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba VTG
23. Aċċettabilità tat-test	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 24 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossiġenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 26 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-ħut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi ħdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.

Appendiċi 3

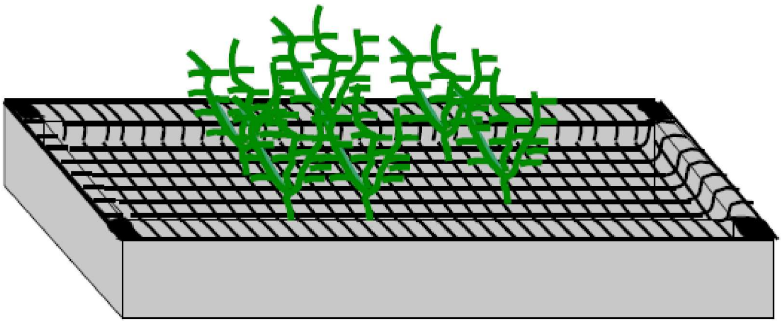
Uħud mill-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tad-dilwizzjini aċċettabbli

Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l

Appendiċi 4A

Sottostrat għall-bidien għaż-żebra

Trej għall-bidien: dixx kollu tal-ħġieġ, per eżempju 22 × 15 × 5,5 cm (l × w × d), kopert b'kannizzata tal-azzar inossidabbli li tista' titneħħa (xibka wiesgħa 2 mm). Il-kannizzata għandha tgħatti l-bokka tad-dixx f'livell taħt ix-xifer.



Is-sottostrat tal-bidien għandu jitpoġġa fuq il-kannizzata. Għandu jipprovdi struttura biex il-ħut ikunu jistgħu jidħlu fiha. Pereżempju, pjanti artifiċjali tal-akkwarji magħmulin minn materjal aħdar tal-plastik huma tajbin (NB: għandu jitqies l-adsorbiment possibbli tal-kimika tat-test fil-materjal tal-plastik). Il-materjal tal-plastik għandu jitbattal f'volum suffiċjenti ta' ilma sħun għal tul ta' żmien suffiċjenti biex jiġi żgurat li ma tintreħa ebda sustanza kimika fl-ilma tat-test. Meta jkun qed jintuża materjal tal-ħġieġ għandu jiġi żgurat li l-ħut la jindarab u lanqas ma jkun iffullat matul l-azzjonijiet vigorużi tiegħu.

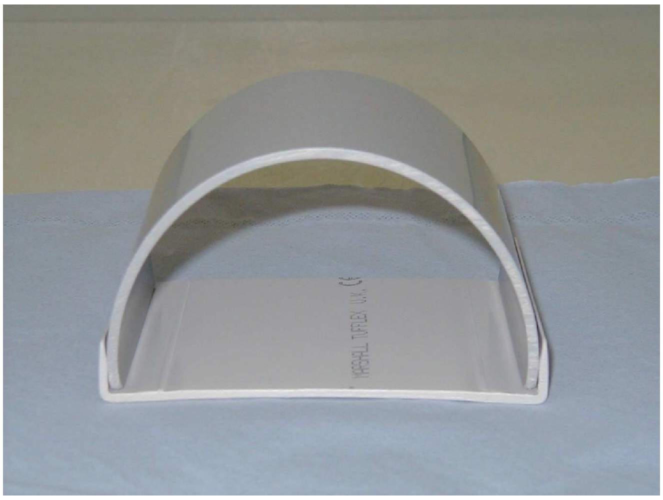
Id-distanza bejn it-trej u l-panewwi tal-ħġieġ għandha tkun ta' mill-inqas 3 cm biex jiġi żgurat li l-bidien ma jsirx barra mit-trej. Il-bajd li jitbied fuq it-trej jaqa' minn ġol-kannizzata u jista' jiġi kampjunat tliet kwarti sa siegħa wara l-bidu tal-illuminazzjoni. Il-bajd trasparenti ma jeħilx u jista' jingħadd faċilment permezz tal-użu ta' dawl transversali. Meta jkunu qed jintużaw ħames nisa f'kull reċipjent, sa 20 bajda f'ġurnata jistgħu jitqiesu bħala kwantità baxxa, sa 100 bħala medja u aktar minn 100 bħala kwantità għolja. It-trej tal-bidien għandu jitneħħa, il-bajd għandu jinġabar u t-trej tal-bidien għandu jerġa' jiddaħħal fir-reċipjent tat-test, jew l-aktar tard possibbli filgħaxija jew kmieni ħafna filgħodu. It-trej tal-bidien m'għandux jitħalla aktar minn siegħa biex jerġa' jiddaħħal peress li nkella s-sinjal tas-sottostrat tal-bidien jista' jinduċi tgħammir individwali u bidien fi żmien mhux tas-soltu. Jekk sitwazzjoni tkun teħtieġ li t-trej tal-bidien jiddaħħal aktar tard, dan għandu jsir mill-inqas 9 sigħat wara l-bidu tal-illuminazzjoni. F'dan il-ħin tard fil-ġurnata, il-bidien ma jibqax jiġi indott iktar.

Appendiċi 4B

Sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras

F'kull kompartiment tat-test jitqiegħdu żewġ jew tliet madumiet jew trejs riproduttivi kkombinati tal-plastik/ċeramika/ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (eż., kanal semiċirkulari griż twil 80 mm mqiegħed fuq trej bix-xoffa twil 130 mm) (ara l-istampa). Intwera li madum taċ-ċeramika jew tal-PVC akklimatizzati sew joqgħod bħala sottostrat tal-bidien (Thorpe *et al*, 2007).

Huwa rrakkomandat li l-madum jinbarax biex tittejjeb l-adeżjoni. It-trej għandu jiġi skrinjat ukoll biex il-ħut jitwaqqaf milli jaċċessa l-bajd li jkun waqa' sakemm ma tkunx intweriet effiċjenza tas-sottostrat tal-bidien użat fl-adeżjoni tal-bajd.



Il-bażi hija ddisinjata biex iżżomm kwalunkwe bajd li ma jeħilx mal-wiċċ tal-madum u għalhekk jaqa' f'qiegħ it-tank (jew dak il-bajd li jitbied direttament fuq il-bażi ċatta tal-plastik). Qabel jintużaw is-sottostrati tal-bidien għandhom jitbattlu lkoll għal mhux anqas minn 12-il siegħa, f'ilma tad-dilwizzjoni.

REFERENZI

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

Appendiċi 5A

Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali

Ħarsa ġenerali

Karatteristiċi potenzjalment importanti fid-dehra fiżika fil-karpjuni buras adulti fl-ittestjar għal sustanzi li jfixklu s-sistema endokrinali jinkludu l-kulur tal-ġisem (jiġifieri ċar/skur), il-mudelli ta' kolorazzjoni (jiġifieri l-preżenza jew in-nuqqas ta' faxex vertikali), il-forma tal-ġisem (jiġifieri l-forma tar-ras u tar-reġjun pettorali, id-distensjoni tal-addome), u l-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (jiġifieri l-għadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra, id-daqs tal-kuxxinett dorsali u tal-ovipożitur).

It-tuberkuli tan-namra jinsabu fuq ir-ras (il-kuxxinett dorsali) tal-karpjuni buras irġiel riproduttivament-attivi, u ġeneralment ikunu rranġati f'mudell simmetriku bilateralment (Jensen et al. 2001). In-nisa tal-kontroll u l-irġiel u n-nisa żgħar ma juru l-ebda żvilupp ta' tuberkuli (Jensen et al. 2001). Jista' jkun hemm sa tmien tuberkuli individwali madwar l-għajnejn u bejn l-imnifsejn tal-irġiel. L-akbar għadd ta' tuberkuli u l-akbar tuberkuli jinsabu f'żewġ linji paralleli eżatt taħt l-imnieħer u fuq il-ħalq. F'ħafna ħut hemm gruppi ta' tuberkuli taħt ix-xedaq t'isfel; dawk l-eqreb tal-ħalq ġeneralment jinsabu bħala par uniku, filwaqt li l-iktar sett ventrali jista' jkun magħmul minn massimu ta' erba' tuberkuli. L-għadd attwali ta' tuberkuli rarament ikun ta' aktar minn 30 (medda, 18-28; Jensen et al. 2001). It-tuberkuli predominanti (f'termini ta' għadd) huma preżenti bħala struttura waħda, relattivament tonda, b'għoli kważi ekwivalenti għar-raġġ. Ħafna mill-irġiel attivi fir-riproduzzjoni għandhom ukoll, tal-anqas ftit, tuberkuli mkabbrin u evidenti li m'humiex distingwibbli bħala strutturi individwali.

Xi tipi ta' sustanzi kimiċi li jfixklu s-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' ċerti karatteristiċi sesswali sekondarji fis-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal 17β-metiltestosteron jew 17β-trenbolon, jistgħu jikkawżaw l-iżvilupp ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras nisa (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), filwaqt li agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd jew id-daqs tat-tuberkuli tan-namra fl-irġiel (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Hawn taħt hawn deskrizzjoni tal-karatterizzazzjoni tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras fuq il-bażi ta' proċeduri użati fil-laboratorju tal-Environmental Protection Agency f'Duluth, MN, l-Istati Uniti. Prodotti u/jew tagħmir speċifiċi jistgħu jiġu sostitwiti ma' materjali paragunabbli disponibbli.

L-osservazzjoni ssir l-aħjar bl-użu ta' lenti illuminata jew mikroskopju 3X illuminat għad-dissezzjonijiet. Ħares lejn il-ħuta mil-lat dorsali u anterjuri 'l quddiem (ir-ras lejn min ikun qed josserva).

a) Poġġi l-ħuta f'dixx Petri żgħir (eż., b'dijametru ta' 100 mm), anterjuri 'l quddiem, u ventrali 'l isfel. Iffoka l-*viewfinder* biex tippermetti l-identifikazzjoni tat-tuberkuli. Bil-galbu u bil-mod dawwar il-ħuta minn naħa għall-oħra biex tidentifika ż-żoni fejn ikun hemm it-tuberkuli. Għodd u kklassifika t-tuberkuli.

b) Irrepeti l-osservazzjoni fuq il-lat ventrali tar-ras billi tpoġġi l-lat anterjuri dorsali tal-ħuta 'l quddiem fid-dixx Petri.

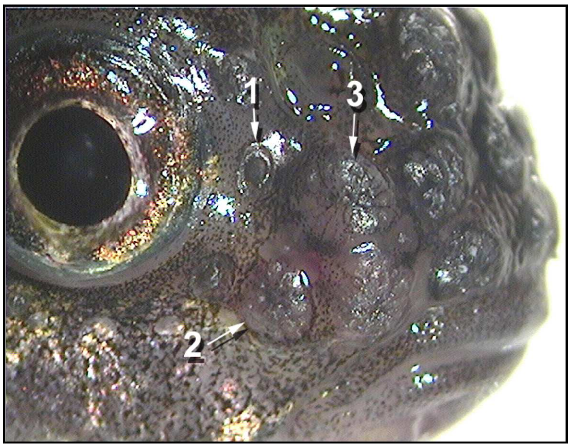
c) L-osservazzjonijiet għandhom jitlestew fi żmien 2 minuti għal kull ħuta.

L-Għadd u l-Klassifikazzjoni tat-Tuberkuli

Ġew identifikati sitt żoni speċifiċi għall-valutazzjoni tal-preżenza u tal-iżvilupp tat-tuberkuli f'karpjuni buras adulti. Ġie żviluppat mudell biex jiġi mmappjat il-post u l-kwantità tat-tuberkuli preżenti (ara tmiem dan l-Appendiċi). L-għadd ta' tuberkuli jiġi rreġistrat u d-daqs tagħhom jista' jiġi kklassifikat b'mod kwantitattiv bħala: 0- xejn, 1-preżenti, 2-imkabbrin u 3-evidenti għal kull organiżmu (Fig. 1).

Klassifikazzjoni ta' 0- ebda tuberkulu preżenti. Klassifikazzjoni ta' 1-preżenti, hija identifikata bħala kwalunkwe tuberkulu li jkollu punt uniku li l-għoli tiegħu ikun kważi ekwivalenti għar-raġġ tiegħu (dijametru). Klassifikazzjoni ta' 2- mkabbrin, hija identifikata bħala tessut li fid-dehra jixbah asterisk, li ġeneralment ikollu bażi radjali kbira bi xquq jew kanali ħerġin miċ-ċentru. Ħafna drabi l-għoli tat-tuberkuli ikun aktar ippizzjat iżda xi drabi jista' jkun naqra fit-tond. Klassifikazzjoni ta' 3- evidenti, ġeneralment ikun pjuttost kbir u ttundjat bi struttura inqas definita. Xi drabi dawn it-tuberkuli ikunu qrib xulxin u jiffurmaw massa waħda tul żona individwali jew taħlita ta' żoni (B, C u D, deskritti hawn taħt). Il-kolorazzjoni u d-disinn huma simili għall-klassifikazzjoni ta' 2 iżda xi drabi ikunu pjuttost indiskriminati. Ġeneralment l-użu ta' din is-sistema ta' klassifikazzjoni jwassal għal punteġġi globali ta' tuberkuli ta' < 50 f'raġel normali tal-kontroll b'għadd ta' 18 sa 20 tuberkulu (Jensen et al. 2001

Figura 1



F'ċertu ħut l-għadd propju ta' tuberkuli jista' jkun akbar mill-kaxxi tal-mudelli (Appendiċi A) għal żona partikolari ta' klassifikazzjoni. F'dan il-każ, in-numri addizzjonali ta' klassifikazzjoni jistgħu jiġu mmarkati ġewwa, fuq il-lemin jew fuq ix-xellug tal-kaxxa. Għalhekk, il-mudell m'għandux għalfejn ikun simmetriku. Teknika addizzjonali għall-immappjar tat-tuberkuli f'pari jew meħmużin vertikalment tul il-pjan orizzontali tal-ħalq tista' ssir billi f'kaxxa waħda jitniżżlu żewġ punti ta' klassifikazzjoni tat-tuberkuli.

Reġjuni ta' mmappjar:

A — Tuberkuli li jinsabu madwar l-għajnejn. Jiġu mmappjati mil-lat dorsali għal dak ventrali madwar ir-rimm anterjuri tal-għajn. Komunement dawn ikunu f'multipli f'irġiel maturi ta' kontroll, ma jkunux preżenti f'nisa ta' kontroll, ikunu ġeneralment f'par (wieħed ħdejn kull għajn) jew waħedhom f'nisa esposti għall-androġeni.

B — Tuberkuli li jinsabu bejn l-imnieħer, (pori sensorjali fil-kanal). Normalment dawn ikunu f'pari f'irġiel tal-kontroll f'livelli aktar elevati (2- imkabbrin jew 3- evidenti) ta' żvilupp. Mhux preżenti f'nisa tal-kontroll b'xi okkorrenza u żvilupp f'nisa esposti għall-androġeni.

C — Tuberkuli li jinsabu eżatt wara l-imnieħer, paralleli mal-ħalq. Ġeneralment dawn ikunu mkabbrin jew evidenti f'irġiel maturi tal-kontroll. Preżenti jew imkabbrin f'irġiel anqas żviluppati jew f'nisa ttrattati bl-androġeni.

D — Tuberkuli li jinsabu paralleli tul il-linja tal-ħalq. Ġeneralment ikklassifikatati bħala żviluppati f'irġiel tal-kontroll. Assenti f'nisa tal-kontroll iżda preżenti f'nisa esposti għall-androġeni.

E — Tuberkuli li jinsabu fuq ix-xedaq t'isfel, qrib il-ħalq, normalment ikunu żgħar u ġeneralment ikunu f'pari. Ivarjaw f'irġiel tal-kontroll jew ittrattati, u f'nisa ttrattati.

F — Tuberkuli li jinsabu fil-lat ventrali għal E. Normalment ikunu żgħar u f'pari. Preżenti f'irġiel tal-kontroll u f'nisa esposti għall-androġeni.

REFERENZI

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Mudell għat-Tuberkuli **Klassifikazzjoni Numerika**

ID ____________ 1-preżenti

Data ____________ 2-mkabbar

Total ____________ 3-pronunzjat

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

Appendiċi 5B

Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali

Hawn taħt hawn deskrizzjoni tal-kejl tal-proċessi papillari (*), li huma l-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka (*Oryzias latipes*).

(*) Normalment il-proċessi papillari jidhru biss f'irġiel adulti u jinsabu fuq ix-xewk tal-pinen mit-tieni sas-seba' jew it-tmien waħda jekk wieħed jgħodd min-naħa posterjuri tal-pinna anali (Fig.1 u 2). Madankollu, il-proċessi rarament jidhru fl-ewwel xewka tal-pinna mil-lat posterjuri tal-pinna anali. Dan l-SOP ikopri l-kejl ta' proċessi fuq l-ewwel xewka tal-pinna (l-għadd ta' xewk tal-pinen jirreferi għall-ordni min-naħa posterjuri tal-pinna anali f'dan l-SOP).

(1) Wara l-qtugħ tal-fwied (Appendiċi 6), il-karkassa titqiegħed f'tubu koniku li jkun fih madwar 10 ml ta' 10 % formalina newtrali bbaferjata ('il fuq: ir-ras, 'l isfel: id-denb). Jekk il-gonada titqiegħed f'soluzzjoni oħra li mhix 10 % formalina newtrali bbaferjata, agħmel qatgħa trasversali tul il-karkassa bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus permezz ta' xafra, u ara li ma tagħmilx ħsara lill-gonopori u l-gonada stess (Fig.3). Poġġi n-naħa kranjali tal-ġisem tal-ħuta fis-soluzzjoni fissattiva biex tippreserva l-gonada, u n-naħa tad-denb tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata kif deskritta hawn fuq.

(2) Wara li tpoġġi l-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata, aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali b'pinzetta u itwih għal madwar 30 sekonda biex iżomm il-pinna anali miftuħa. Meta tkun qed taqbad il-pinna anali b'pinzetta, aqbad ftit xewk tal-pinen fir-reġjun anterjuri bil-galbu biex ma tobroxx il-proċessi papillari.

(3) Wara li żżomm il-pinna anali miftuħa għal madwar 30 sekonda, aħżen ġisem il-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata f'temperatura ambjentali sakemm jitkejlu l-proċessi papillari (il-kejl għandu jsir wara ffissar għal mhux anqas minn 24 siegħa).

Kejl

(1) Wara l-iffissar tal-ġisem tal-ħuta f'10 % formalina newtrali bbaferjata għal mill-inqas 24 siegħa, iġbor il-karkassa tal-ħuta mit-tubu koniku u imsaħ il-formalina fuq il-karta tal-filtru (jew b'xugaman tal-karta).

(2) Poġġi l-ħuta bl-addome 'l fuq. Imbagħad aqta' l-pinna anali b'imqass żgħar tad-dissezzjoni bil-galbu (idealment għandek taqta' l-pinna anali b'ammont żgħir ta' pteriġjofora).

(3) Aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali li tkun inqatgħet b'pinzetta u poġġiha fuq lastra tal-ħġieġ b'diversi qtar tal-ilma. Imbagħad agħtti l-pinna anali b'għatu tal-ħġieġ. Ara li meta tkun qed taqbad il-pinna anali bil-pinzetta ma tobroxx il-proċessi papillari.

(4) Għodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari permezz ta' kontatur taħt mikroskopju bijoloġiku (mikroskopju wieqaf jew mikroskopju invertit). Il-proċessi papillari jingħarfu meta jkun hemm formazzjoni żgħira ta' proċessi viżibbli fuq in-naħa posterjuri tal-joint plate. Ikteb in-numru tal-patt magħqud li jkollu proċessi papillari f'kull xewka tal-pinna fuq il-worksheet (eż. l-ewwel xewka tal-pinna: 0, it-tieni xewka tal-pinna: 10, it-tielet xewka tal-pinna: 12, eċċ.) u daħħal it-total ta' dan in-numru fuq l-spreadsheet tal-Excel għal kull ħuta individwali. Jekk ikun hemm bżonn, ħu ritratt tal-pinna anali u għodd in-numru tal-*joint plate* bi proċessi papillari fuq ir-ritratt.

(5) Wara l-kejl, poġġi l-pinna anali fit-tubu koniku deskritt f'(1) u aħżnu.

Fig.1.

Dijagramma li turi differenza sesswali fil-forma u d-daqs tal-pinna anali. A, raġel; B, mara. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

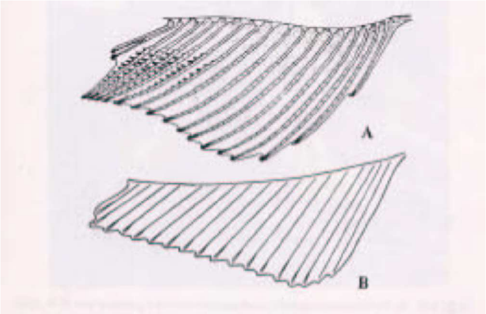


Fig.2.

A, Proċessi fuq *joint plates* ta' xewka tal-pinna anali. J.P., *joint plate*; A.S., spazju assjali; P., proċess. B, Estremità distali tax-xewka tal-pinna. L-Aktinotrikiji (Act.) qegħdin fuq il-ponta. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

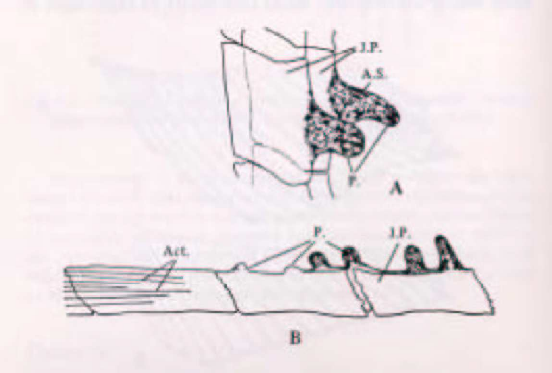
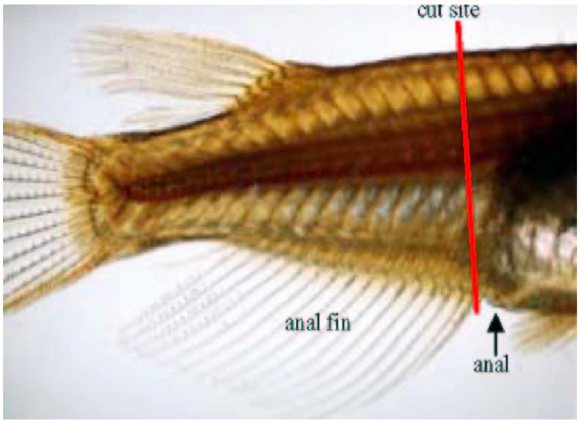


Fig.3.

Ritratt tal-ġisem ta' ħuta li juri l-post tal-qtugħ meta l-gonada tkun iffissata fis-soluzzjoni fissattiva li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata. F'dak il-każ, il-ġisem li jifdal jinqata' bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus b'xafra (strixxa ħamra), u l-parti tar-ras tal-ġisem tal-ħuta titqiegħed fis-soluzzjoni fissattiva għall-gonada u l-parti tad-denb ta' ġisem il-ħuta titqiegħed f'10 % formalina newtrali bbaferjata.



Appendiċi 6

Proċeduri rakkomandati għall-ġbir ta' kampjuni għall-analiżi tal-vitelloġenina

Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontrokontaminazzjoni bejn il-kampjuni tal-VTG tal-irġiel u tan-nisa.

Proċedura 1A: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina/Arterja Kawdali

Wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' parzjalment b'xafra tal-iskarpell u d-demm jinġabar mill-vina/arterja kawdali b'tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Wara li jinġabar id-demm, il-plażma tiġi iżolata malajr permezz ta' ċentrifugazzjoni għal 3 min f'15 000 g (jew inkella għal 10 min. f'15 000g f'temperatura ta' 4 °C). Jekk ikun mixtieq, il-persentaġġ tal-ematokrit jista' jiġi determinat wara ċ-ċentrifugazzjoni. Imbagħad il-porzjon tal-plażma jitneħħa mit-tubu mikroematokritiku u jinħażen ġo tubu ċentrifugu b'0,13-il unità ta' aprotinin (inibitur tal-proteażi) f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tista' ssir id-determinazzjoni tal-vitelloġenina. Skont id-daqs tal-karpjun buras (li jiddependi mis-sess), il-volumi tal-plażma li jistgħu jinġabru ġeneralment ivarjaw minn 5 sa 60 mikrolitru għal kull ħuta (Jensen *et al.* 2001).

Proċedura 1B: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Qalb

Inkella d-demm jista' jinġabar ukoll permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa eparinizzata (1 000 unità eparina għal kull ml). Id-demm jiġi ttrasferit f'tubi Eppendorf (miżmuma fuq is-silġ) u mbagħad jiġi ċentrifugat (5 min, 7 000 g, f'temperatura ambjentali). Il-plażma għandha tiġi ttrasferita f'tubi Eppendorf nodfa (f'alikwoti jekk il-volum tal-plażma jippermetti li dan isir) u dlonk tiġi ffriżata f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata (Panter et al., 1998).

Proċedura 2A: Medaka Ġappuniża, il-Qtugħ tal-Fwied fil-Medaka

It-tneħħija tal-ħuta tat-test mill-kompartiment tat-test

(1) Il-ħut tat-test għandu jitneħħa mill-kompartiment tat-test permezz ta' xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa (*spoon-net*). Ara li ma twaqqax il-ħut tat-test fil-kompartimenti l-oħra tat-test.

(2) Fil-prinċipju, il-ħut tat-test għandu jitneħħa fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv. Barra minn hekk, l-irġiel kollha għandhom jitneħħew minn kompartiment wieħed tat-test qabel ma jitneħħew in-nisa li jifdal.

(3) Is-sess ta' kull ħuta tat-test jiġi identifikat abbażi tal-karatteristiċi sesswali sekondarji esterni (eż. il-forma tal-pinna anali).

(4) Poġġi l-ħut tat-test f'reċipjent għat-trasport u ġorru lejn l-istazzjon tax-xogħol għall-qtugħ tal-fwied. Iċċekkja t-tikketti tal-kompartiment tat-test u tar-reċipjent tat-trasport għall-eżattezza u biex tikkonferma li l-għadd ta' ħut li jkun tneħħa mill-kompartiment tat-test u li l-għadd ta' ħut li fadal fil-kompartiment tat-test huma konsistenti ma' dak li huwa mistenni.

(5) Jekk is-sess ma jkunx jista' jiġi identifikat mid-dehra esterna tal-ħuta, neħħi l-ħut kollu mill-kompartiment tat-test. F'dan il-każ, is-sess għandi jiġi identifikat billi jiġu osservati l-gonadi jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji taħt mikroskopju sterjoskopiku.

Qtugħ tal-fwied

(1) Ittrasferixxi l-ħut tat-test mir-reċipjent biex jiġi trasportat lejn is-soluzzjoni anestetika bix-xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa.

(2) Wara li l-ħut tat-test ikun ġie anestetizzat, ittrasferixxi l-ħut tat-test fuq karta fitru (jew biċċa tal-karti) b'pinzetta (tip bażiku). Meta tkun qed iżżomm il-ħut tat-test, applika l-pinzetta fuq il-ġnub tar-ras biex tevita milli tikser id-denb.

(3) Imsaħ l-ilma fuq wiċċ il-ħuta tat-test fuq il-karta filtru (jew il-biċċa tal-karti).

(4) Poġġi l-ħut bl-addome 'l fuq. Imbagħad agħmel inċiżjoni trażversali żgħira bejn ir-reġjun ventrali tal-għonq u r-reġjun addominali tan-nofs b'imqass tad-dissezzjoni.

(5) Daħħal l-imqass tad-dissezzjoni fl-inċiżjoni ż-żgħira, u agħmel inċiżjoni fl-addome minn punt kawdali għall-*branchial mantle* għan-naħa kranjali tal-anus tul il-linja tan-nofs tal-addome. Ara li ma daħħalx l-imqass tad-dissezzjoni wisq fil-fond biex tevita milli tagħmel ħsara fil-fwied u l-gonadi.

(6) Wettaq l-operazzjonijiet li ġejjin taħt il-mikroskopju sterjoskopiku.

(7) Poġġi l-ħut tat-test bl-addome 'l fuq fuq il-biċċa tal-karti (dixx Petri tal-ħġieġ jew lastri tal-ħġieġ huma disponibbli wkoll).

(8) Estendi l-ħitan tal-kavità addominali b'pinzetta ta' preċiżjoni u oħroġ l-organi interni fuq barra. Huwa aċċettabbli wkoll li toħroġ l-organi interni fuq barra billi tneħħi naħa waħda tal-ħajt tal-kavità addominali jekk ikun meħtieġ.

(9) Esponi l-parti mqabbda tal-fwied u tal-marrara b'pinzetta oħra ta' preċiżjoni. Imbagħad aqbad il-kanal tal-bili u aqta' l-marrara barra. Ara li ma tiksirx il-marrara.

(10) Aqbad l-esofagu u bl-istess mod aqta' l-passaġġ gastrointestinali minn mal-fwied. Ara li l-kontenut tal-passaġġ gastrointestinali ma jnixxix. Aqta' l-passaġġ gastrointestinali kawdali minn mal-anus u neħħi l-passaġġ mill-kavità addominali.

(11) Ittrimmja l-massa ta' xaħam u t-tessuti l-oħrajn mill-periferija tal-fwied. Ara li ma tobroxx il-fwied.

(12) Aqbad iż-żona portali tal-fwied permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni u neħħi l-fwied mill-kavità addominali.

(13) Poġġi l-fwied fuq il-lastra tal-ħġieġ. Permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni, neħħi kwalunkwe xaħam addizzjonali u tessut estranju (eż., ir-rita addominali), jekk ikun meħtieġ, mill-wiċċ tal-fwied.

(14) Kejjel il-piż tal-fwied b'mikrotubu ta' 1,5 ml bħala tara permezz ta' miżien analitiku elettroniku. Irreġistra l-valur fuq il-worksheet (jinqara: 0,1 mg). Ikkonferma l-informazzjoni ta' identifikazzjoni fuq it-tikketta tal-mikrotubu.

(15) Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu li fih il-fwied. Żommu maħżun fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

(16) Wara l-qtugħ ta' fwied wieħed, naddaf l-istrumenti tad-dissezzjoni jew ibdilhom ma' oħrajn nodfa.

(17) Neħħi l-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport kif deskritt hawn fuq.

(18) Wara l-qtugħ tal-fwied mill-ħut kollu fir-reċipjent tat-trasport (jiġifieri l-irġiel jew in-nisa kollha f'kompartiment tat-test), poġġi l-kampjuni kollha tal-fwied fi xtilliera għat-tubi b'tikketta għall-identifikazzjoni u aħżinha fil-friża. Meta l-fwied jingħata għal pretrattament ftit wara l-qtugħ, il-kampjuni jittieħdu fl-istazzjon tax-xogħol li jmiss fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

Wara l-qtugħ tal-fwied, il-karkassa tal-ħuta tkun disponibbli għall-kejl tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

Kampjun

Aħżen il-kampjuni tal-fwied li ttieħdu mill-ħut tat-test f'temperatura ta' ≤ – 70 °C jekk ma jintużawx għall-pretrattament ftit wara l-qtugħ.

Fig-1

Qatgħa eżatt wara l-pinen pettorali bi mqass.

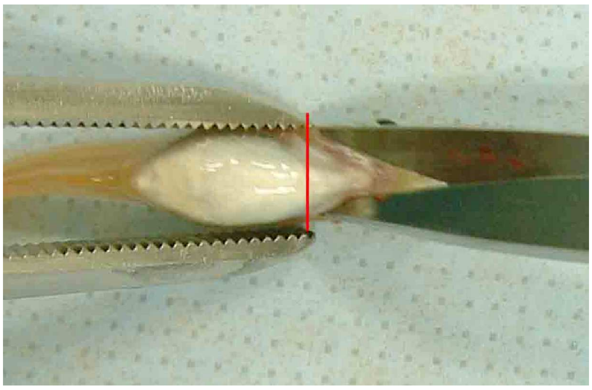


Fig-2

Inċiżjoni fil-linja tan-nofs tal-addome b'imqass sa punt madwar 2 mm kranjali għall-anu.

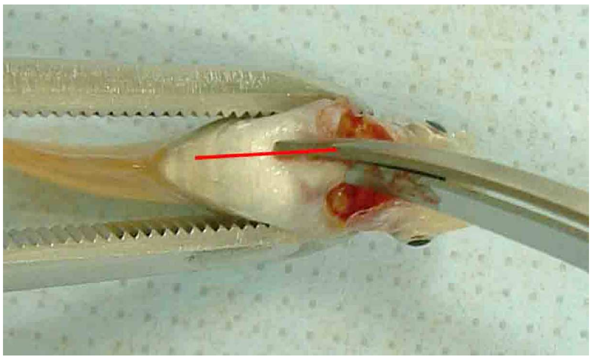


Fig-3

Il-ħitan addominali jinferqu b'forċipi biex jiġi espost il-fwied u organi interni oħra. (Inkella, il-ħitan addominali jistgħu jiġu ppinjati lateralment). Il-vleġġa turi l-fwiedOvarji

Fig-4

Il-fwied ġie dissezzjonat u jinqata' malajr bil-forċipi.

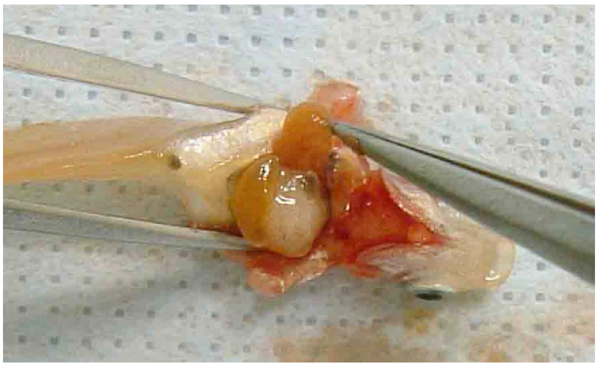


Fig-5

L-intestini jinħarġu bil-galbu permezz tal-forċipi.

Fig-6

Iż-żewġ trufijiet tal-intestini u kwalunkwe appendiċi meżenterika jinqatgħu bl-imqass.

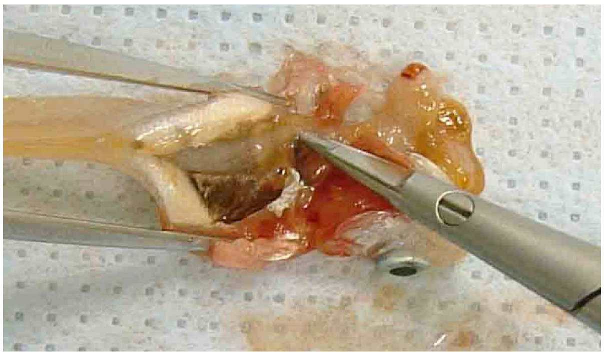


Fig-7 (mara)

Il-proċedura hija identika għall-mara.

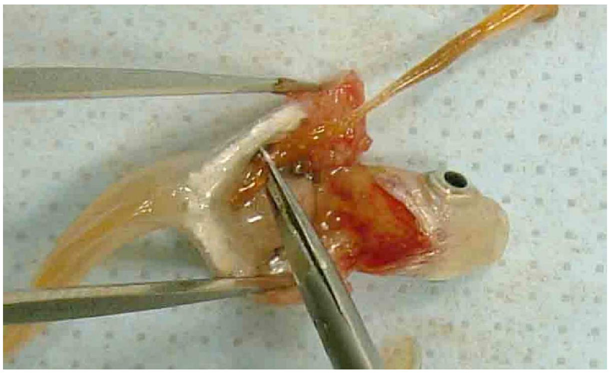
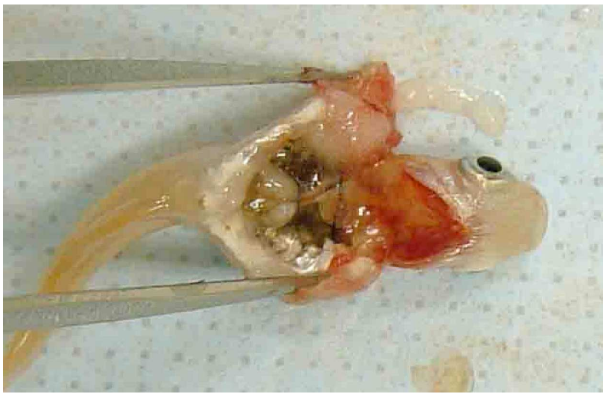


Fig-8

Il-proċedura lesta.



Proċedura 2 B: Medaka Ġappuniża (Oryzias latipes), Pretrattament tal-Fwied għall-Analiżi tal-Vitelloġenina

Ħu l-flixkun tal-bafer omoġenat mill-kitt ELISA u kesħu b'silġ imfarrak (temperatura tas-soluzzjoni: ≤ 4 °C). Jekk ikun qed jintuża bafer omoġenat mis-sistema EnBio ELISA, ħalli s-soluzzjoni toqgħod f'temperatura tal-kamra, u mbagħad kessaħ il-flixkun bis-silġ imfarrak.

Ikkalkola l-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied fuq il-bażi tal-piż tiegħu (għall-omoġenat żid 50 µl ta' bafer omoġenat għal kull mg tal-piż tal-fwied). Pereżempju, jekk il-piż tal-fwied ikun ta' 4,5 mg, il-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied ikun ta' 225 µl. Ħejji lista tal-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied kollu.

Tħejjija tal-fwied għal pretrattament

(1) Oħroġ il-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied mill-friża eżatt qabel it-trattament minn qabel.

(2) Il-pretrattament tal-fwied mill-irġiel għandu jsir qabel dak tan-nisa biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-vitelloġenina. Barra minn hekk, il-pretrattament għall-gruppi tat-test għandu jsir fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv.

(3) L-għadd ta' mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom kampjuni tal-fwied meħudin mill-friża fi żmien partikolari m'għandux jaqbeż l-għadd li jista' jiġi ċentrifugat dak il-ħin.

(4) Irranġa l-mikrotubi ta' 1,5 ml li fihom il-kampjuni tal-fwied fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq ix-xtilliera tas-silġ (m'hemmx bżonn li l-fwied jinħall).

Operazzjoni tal-pretrattament

1. Żieda tal-bafer omoġenizzanti

(1) Iċċekkja l-lista għall-volum tal-bafer omoġenat li se jintuża għal kampjun partikolari ta' fwied u aġġusta l-mikropipetta (medda tal-volum: 100-1 000 µl) sakemm jintlaħaq il-volum xieraq. Waħħal ponta nadifa mal-mikropipetta.

(2) Ħu l-bafer omoġenat mill-flixkun tar-reaġent u żid il-bafer mal-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied.

(3) Żid il-bafer omoġenat fil-mikrotubi kollha ta' 1,5 ml li jkun fihom il-fwied skont il-proċedura deskritta hawn fuq. M'hemmx bżonn li tibdel il-ponta tal-mikropipetta ma' waħda ġdida. Madanakollu, jekk il-ponta tkun kontaminata jew ikun hemm suspett li tkun kontaminata, il-ponta għandha tinbidel.

2. Omoġenizzazzjoni tal-fwied

(1) Waħħal lida ġdida għall-omoġenizzazzjoni mal-omoġenizzatur tal-mikrotubu.

(2) Daħħal il-lida fil-mikrotubu ta' 1,5 ml. Żomm l-omoġenizzatur tal-mikrotubu biex tagħfas il-fwied bejn il-wiċċ tal-lida u l-ħajt intern tal-mikrotubu ta' 1,5 ml.

(3) Ħaddem l-omoġenizzatur tal-mikrotubu għal 10 sa 20 sekonda. Matul l-operazzjoni kessaħ il-mikrotubu ta' 1,5 ml b'silġ imfarrak.

(4) Neħħi l-lida mill-mikrotubu ta' 1,5 ml u ħalliha tistrieħ għal madwar 10 sekondi. Imbagħad spezzjona viżwalment l-istat tas-sospensjoni.

(5) Jekk tara biċċiet ta' fwied fis-sospensjoni, irrepeti l-operazzjonijiet (3) u (4) biex tħejji omoġenat sodisfaċenti tal-fwied.

(6) Kessaħ l-omoġenat tal-fwied sospiż fuq l-ixtilliera tas-silġ sakemm issir iċ-ċentrifugazzjoni.

(7) Biddel il-lida ma' waħda ġdida għal kull omoġenat.

(8) Omoġenizza l-fwied kollha bil-bafer omoġenat skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

3. Ċentrifugazzjoni tal-omoġenat tal-fwied sospiż

(1) Ikkonferma li t-temperatura tal-kompartiment taċ-ċentrifugazzjoni imkessaħ tkun ta' ≤ 5 °C.

(2) Daħħal il-mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom l-omoġenat tal-fwied sospiż f'ċentrifuga mkessħa (aġġusta l-bilanċ jekk ikun hemm bżonn).

(3) Iċċentrifuga l-omoġenat tal-fwied sospiż f'13 000 g għal 10 min f'temperatura f'≤ 5 °C. Madankollu, jekk is-supernatanti ikunu ġew separati b'mod adegwat, il-forza ċentrifuga u l-ħin jistgħu jiġu aġġustati skont il-bżonn.

(4) Wara ċ-ċentrifugazzjoni, ara li s-supernatanti jkunu separati b'mod adegwat (saff tal-wiċċ: lipidu, saff intermedju: supernatant, saff tal-qiegħ: tessut tal-fwied). Jekk is-separazzjoni ma tkunx adegwata, erġa' ċċentrifuga s-sospensjoni fl-istess kondizzjonijiet.

(5) Neħħi l-kampjuni kollha miċ-ċentrifugu mkessaħ u rranġahom fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq l-ixtilliera tas-silġ. Ara li ma terġax tissospendi kull saff li jkun ġie sseparat wara ċ-ċentrifugazzjoni.

4. Il-ġbir tas-supernatant

(1) Poġġi erba' mikrotubi ta' 0,5 ml biex fihom taħżen is-supernatant fl-ixtilliera tat-tubi.

(2) Iġbor 30 μl minn kull supernatant (separat bħala s-saff intermedju) bil-mikropipetta u poġġih f'wieħed mill-mikrotubi ta' 0,5 ml. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq is-saff tal-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(3) Iġbor is-supernatant u qassmu fiż-żewġ mikrotubi l-oħra ta' 0,5 ml bl-istess mod kif deskritt hawn fuq.

(4) Iġbor il-bqija tas-supernatant bil-mikropipetta (jekk dan ikun jista' jsir: ≥ 100 μl). Imbagħad itfa' s-supernatant fil-mikrotubu ta' 0,5 ml li jifdal. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(5) Agħlaq l-għatu tal-mikrotubu ta' 0,5 ml u ikteb il-volum tas-supernatant fuq it-tikketta. Imbagħad kessaħ minnufih il-mikrotubi fuq l-ixtilliera tas-silġ.

(6) Biddel il-ponta tal-mikropipetta b'waħda ġdida għal kull supernatant. Jekk ikun hemm ammont kbir ta' lipidu mwaħħal mal-ponta, ibdilha ma' waħda ġdida minnufih biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-estratt tal-fwied bix-xaħam.

(7) Qassam is-supernatant ċentrifugat kollu f'erba' mikrotubi ta' 0,5 ml skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

(8) Wara li tkun qassamt is-supernatant fil-mikrotubi ta' 0,5 ml, poġġihom kollha fl-ixtilliera tat-tubi bit-tikketta ta' identifikazzjoni, u mbagħad iffriżahom fil-friża minnufih. Jekk il-konċentrazzjonijiet tal-VTG jitkejlu eżatt wara l-pretrattament, żomm mikrotubu wieħed ta' 0,5 ml (li fih 30 µl ta' supernatant) kiesaħ fl-ixtilliera tat-tubi u ttrasferixxih fl-istazzjon tax-xogħol fejn se jsir l-assaġġ ELISA. F'dan il-każ, poġġi l-mikrotubi li fadal fl-ixtillieri tat-tubi u ffriżahom fil-friża.

(9) Wara li tiġbor is-supernatant, armi l-fdalijiet b'mod adegwat.

Ħażna tal-kampjun

Aħżen il-mikrotubi ta' 0,5 ml li jkun fihom is-supernatant tal-omoġenat tal-fwied f'temperatura ta' ≤ – 70 °C sakemm jintużaw għall-ELISA.

Proċedura 3A: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina / Arterja Kawdali

Eżatt wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' b'mod trażversali, u d-demm jittieħed mill-vina/arterja kawdali permezz ta' tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Il-volumi tad-demm ivarjaw minn 5 sa 15 µl skont id-daqs tal-ħuta. Mat-tubu mikrokapillari jiżdied volum indaqs ta' bafer ta' aprotinin (6 µgml f'PBS), u l-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (5 minuti b'600 g). Il-plażma tinġabar fit-tubi tat-test u tinħażen f'temperatura ta' – 20 °C sakemm tiġi analizzata għall-vitelloġenina jew għal proteini oħrajn ta' interess.

Proċedura 3B: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm permezz ta' Titqiba fil-Qalb

Biex jiġi evitat milli d-demm jikkoagula u l-proteini jiddegradaw, il-kampjuni jinġabru f'bafer ta' salina b'bafer tal-Fosfat (PBS) li jkun fih eparina (1 000 unità/ml) u l-inibitur tal-proteażi aprotinin (2 TIU/ml). Bħala ingredjenti għall-bafer, huma rrakkomandati melħ tal-ammonijaka-eparina, u aprotinin lijofilizzat. Għall-kampjunar tad-demm, hija rrakkomandata siringa (1 ml) b'labra fissa rqiqa (eż. Braun Omnikan-F). Is-siringa għandha timtela minn qabel b'bafer (madwar 100 µl) biex il-volumi żgħar tad-demm minn kull ħuta jitneħħew kompletament. Il-kampjuni tad-demm jittieħdu permezz ta' titqiba fil-qalb. L-ewwel il-ħut għandu jiġi anestetizzat b'MS-222 (100 mg/l). Il-pjan xieraq ta' anestesija jippermetti sabiex l-utent jiddistingwi t-taħbita tal-qalb taż-żebra. Waqt li tkun qed ittaqqab il-qalb, żomm il-pistun tas-siringa taħt pressjoni baxxa. Il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru jvarjaw bejn 20 — 40 mikrolitru. Wara t-titqiba tal-qalb, it-taħlita tad-demm/bafer għandha tintefa' fit-tubu tat-test. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (20 min; 5 000 g) u għandha tinħażen f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tkun meħtieġa għall-analiżi.

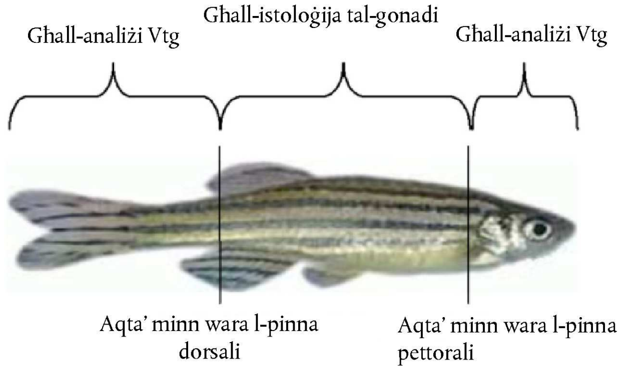
<u>Proċedura 3Ċ</u>: SOP: Żebra, l-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb

(1) Il-ħut jiġi anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

(2) Ir-ras u d-denb jinqatgħu mill-ħuta skont il-Figura 1.

Importanti: L-istrumenti kollha tad-dissezzjoni, u l-injama tat-tqattigħ għandhom jitlaħalħu u jitnaddfu sew (eż. b'96 % etanol) bejn l-immaniġġjar ta' kull ħuta biex jiġi evitat 'tniġġis tal-vitelloġenina' minn nisa jew irġiel indotti lil irġiel li ma ġewx indotti.

Figura 1



(3) Il-piż ikkombinat tar-ras u d-denb minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.

(4) Wara li jintiżnu, il-partijiet jitpoġġew f'tubi adattati (eż. Eppendorf ta' 1,5 ml) u jiġu ffriżati f'– 80 °C sakemm jiġu omoġenizzati jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistilli tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). Importanti: It-tubi għandhom jiġu enumerati sew sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu relatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istoloġija gonadali.

(5) Meta tintlaħaq massa omoġena, jiżdied bafer omoġenizzanti (*) kiesaħ silġ li jkun 4 darbiet il-piż tat-tessut. Kompli aħdem bil-pistili sakemm it-taħlita tkun omoġenja. Nota importanti: Għal kull ħuta jintużaw pistili ġodda.

(6) Il-kampjuni jitqiegħdu fuq is-silġ sakemm issir ċentrifugazzjoni f'4 °C b'50 000 × g għal 30 min.

(7) Uża pipetta biex tqassam porzjonijiet ta' 20 μl ta' supernatant f'mill-inqas żewġ tubi billi tgħaddas il-ponta tal-pipetta taħt is-saff tax-xaħam fuq il-wiċċ u tiġbed bil-mod is-supernatant mingħajr frazzjonijiet ta' xaħam jew ta' gerbub.

(8) It-tubi jinħażnu f'– 80 °C sakemm jiġu biex jintużaw.

(*) **Bafer omoġenizzanti:**
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Koktejl ta' inibituri tal-proteażi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl Koktejl ta' inibituri tal-proteażi.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) eż. minn Bie & Berntsen, id-Danimarka.
— Koktejl ta' inibituri tal-proteażi: Minn Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott P 8340.
— *Nota:* Il-bafer omoġenizzanti għandu jintuża dakinhar stess meta jiġi manifatturat. Poġġi fuq is-silġ waqt li jkun qed jintuża.

Appendiċi 7

Kampjuni b'fortifikazzjoni ta' vitelloġenina u standard ta' referenza interassaġġ

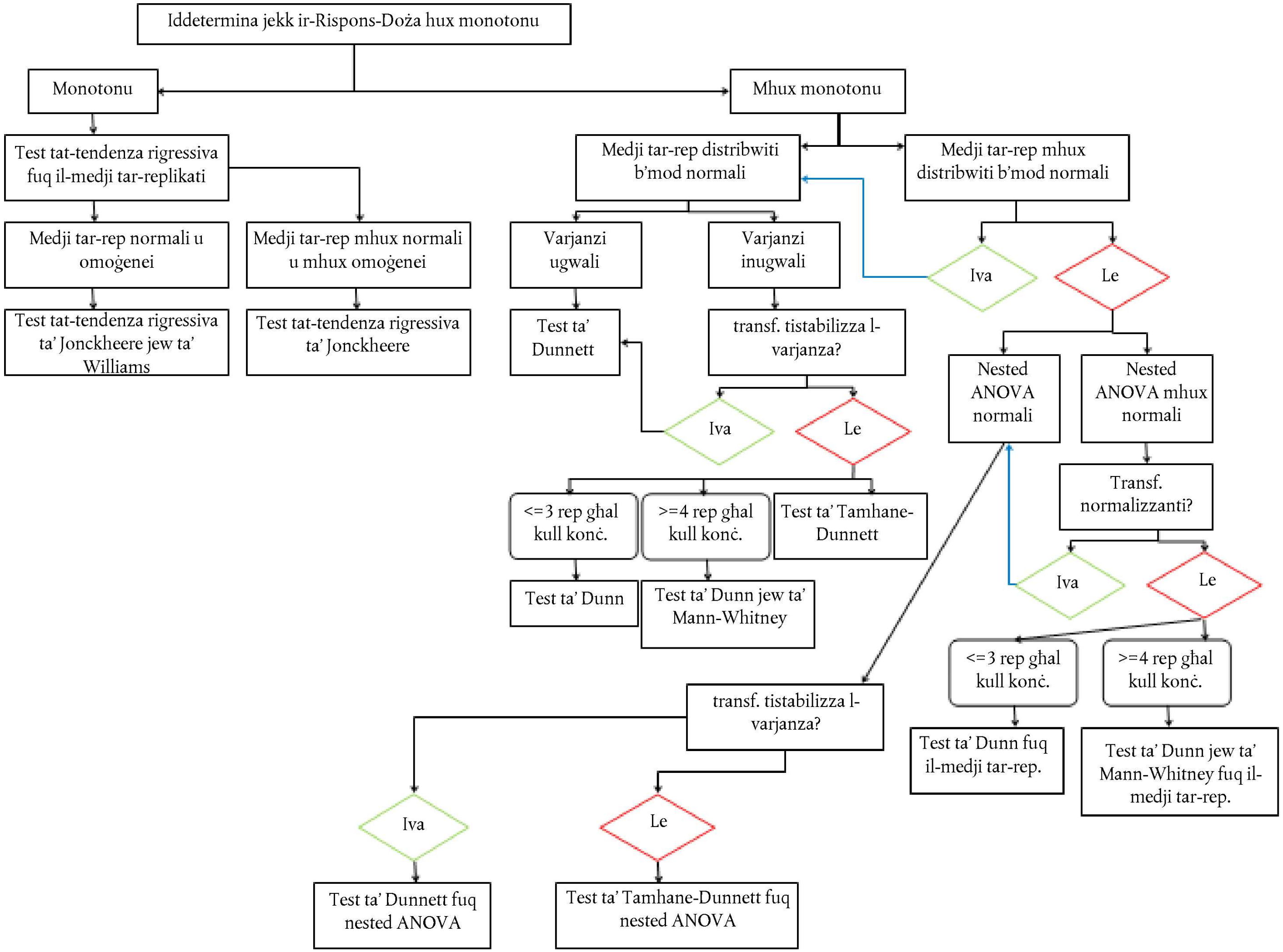
F'kull jum li jsiru l-assaġġi tal-vitelloġenina, irid jiġi analizzat kampjun taż-żieda magħmul permezz ta' standard ta' referenza interassaġġ. Il-vitelloġenina użata biex isir l-istandard ta' referenza interassaġġ għandha tkun minn lott differenti minn dak użat għat-tħejjija ta' standards tal-kalibraġġ għall-assaġġ imwettaq.

Il-kampjun taż-żieda se jittieħed billi tiżdied kwantità magħrufa tal-istandard interassaġġ ma' kampjun ta' plażma tal-irġiel tal-kontroll. Il-kampjun se jiġi miżjud sabiex tinkiseb konċentrazzjoni tal-vitelloġenina bejn 10 u 100 darba l-konċentrazzjoni mistennija tal-vitelloġenina tal-ħut maskili ta' kontroll. Il-kampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll li huwa miżjud jista' jittieħed minn ħuta waħda jew jista' jkun ġej minn diversi ħut.

Sottokampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll mhux miżjuda se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati. Il-kampjun miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati wkoll. Il-kwantità medja tal vitelloġenina fiż-żewġ kampjuni tal-plażma mhux miżjuda tal-irġiel tal-kontroll tiżdied mal-kwantità kkalkolata tal-vitelloġenina miżjuda maż-żieda tal-kampjuni biex tiġi determinata konċentrazzjoni mistennija. Il-proporzjon ta' din il-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla ser jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

Appendiċi 8

Flowchart deċiżjonali għall-analiżi statistika



C.38. L-ASSAĠĠ TAL-METAMORFOSI TAL-AMFIBJI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 231 tal-OECD (2009). Il-ħtieġa ta' żvilupp u validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati ġejja mit-tħassib fuq il-fatt li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkaġunaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organiżmi slavaġ. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi t-TGs eżistenti u tiżviluppa TGs ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi potenzjali li jfixklu s-sistema endokrinali. Element tal-attività kien li tiġi żviluppata TG għat-tgħarbil tas-sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati. Ġew proposti kemm tisħiħ tal-Istudju dwar it-tossiċità b'doża orali ripetuta ta' 28 jum (Kapitlu B.7 ta' dan l-Anness) kif ukoll l-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA). Il-metodu ta' ttestjar imsaħħaħ B.7 ġie vvalidat u nħareġ metodu ta' ttestjar rivedut. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) ġie soġġett għal programm estensiv ta' validazzjoni li kien jinkludi studji intra u interlaboratorji li wrew ir-relevanza u l-affidabilità tal-assaġġ (1, 2). Imbagħad, il-validazzjoni tal-assaġġ ġiet soġġetta għal evalwazzjoni bejn il-pari minn panil ta' esperti indipendenti (3). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-riżultat tal-esperjenza miksuba matul l-istudji ta' validazzjoni għall-identifikazzjoni tas-sustanzi attivi fit-tirojde, u tal-ħidma mwettqa fi mkejjen oħra f'pajjiżi membri tal-OECD.

PRINĊIPJU TAT-TEST

2. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) huwa assaġġ ta' tgħarbil maħsub sabiex jidentifika b'mod empiriku dawk is-sustanzi kimiċi li jistgħu jfixklu mal-funzjoni normali tal-assi ipotalamiku-pitwitarju-tirojde (HPT). L-AMA jirrappreżenta mudell iġġeneralizzat tal-vertebrati sal-punt li huwa bbażat fuq l-istrutturi u l-funzjonijiet miżmumin tal-assi HPT. Huwa assaġġ importanti għaliex il-metamorfosi tal-amfibji tipprovdi proċess studjat sew li jiddependi fuq it-tirojde li jirrispondi għal sustanzi kimiċi attivi fi ħdan l-assi HPT, u huwa l-uniku assaġġ eżistenti li jidentifika attività fit-tirojde f'annimal li jkun għaddej minn żvilupp morfoloġiku.

3. Id-disinn sperimentali ġenerali jinvolvi l-espożizzjoni ta' mrieżeb *Xenopus laevis* fl-istadju 51 għal minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet differenti ta' sustanza kimika tat-test u kontroll tal-ilma ta' dilwizzjoni għal 21 jum. Hemm erba' rreplikati ta' kull trattament tat-test. Id-densità tal-larva fil-bidu tat-test hija ta' 20 marżebba għal kull tank tat-test għall-gruppi kollha tat-trattament. Il-punti ta' tmiem osservazzjonali huma t-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL), l-istadju ta' żvilupp, il-piż imxarrab, l-istoloġija tat-tirojde, u osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċijiet tat-Test

4. *Xenopus laevis* hija kkolturata b'rutina f'laboratorji madwar id-dinja u faċli tinkiseb mingħand fornituri kummerċjali. Ir-riproduzzjoni malajr tista' tiġi indotta f'din l-ispeċi tul is-sena billi jintużaw tilqimiet tal-gonadotrofina korjonika umana (hCG) u l-larva li tirriżulta tista' titrabba b'rutina sal-istadji ta' żvilupp magħżulin f'numri kbar biex ikunu jistgħu jintużaw protokolli tat-testijiet speċifiċi għall-istadju. Idealment il-larva użata fl-assaġġ tinġieb minn adulti mrobbijin fl-istess post. Għad li din mhijiex il-proċedura ideali, hemm l-alternattiva li l-bajd jew l-embriji jistgħu jintbagħtu lil-laboratorju li jagħmel it-test u jitħallew iderru; mhuwiex aċċettabbli li jintbagħtu stadji ta' larva għall-użu fit-test.

Tagħmir u Provvisti

5. It-tagħmir u l-provvisti li ġejjin huma meħtieġa sabiex isir dan l-assaġġ:

a) Sistema ta' espożizzjoni (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);

b) Akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);

c) Tankijiet għat-tgħammir;

d) Apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda (aġġustabli sa 22° ± 1 °C));

e) Termometru;

f) Mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari;

g) Kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u mikrofunzjoni;

h) Software għad-diġitizzazzjoni tal-istampi;

i) Dixx petri (eż. 100 × 15 mm) jew kompartiment tal-plastik trasparenti ta' daqs paragunabbli;

j) Miżien analitiku li kapaċi jkejjel sa 3 punti deċimali (mg);

k) Metru tal-ossiġenu dissolt;

l) Metru tal-pH;

m) Metru tal-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;

n) Għodod u oġġetti tal-ħġieġ mixxelanji tal-laboratorju;

o) Pipetti aġġustabbli (10 sa 5 000 µl) jew pipetti varji ta' daqsijiet ekwivalenti;

p) Sustanza kimika tat-test f'biżżejjed kwantitajiet sabiex isir l-istudju, idealment lott waħda;

q) Strumentizzazzjoni analitika xierqa għas-sustanza kimika tat-test jew servizzi analitiċi kkuntrattati.

Testabilità tas-Sustanza Kimika

6. L-AMA huwa bbażat fuq protokoll ta' espożizzjoni milwiema li bih is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fil-kompartimenti tat-test permezz ta' sistema bi fluss kontinwu. Madankollu, il-metodi bi fluss kontinwu jġibu magħhom restrizzjonijiet fuq it-tipi ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jiġu ttestjati, kif stabbilit mill-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika. Għaldaqstant, qabel ma jintuża dan il-protokoll għandha tinkiseb informazzjoni tax-xenarju bażi dwar is-sustanza kimika li tkun relevanti sabiex tiġi stabbilita t-testabilità, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akwatika ta' Sustanzi u Taħlitiet Diffiċli (4). Il-karatteristiċi li jindikaw li s-sustanza kimika tista' tkun diffiċli li tiġi ttestjata f'sistemi akkwatiċi jinkludu: koeffiċjenti għoljin ta' partizzjoni ottanol/ilma (log K_{ow}), volatilità għolja, suxxettibilità għal idroliżi, u suxxettibilità għal fotoliżi f'kundizzjonijiet ta' dawl tal-laboratorju ambjentali. Sabiex tiġi stabbilita t-testabilità jista' jkun hemm fatturi relevanti oħrajn, li għandhom jiġu stabbiliti fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk ma jkunx possibbli li tintuża b'suċċess sistema ta' ttestjar bi fluss kontinwu għas-sustanza kimika, tista' tithaddem sistema ta' tiġdid statiku. Jekk l-ebda sistema ma tkun kapaċi takkomoda s-sustanza kimika tat-test, f'dak il-każ l-għażla predefinita hija li ma tiġix ittestjata billi jintuża dan il-protokoll.

Sistema ta' Espożizzjoni

7. Sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu hija ppreferita, meta tkun possibbli, meta mqabbla ma' sistema ta' tiġdid statiku. Jekk karatteristiċi fiżiċi u/jew kimiċi ta' xi waħda mis-sustanzi kimiċi tat-test ma jkunux adattati għal sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu, f'dak il-każ tista' tintuża sistema ta' espożizzjoni alternattiva (eż., b'tiġdid statiku). Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli u/jew tal-Politetrafluworoetilen. Madankollu, jistgħu jintużaw materjali xierqa tal-plastik jekk ma jkunux ta' xkiel għall-istudju. It-tankijiet ta' espożizzjoni għandhom ikunu akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli mgħammrin b'pajpijiet wiqfin li jirriżultaw f'volum tat-tank ta' bejn 4,0 u 10,0 l u fond minimu tal-ilma ta' bejn 10 u 15-il cm. Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni kollha u kontroll, b'erba' rreplikati għal kull trattament. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont kemm liż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-espożizzjoni kimika (eż. 25 ml/min). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' espożizzjoni sabiex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inklużi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, eċċ. Għandu jintuża dawl fluworexxenti sabiex jiġi pprovut fotoperjodu ta' 12-il siegħa dawl: 12-il siegħa dlam b'intensità li tvarja bejn 600 u 2 000 lux (lumen/m²) f'wiċċ l-ilma. It-temperatura tal-ilma għandha tinżamm fi 22° ± 1 °C, il-pH tinżamm bejn 6,5 u 8,5, u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % tas-saturazzjoni tal-arja) f'kull tank tat-test. Tal-inqas, it-temperatura tal-ilma, il-pH u l-ossiġenu dissolt għandhom jitkejlu darba fil-ġimgħa; idealment it-temperatura titkejjel b'mod kontinwu f'tal-inqas reċipjent wieħed tat-test. L-Appendiċi 1 jispjega l-kundizzjonijiet sperimentali li fihom għandu jiġi eżegwit il-protokoll. Għal iktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' espożizzjoni bi fluss kontinwu u/jew sistemi ta' tiġdid statiku, jekk jogħġbok irreferi għall-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossiċità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Ħut, Makroinvertebrati, u Amfibji (5) u testijiet tat-tossokoloġija akkwatika ġenerali.

Kwalità tal-ilma

8. Jista' jintuża kwalunkwe ilma li huwa disponibbli lokalment (eż. ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat għall-karbonju) u li jippermetti tkabbir u żvilupp normali tal-imrieżeb. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn żona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija ta' *Xenopus*. Għandha tingħata attenzjoni speċjali għall-fatt li l-ilma jkun ħieles minn ram, kloru u kloramini, li kollha huma tossiċi għal żrinġijiet u mrieżeb. Huwa rrakkomandat ukoll li jiġi analizzat l-ilma fid-dawl tal-livelli ta' sfond ta' fluworur, perkolat u klorat (prodotti sekondarji tad-diżinfezzjoni tal-ilma tajjeb għax-xorb) peress li dawn l-anjoni kollha huma substrati tat-trasportatur tal-jodju tal-glandola tat-tirojde u livelli għoljin ta' kull wieħed minn dawn l-anjoni jista' jfixkel l-eżitu tal-istudju. Għandha ssir analiżi qabel ma jibdew it-testijiet u, normalment, l-ilma tat-testijiet għandu jkun ħieles minn dawn l-anjoni.

Konċentrazzjoni ta' Jodur fl-Ilma tat-Test

9. Sabiex il-glandola tat-tirojde tissintetizza t-TH, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' taħlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bħalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata b'mod empiriku għal konċentrazzjonijiet minimi ta' jodur. Madankollu, id-disponibilità tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hija magħrufa li timmodula l-attività tal-bażi tal-glandola tat-tirojde, aspett li jisthoqqlu attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Għaldaqstant, għandhom jiġu rrapportati l-konċentrazzjonijiet tal-jodur milwiema mkejlin mill-ilma tat-test. Fuq il-bażi tad-dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni, intwera li l-protokoll jaħdem sew meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur tal-ilma tat-test (I^-) varjaw bejn 0,5 u 10 µg/l. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma tat-test għandha tkun ta' 0,5 µg/l. Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 µg/l. Kwalunkwe suppliment addizzjonali tal-ilma tat-test bil-jodju jew melħiet oħrajn għandu jitniżżel fir-rapport.

Żamma tal-annimali

Tgħammir u Indukrar tal-Adulti

10. It-tgħammir u l-indukrar tal-adulti jsiru skont il-linji gwida standard u huwa ssuġġerit li l-qarrej jaqra l-gwida standard għat-twettiq tal-Assaġġ tat-Teratoġenesi tal-Embriji taż-Żrinġijiet (FETAX) (6) għal iktar informazzjoni ddettaljata. It-tali linji gwida standard jipprovdu eżempju ta' metodi xierqa ta' indukrar u tgħammir, iżda ma hemmx bżonn ta' aderenza stretta. Biex jiġi pprovokat it-tgħammir, pari (3-5) ta' nisa adulti u rġiel jiġu injettati b'gonadotrofina korjonika umana (hCG). L-eżemplari nisa u rġiel huma injettati b'madwar 800 IU-1 000 IU u 600 IU-800 IU, rispettivament, ta' hCG dissolta f'soluzzjoni salmastra ta' 0,6-0,9 % Il-pari għat-tgħammir jinżammu f'tankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiċi sabiex tiġi promossa l-amplessi. Il-qiegħ ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qiegħ falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli jew tal-plastik li jippermetti sabiex il-mases tal-bajd jaqgħu f'qiegħ it-tank. Iż-żrinġijiet injettati iktar tard waranofsinhar normalment jiddepożitaw ħafna mill-bajd tagħhom sa nofs il-għodwa tal-għada. Wara li tinħeles u tiġu ffertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir.

Indukrar u Għażla tal-Larva

11. Wara li l-adulti jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir, il-bajd jinġabar u jiġi evalwat għall-vijabbiltà billi jintuża subsett rappreżentattiv tal-embriji mit-tankijiet kollha tat-tgħammir. L-aħjar bajd individwali tal-ħut (irrakkomandati 2-3 biex tiġi evalwata l-kwalità tal-bajd tal-ħut) għandu jinżamm fuq il-bażi tal-vijabbiltà tal-embriji u l-preżenza ta' numru adegwat (tal-inqas 1 500) ta' embriji. L-organiżmi kollha użati fi studju għandhom ikunu ġejjin minn avveniment ta' riproduzzjoni wieħed (jiġifieri l-bajd ma għandux ikun komħallat). L-embriji huma ttrasferiti f'dixx jew taġen ċatt kbir u l-bajd ovvju mejjet jew anormali (ara d-definizzjoni f'(5)) jitneħħa bl-użu ta' pipetta jew kontagoċċi. L-embriji b'saħħithom minn kull wieħed minn dawn l-avvenimenti ta' riproduzzjoni jiġu ttrasferiti fi tliet tankijiet separati għat-tifqis. Erbat ijiem wara li jitqiegħed fit-tankijiet għat-tifqis, jingħażel l-aħjar bajd, fuq il-bażi tal-vijabilità u s-suċċess tat-tifqis, u l-larva tiġi ttrasferita f'numru xieraq ta' tankijiet tat-trobbija fi 22° ± 1 °C. Barra minn hekk, ċerta larva addizzjonali titqiegħed f'tankijiet żejda sabiex tintuża bħala sostituta f'każ li jmutu wħud fit-tankijiet tat-trobbija matul l-ewwel ġimgħa. Din il-proċedura żżomm densità konsistenti tal-organiżmi u b'hekk tnaqqas id-diverġenza fl-iżvilupp fi ħdan il-koorta ta' avveniment wieħed ta' riproduzzjoni. It-tankijiet kollha tat-trobbija għandhom jitbattlu u jitnaddfu kuljum. Bħala prekawzjoni, huma ppreferuti ngwanti tal-vinil jew tan-nitril u mhux ingwanti tal-latex. Il-mortalitajiet għandhom jitneħħew ta' kuljum u għandha tiżdied il-larva ta' sostituzzjoni sabiex tinżamm id-densità tal-organiżmi matul l-ewwel ġimgħa. It-tmigħ għandu jsir tal-inqas darbtejn kuljum.

12. Matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, l-imrieżeb iderru fil-kundizzjonijiet tal-fażi propja ta' espożizzjoni, inklużi t-tip ta' ikel, it-temperatura, iċ-ċiklu ta' dawl-dlam u l-midjum għall-koltura. Għaldaqstant, huwa rrakkomandat li jintuża l-istess ilma tal-koltura/dilwizzjoni matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni u l-fażi ta' espożizzjoni. Jekk tintuża sistema ta' koltura statika għaż-żamma tal-imrieżeb matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, il-midjum għall-koltura għandu jitbiddel kompletament tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa. Iffullar, ikkaġunat minn densitajiet għoljin ta' larva matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, għandu jiġi evitat għaliex it-tali effetti jistgħu jaffetwaw mhux ftit l-iżvilupp tal-imrieżeb matul il-fażi sussegwenti ta' ttestjar. Għaldaqstant, id-densità tat-trobbija ma għandhiex taqbeż bejn wieħed u ieħor l-erba' mrieżeb/l midjum għall-koltura (sistema ta' espożizzjoni statika) jew l-10 imrieżeb/l midjum għall-koltura (b'eż. rata ta' fluss ta' 50 ml/min fis-sistema ta' qabel l-espożizzjoni jew tal-koltura). F'dawn il-kundizzjonijiet, l-imrieżeb għandhom jiżviluppaw mill-istadji 45/46 sal-istadju 51 fi żmien tnax-il jum. L-imrieżeb rappreżentattivi ta' din il-popolazzjoni tal-istokkijiet għandhom jiġu spezzjonati kuljum għall-istadju ta' żvilupp sabiex jiġi stmat il-punt ta' żmien xieraq għall-bidu tal-espożizzjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu mminimizzati l-istress u t-trawma għall-imrieżeb, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni tal-larva. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet/attivitajiet ta' stress bħal ħsejjes storbjużi u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, vibrazzjonijiet fl-akkwarji, attività żejda fil-laboratorju, u bidliet rapidi fil-midjums ambjentali (disponibilità ta' dawl, temperatura, pH, DO, rati tal-fluss tal-ilma, eċċ.) Jekk l-imrieżeb ma jiżviluppawx sal-istadju 51 fi żmien 17-il jum wara l-fertilizzazzjoni, stress eċċessiv għandu jitqies bħala kaġuni potenzjali.

Koltura u Tmigħ tal-Larva

13. L-imrieżeb jintemgħu, pereżempju, b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni (ara l-appendiċi 1 ukoll) matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni (wara l-istadju 45/46 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (8)) u matul il-perjodu sħiħ tat-test ta' 21 jum, jew dieta oħra li wriet li tilħaq prestazzjoni ekwivalenti bħall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji. Ir-reġim tat-tmigħ matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni għandu jiġi aġġustat bir-reqqa biex jissodisfa l-ħtiġijiet tal-imrieżeb li qed jiżviluppaw. Jiġifieri, għandhom jiġu pprovduti porzjonijiet żgħar ta' ikel lill-imrieżeb li faqqsu bosta drabi kuljum (tal-inqas darbtejn). Ikel żejjed għandu jiġi evitat sabiex *i)* tinżamm il-kwalità tal-ilma u *ii)* jiġi evitat milli jinstaddu l-filtri tal-garġi b'partikoli u frak tal-ikel. Għall-għalf tal-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni, il-porzjonijiet tal-ikel ta' kuljum għandhom jiżdiedu flimkien mat-tkabbir tal-imrieżeb għal madwar 30 mg/annimali/jum ftit qabel jinbeda t-test. Fl-istudji ta' validazzjoni ntwera li dan l-għalf kummerċjalment disponibbli jsostni t-tkabbir u l-iżvilupp xierqa ta' mrieżeb *X. laevis*, u huwa magħmul minn partikoli fini li jibqgħu sospiżi fil-kolonna tal-ilma għal perjodu twil ta' żmien u huwa soġġett li joħroġ mal-fluss. Għaldaqstant, l-ammont totali ta' ikel ta' kuljum għandu jinqasam f'porzjonijiet żgħar u jingħata tal-inqas darbtejn kuljum. Għal dan it-tmigħ, ir-reġim tat-tmigħ huwa spjegat fit-Tabella 1. Ir-rati tat-tmigħ għandhom jiġu rreġistrati. Jista' jintema' xott jew bħala soluzzjoni ewlenija mħejjija f'ilma ta' dilwizzjoni. Soluzzjoni ewlenija bħal din għandha titħejja ġdida kull jumejn u tinħażen f'4 °C meta ma tintużax.

Tabella 1.

Ir-reġim tat-tmigħ b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni għal imrieżeb X. *laevis* matul il-porzjon tul il-ħajja tal-AMA f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu

Jum tal-Istudju	Proporzjon tal-ikel (mg għalf/annimal/jum)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Kimika Analitika

14. Qabel ma jsir studju, għandha tiġi evalwata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test billi tintuża l-informazzjoni eżistenti dwar is-solubilità, id-degradabilità u l-volatilità tagħha. Is-soluzzjonijiet tat-test minn kull tank irreplikat f'kull konċentrazzjoni għandhom jiġu kampjunati għal analiżijiet kimiċi analitiċi fil-bidu tat-test (jum 0), u kull ġimgħa matul it-test għal tal-inqas erba' kampjuni. Huwa rrakkomandat ukoll li kull konċentrazzjoni tat-test tiġi analizzata matul it-tħejjija tas-sistema, qabel jibda t-test, sabiex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Barra minn hekk, huwa rrakkomandat li s-soluzzjonijiet ewlenin jiġu analizzati meta jinbidlu, speċjalment jekk il-volum tas-soluzzjoni ewlenija ma jipprovdix ammonti adegwati tas-sustanza kimika biex iservu għad-durata tal-perjodi ta' kampjunar ta' rutina. Fil-każ ta' sustanzi kimiċi li ma jistgħux jiġu identifikati f'uħud mill-konċentrazzjonijiet użati f'test jew f'kollha kemm huma, is-soluzzjonijiet ewlenin għandhom jitkejlu u r-rati tal-fluss tas-sistema għandhom jiġu rreġistrati sabiex jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet nominali.

Twassil tas-Sustanza Kimika

15. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fis-sistema jista' jvarja skont il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha. Sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alikwoti tal-ilma tat-test f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluss kontinwu. Sustanzi kimiċi li huma likwidi f'temperatura ambjentali u ftit li xejn jinħallu fl-ilma jistgħu jiddaħħlu bl-użu ta' likwidu: metodi ta' saturatur tal-likwidi. Sustanzi kimiċi li huma solidi f'temperatura ambjentali u li ftit li xejn jinħallu fl-ilma jistgħu jiddaħħlu bl-użu ta' saturaturi tal-kolonna tal-ħġieġ f'forma ta' fibri (7). Idealment tintuża sistema tat-test mingħajr trasportatur, iżda sustanzi kimiċi tat-test differenti ser ikollhom karatteristiċi fiżikokimiċi diversi li aktarx ser ikunu jeħtieġu approċċi differenti għat-tħejjija ta' ilma ta' espożizzjoni kimika. Aħjar isir sforz sabiex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: *i)* ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew risponsi endokrinoloġiċi mhux mistennija jew mhux mixtieqa, *ii)* l-ittestjar tas-sustanzi kimiċi 'il fuq mis-solubilità tal-ilma tagħhom (kif spiss jista' jseħħ meta jintużaw solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, u *iii)* l-użu ta' solventi f'testijiet iktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad importanti ta' 'biofilming' assoċjat ma' attività mikrobika. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, jista' jintuża solvent bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akkwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli (4) sabiex jiġi stabbilit l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent ser tiġi stabbilita mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Solventi li nstab li huma effettivi għall-ittestjar tat-tossiċità akkwatika inkluż l-aċetun, l-etanol, il-metanol, id-dimetilformamid u t-trietilen glikol. Jekk jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet tas-solvent għandhom ikunu inqas mill-Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC) kronika; id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 μl/l; reviżjoni riċenti tirrakkomanda li jintużaw konċentrazzjonijiet tas-solvent li jinżlu sa 20μl/l ilma ta' dilwizzjoni (12). Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli xierqa tas-solvent minbarra kontrolli mhux tas-solvent (ilma nadif). Jekk mhuwiex possibbli li sustanza kimika tiddaħħal bl-ilma, jew minħabba l-karatteristiċi fiżikokimiċi (solubilità baxxa) jew id-disponibilità kimika limitata, jista' jiġi kkunsidrat li tiġi introdotta mal-ikel. Saret ħidma preliminari fuq espożizzjonijiet djetetiċi; madankollu, din ir-rotta ta' espożizzjoni ma tintużax spiss. L-għażla tal-metodu għandha tiġi ddokumentata u vverifikata b'mod analitiku.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

Stabbiliment tal-Konċentrazzjoni Għolja tat-Test

16. Għall-finijiet ta' dan it-test, il-konċentrazzjoni għolja tat-test għandha tiġi stabbilita permezz tal-limitu tas-solubilità tas-sustanza kimika tat-test; il-konċentrazzjoni massima ttollerata (MTC) għal sustanzi kimiċi b'tossiċità akuta; jew 100 mg/l, liema minnhom ikun l-inqas.

17. L-MTC hija ddefinita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li tirriżulta f'mortalità akuta ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li hemm dejta empirika eżistenti dwar il-mortalità akuta li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC jaf ma tkunx preċiża u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali. Għad li l-użu ta' mudelli ta' rigressjoni jista' jkun l-iktar approċċ teknikament validu sabiex tiġi stmata l-MTC, approssimazzjoni siewja tal-MTC tista' tinkiseb mid-dejta akuta eżistenti billi jintuża terz mill-valur tal-LC_{50} akuta. Madankollu, id-dejta dwar it-tossiċità akuta tista' tkun nieqsa għall-ispeċijiet tat-test. Jekk ma jkunx hemm dejta dwar it-tossiċità akuta speċifika għall-ispeċi disponibbli, jista' jsir test tal-LC_{50} fuq 96 siegħa b'imrieżeb li jirrappreżentaw (jiġifieri li huma fl-istess stadju) lil dawk tat-test fl-AMA. Jekk hemm dejta minn speċijiet akkwatiċi oħrajn disponibbli (eż. studji tal-LC_{50} f'ħut jew speċijiet amfibji oħrajn), huwa possibbli li jintuża ġudizzju professjonali sabiex tiġi stmata MTC probabbli fuq il-bażi ta' estrapolazzjoni bejn l-ispeċijiet.

18. Inkella, jekk is-sustanza kimika ma tkunx jkollhiex tossiċità akuta u tkun tinħall f'iktar minn 100 mg/l, f'dak il-każ il-100 mg/l għandha titqies l-ogħla konċentrazzjoni tat-test (HTC), peress li din il-konċentrazzjoni tipikament titqies 'prattikament mhux tossika.'

19. Għad li mhumiex il-proċedura rrakkomandata, jistgħu jintużaw metodi ta' tiġdid statiku meta l-metodu ta' fluss kontinwu ma jkunux adegwati biex jiksbu l-MTC. Jekk jintużaw metodi ta' tiġdid statiku, f'dak il-każ l-istabbiltà tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ddokumentata u tibqa' fi ħdan il-limiti tal-kriterji tal-prestazzjoni. Huma rrakkomandati perjodi ta' tiġdid kull erbgħa u għoxrin siegħa. Perjodi ta' tiġdid li jaqbżu t-72 siegħa mhumiex aċċettabbli. Barra minn hekk, il-parametri tal-kwalità tal-ilma (eż. id-DO, it-temperatura, il-pH, eċċ.) għandhom jitkejlu fi tmiem kull perjodu ta' tiġdid, eżatt qabel it-tiġdid.

Medda tal-Konċentrazzjoni tat-Test

20. Hemm *minimu* meħtieġ ta' tliet konċentrazzjonijiet tat-test u kontroll tal-ilma nadif (u kontroll tal-veikolu jekk hemm bżonn). Id-differenzjali minima tal-konċentrazzjoni tat-test bejn l-ogħla u l-inqas għandha tkun ta' madwar ordni ta' kobor wieħed. Is-separazzjoni tad-doża massima hija ta' 0,1 u l-minimu huwa 0,33.

PROĊEDURA

Bidu u Twettiq tat-Test

Jum 0

21. L-espożizzjoni għandha tinbeda meta jkun hemm numru biżżejjed ta' mrieżeb fil-popolazzjoni tal-istokk ta' qabel l-espożizzjoni li laħqu l-istadju 51 tal-iżvilupp, skont Nieuwkoop and Faber (8), u li għandhom età ta' 17-il jum jew inqas wara l-fertilizzazzjoni. Għall-għażla tal-annimali tat-test, imrieżeb b'saħħithom u normali mill-popolazzjoni tal-istokk għandhom jinġabru f'reċipjent wieħed li fih volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, l-imrieżeb għandhom jitneħħew wieħed, wieħed mit-tank tar-raggruppament billi jintużaw xibka żgħira jew passatur u jiġu ttrasferiti f'kompartiment tal-kejl trasparentI (eż. dixx Petri ta' 100 mm) li fih ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju, idealment ma tintużax anesteżija, iżda l-imrieżeb jistgħu jiġu anestetizzati wieħed, wieħed bl-użu ta' 100 mg/l trikaina metansulfonat (eż. MS-222), ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju (pH 7,0), qabel it-trasferiment. Jekk tintuża, il-metodoloġija għall-użu xieraq ta', eż., MS-222 għall-anesteżija għandha tinkiseb mingħand laboratorji tal-esperjenza u tiġi rrapportata mar-riżultati tat-testijiet. L-annimali għandhom jitneħħew b'attenzjoni matul dan it-trasferiment sabiex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress tat-trasferiment u jiġi evitat milli jweġġgħu.

22. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali huwa stabbilit billi jintuża mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari. Biex titnaqqas il-varjabbiltà finali fl-istadju tal-iżvilupp, importanti li s-sejbien tal-istadju jsir bl-ikbar preċiżjoni possibbli. Skont Nieuwkoop and Faber (8), it-tragward primarju tal-iżvilupp għall-għażla tal-organiżmi fl-istadju 51 huwa l-morfoloġija tas-sieq ta' wara. Il-karatteristiċi morfoloġiċi tas-saqajn ta' wara għandhom jiġu mixtarra taħt il-mikroskopju. Filwaqt li għandha tiġi kkonsultata l-gwida sħiħa ta' Nieuwkoop and Faber (8) għal informazzjoni komprensiva dwar is-sejbien tal-istadji tal-imrieżeb, l-istadju jista' jiġi stabbilit b'mod affidabbli billi jintużaw tragwardi morfoloġiċi prominenti. Tista' tintuża t-tabella li ġejja sabiex jiġi ssimplifikat u standardizzat il-proċess ta' sejbien tal-istadju matul l-istudju billi jiġu identifikati dawk it-tragwardi morfoloġiċi prominenti assoċjati ma' stadji differenti, jekk jiġi supponut żvilupp normali.

Tabella 2.

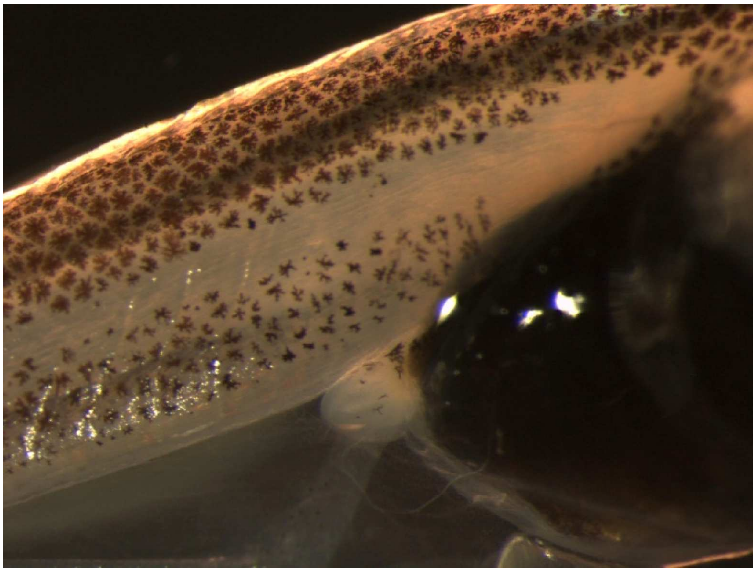
Tragwardi morfoloġiċi prominenti fis-sejbien tal-istadju fuq il-bażi tal-gwida ta' Nieuwkoop and Faber.

Tragwardi Morfoloġiċi Prominenti.	Stadju tal-Iżvilupp															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Sieq ta' Wara	X	X	X	X	X	X	X									
Saqajn ta' Quddiem						X	X	X	X	X						
Struttura tal-kranju tal-wiċċ										X	X	X	X			
Morfoloġija tan-nerv olfattiv											X	X	X			
Tul tad-denb													X	X	X	X

23. X L-iktar tragward morfoloġiku prominenti fis-sejbien tal-istadju għal dak l-istadju huwa l-morfoloġija tas-sieq ta' wara, li jintwera fil-Figura 1.

Figura 1.

Il-morfoloġija tas-sieq ta' wara ta' marżebba X. laevis tal-istadju 51.



24. Minbarra l-għażla tal-istadju tal-iżvilupp, tista' tintuża għażla fakultattiva tad-daqs tal-annimali sperimentali. Għal dan il-għan, it-tul sħiħ tal-ġisem (mhux l-SVL) għandu jitkejjel fil-jum 0 għal subkampjun ta' madwar 20 marżebba tal-istadju 51 ta' NF. Wara li jiġi kkalkolat it-tul medju tal-ġisem sħiħ għal dan il-grupp ta' annimali, jistgħu jiġu stabbiliti l-limiti minimi u massimi għat-tul tal-ġisem sħiħ tal-annimali sperimentali f'medda tal-valur medju ± 3 mm (il-valuri medji tal-medda tat-tul tal-ġisem sħiħ bejn 24,0 u 28,1 mm għal imrieżeb tal-istadju 51). Madankollu, is-sejbien tal-istadju tal-iżvilupp huwa l-parametru primarju sabiex jiġi stabbilit kemm huwa lest kull annimal tat-test. Imrieżeb li juru sfigurazzjonijiet jew korrimenti viżibbli mill-ewwel għandhom jiġu esklużi mill-assaġġ.

25. Imrieżeb li jissodisfaw il-kriterji tal-istadju deskritti hawn fuq jinżammu f'tank mimli ilma nadif tal-koltura sakemm jitlesta l-proċess tas-sejbien tal-istadju. Ladarba jitlesta s-sejbien tal-istadju, il-larva tiġi distribwita għal għarrieda għal tankijiet tat-trattament ta' espożizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 larva. Imbagħad, kull tank tat-trattament jiġi spezzjonat għal annimali b'dehra anormali (eż., korrimenti, imġiba anormali meta jgħumu, eċċ.). Imrieżeb li jidher biċ-ċar li ma jkunux b'saħħithom għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-trattament u jinbidlu ma' larva magħżula ġdida mit-tank tar-raggruppament.

Osservazzjonijiet

26. Għal iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri ta' tmiem it-test u l-ipproċessar tal-imrieżeb, irreferi għad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istoloġija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

Kejliet tal-Jum 7

27. Fil-jum 7, minn kull tank tat-test jitneħħew ħames imrieżeb magħżulin għal għarrieda għal kull irreplikat. Il-proċedura għal għarrieda użata għandha tagħti lil kull organiżmu tat-test probabilità ndaqs li jingħażel. Dan jista' jinkiseb billi jintuża kwalunkwe metodu ta' għażla għal għarrieda iżda jeħtieġ li kull marżebba tinqabad bix-xibka. L-imrieżeb magħżulin jitreġġgħu lura fit-tank ta' oriġini u l-imrieżeb magħżulin jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż., MS-222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju sabiex tinkiseb pH 7,0. L-imrieżeb ewtanizzati jitlaħalħu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. It-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-imnieħer sal-anus, u l-istadju tal-iżvilupp (bl-użu ta' mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari) jiġu stabbiliti għal kull marżebba.

Kejliet tal-Jum 21 (Tmiem it-Test)

28. Fi tmiem it-test (jum 21), l-imrieżeb li jifdal jitneħħew mit-tankijiet tat-test u jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż. MS 222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju, kif spjegat iktar 'il fuq. L-imrieżeb jitlaħilħu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. L-istadju tal-iżvilupp, l-SVL, u t-tul tas-sieq ta' wara jitkejlu għal kull marżebba.

29. Il-larva kollha titqiegħed f'fissattiv ta' Davidson għal 48 sa 72 siegħa jew bħala kampjuni tal-ġisem sħiħ jew bħala kampjuni tat-tessut tar-ras maqtugħ li fihom ix-xedaq ta' isfel għal valutazzjonijiet istoloġiċi. Għal istopatoloġija, b'kollox għandhom jiġu kkampjunati ħames imrieżeb minn kull tank irreplikat. Peress li l-għoli taċ-ċelloli tal-follikoli jiddependi mill-istadju (10), l-iktar approċċ xieraq tal-kampjunar għall-analiżijiet istoloġiċi huwa li jintużaw individwi mqabblin mal-istadju, kull meta dan ikun possibbli. Sabiex jintgħażlu individwi mqabblin mal-istadju, l-ewwel irid jinstab l-istadju tal-larva kollha qabel l-għażla u l-ipproċessar sussegwenti għall-preservazzjoni u l-ġbir tad-dejta. Dan huwa neċessarju għaliex diverġenza normali fl-iżvilupp tirriżulta f'distribuzzjonijiet differenzjali tal-istadji f'kull tank irreplikat.

30. L-annimali magħżulin għal istopatoloġija (n = 5 minn kull irreplikat) għandhom jitlaqqgħu mal-istadju medju tal-kontrolli (l-irreplikati raggruppati) kull meta dan ikun possibbli. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'iktar minn ħames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-każ il-ħames larva jintgħażlu għal għarrieda.

31. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'inqas minn ħames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-każ l-individwi magħżulin mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandhom jiġu kampjunati sabiex jintlaħaq daqs totali tal-kampjun ta' ħames larva għal kull irreplikat. Idealment, id-deċiżjoni ta' kampjunar ta' larva addizzjonali mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandha tittieħed fuq il-bażi ta' evalwazzjoni ġenerali tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti ta' kontroll u kimiċi. Jiġifieri, jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp tardiv, għandu mbagħad jittieħed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju inferjuri li jmiss. Iżda jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp mgħaġġel, għandu jittieħed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju superjuri li jmiss.

32. F'każijiet ta' alterazzjonijiet serji fl-iżvilupp tal-imrieżeb minħabba trattament b'sustanza kimika tat-test, ma jistax ikun hemm sovrapożizzjoni tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti kimiċi fuq l-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll ikkalkolat. F'dawn il-każijiet biss, il-proċess tal-għażla għandu jiġi mmodifikat billi jintuża stadju differenti mill-istadju medju ta' kontroll sabiex jinkiseb kampjunar imqabbel mal-istadju tal-larva għal istopatoloġija tat-tirojde. Barra minn hekk, jekk l-istadji huma indeterminati (jiġifieri asinkronija), f'dak il-każ għandhom jingħażlu 5 imrieżeb għal għarrieda minn kull irreplikat għal analiżi istoloġika. Għandha tiġi rrapportata r-raġuni għall-kampjunar ta' kwalunkwe larva li mhijiex fi stadju ekwivalenti għall-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll.

Determinazzjoni tal-Punti ta' Tmiem Bijoloġiċi

33. Matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-jum 21, il-kejl tal-punti ta' tmiem primarji jsir fil-jiem 7 u 21, madankollu hemm bżonn li l-annimali tat-test jiġu osservati kuljum. It-Tabella 3 tagħti ħarsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-kejl u l-punti ta' żmien tal-osservazzjoni korrispondenti. Hemm iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri tekniċi għall-kejl tal-punti ta' tmiem apikali u l-valutazzjonijiet istoloġiċi disponibbli fid-dokumenti ta' gwida tal-OECD (9).

Tabella 3.

Punti ta' żmien tal-osservazzjoni għal punti ta' tmiem primarji fl-AMA.

Punti ta' Tmiem Apikali	Kuljum	Jum 7	Jum 21
— Mortalità	•		
— Stadju tal-Iżvilupp		•	•
— Tul tas-Sieq ta' Wara		•	•
— Tul mill-Imnieħer sal-Anus		•	•
— Piż tal-Ġisem Imxarrab		•	•
— Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde			•

Punti ta' Tmiem Apikali

34. L-istadju tal-iżvilupp, it-tul tas-sieq ta' wara, l-SVL u l-piż imxarrab huma l-punti ta' tmiem apikali tal-AMA, u kull wieħed minnhom huwa diskuss fil-qosor hawn taħt. Hemm iktar informazzjoni teknika għall-ġbir ta' din id-dejta disponibbli fid-dokumenti ta' gwida referenzjati, inklużi proċeduri għal analiżi assistita bil-kompjuter li huma rrakkomandati għall-użu.

L-Istadju tal-Iżvilupp

35. L-istadju tal-iżvilupp ta' mrieżeb X. *laevis* jiġi stabbilit bl-użu tal-kriterji tas-sejbien tal-istadju ta' Nieuwkoop and Faber (8). Id-dejta dwar l-istadju tal-iżvilupp tintuża sabiex jiġi stabbilit jekk liżvilupp huwiex mgħaġġel, asinkroniku, tardiv jew mhux affettwat. Żvilupp mgħaġġel jew tardiv huwa stabbilit billi jsir paragun bejn l-istadju medju miksub mill-grupp ta' kontroll u dak ittrattat. Żvilupp asinkroniku huwa rrapportat meta t-tessuti eżaminati ma jkunux sfigurati jew anormali, iżda t-twaqqit relattiv tal-morfoġenesi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti jkun imfixkel fi ħdan marżebba waħda.

It-Tul tas-Sieq ta' Wara

36. Differenzazzjoni u tkabbir tas-sieq ta' wara huma taħt il-kontroll tal-ormoni tat-tirojde u huma tragwardi kbar tal-iżvilupp li diġà huma użati meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp. L-iżvilupp tas-sieq ta' wara jintuża b'mod kwalitattiv meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, iżda hawnhekk jitqies bħala punt ta' tmiem kwantitattiv. Għaldaqstant, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel bħala punt ta' tmiem sabiex jiġu identifikati l-effetti fuq l-assi tat-tirojde (Figura 2). Għal konsistenza, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel fuq is-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara jiġi evalwat fil-jum 7 u fil-jum 21 tat-test. Fil-jum 7, il-kejl tas-sieq ta' wara huwa sempliċi, kif muri fil-Figura 2. Madankollu, il-kejl tat-tul tas-sieq ta' wara fil-jum 21 huwa iktar ikkumplikat minħabba liwjiet fis-sieq. Għaldaqstant, il-kejliet tas-sieq ta' wara fil-jum 21 għandhom jibdew mir-rita ta' barra tal-ġisem u jsegwu l-linja medjana tas-sieq u jibqgħu għaddejjin minn kwalunkwe devjazzjoni fl-angoli. Bidliet fit-tul tas-sieq fil-jum 7, anki jekk ma jkunux evidenti fil-jum 21, xorta waħda jitqiesu sinifikanti għal attività potenzjali tat-tirojde. Il-kejliet tat-tul jinkisbu minn ritratti diġitali bl-użu ta' software ta' analiżi tal-immaġnijiet kif spjegat fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istoloġija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

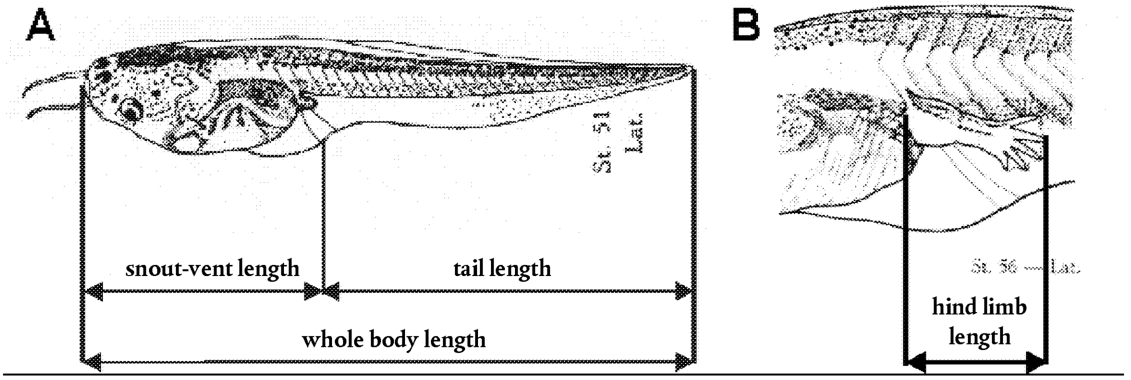
It-Tul tal-Ġisem u l-Piż Imxarrab

37. Il-kalkoli tat-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL) (Figura 2) u l-piż imxarrab huma inklużi fil-protokoll tat-test sabiex jiġu vvalutati l-effetti possibbli tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata tat-tkabbir tal-imrieżeb meta mqabblin mal-grupp ta' kontroll u huma siewja sabiex tinstab it-tossiċità ġeneralizzata għas-sustanza kimika tat-test. Peress li t-tneħħija tal-ilma aderenti għall-kalkoli tal-piż tista' tikkaġuna kundizzjonijiet stressanti għall-imrieżeb u tista' tikkaġuna ħsara fuq il-ġilda, dawn il-kejliet isiru fuq l-imrieżeb tas-subkampjun tal-jum 7 u l-imrieżeb kollha li jifdal fi tmiem it-test (jum 21). Għal konsistenza, uża l-aspett kranjali tal-anus bħala l-limitu inferjuri tal-kejl.

38. It-tul mill-imnieħer sal-anus (SVL) jintuża biex jiġi vvalutat kemm kibret il-marżebba kif muri fil-Figura 2.

Figura 2.

(A) It-tipi ta' kejliet tat-tul tal-ġisem u (B) Il-kejliet tat-tul tas-sieq ta' wara għal imrieżeb X. laevis (1).



Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde

39. Filwaqt li l-istadju tal-iżvilupp u t-tul tas-sieq ta' wara huma punti ta' tmiem importanti biex jiġu evalwati bidliet marbutin mal-espożizzjoni fl-iżvilupp metamorfiku, żvilupp tardiv, minnu nnifsu, ma jistax jitqies bħala indikatur djanjostiku ta' attività antitirojde. Ċerti bidliet jistgħu jiġu osservati biss permezz ta' analiżi istopatoloġika ta' rutina. Il-kriterji djanjostiċi jinkludu ipertrofija/atrofija tal-glandola tat-tirojde, ipertrofija taċ-ċelloli follikolari, iperplażja taċ-ċelloli follikolari, u bħala kriterji kwalitattivi addizzjonali: żona tal-lumen follikolari, kwalità tal-kollojde u tul/forma taċ-ċelloli follikolari. Għandu jiġi rrapportat il-grad tas-severità (4 gradi). Informazzjoni dwar il-kisba u l-ipproċessar ta' kampjuni għal analiżi istoloġika u għat-twettiq ta' analiżijiet istoloġiċi fuq kampjuni ta' tessuti hija disponibbli fl-'Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 1 — Gwida teknika għall-kampjunar morfoloġiku u t-tħejjija istoloġika' u 'Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 2 — Approċċ għall-qari ta' studji, kriterji djanjostiċi, klassifikazzjoni tas-severità u atlas' (9). Laboratorji li jagħmlu l-assaġġ għall-ewwel darba/drabi għandhom ifittxu pariri mingħand patoloġisti tal-esperjenza għal skopijiet ta' taħriġ qabel ma jagħmlu analiżi istoloġika u evalwazzjoni tal-glandola tat-tirojde. Bidliet kbar u sinifikanti fil-punti ta' tmiem apikali li jindikaw żvilupp mgħaġġel jew asinkronija jistgħu jipprekludu l-ħtieġa li ssir analiżi istopatoloġika tal-glandoli tat-tirojde. Madankollu, nuqqas ta' bidliet morfoloġiċi ċari jew evidenza ta' żvilupp tardiv huma motivi validi għal analiżijiet istoloġiċi.

Mortalità

40. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu vverifikati kuljum għal imrieżeb mejtin u n-numri jridu jiġu rreġistrati għal kull tank. Għandhom jitniżżlu d-data, il-konċentrazzjoni u n-numru tat-tank għal kwalunkwe osservazzjoni tal-mortalità. L-annimali mejtin għandhom jitneħħew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. Rati tal-mortalità li jaqbżu l-10 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi tas-sustanza kimika tat-test.

Osservazzjonijiet Addizzjonali

41. Każijiet ta' mġiba anormali u sfigurazzjonijiet u leżjonijiet li jidhru mill-ewwel għandhom jiġu rreġistrati. Id-data, il-konċentrazzjoni u n-numru tat-tank għandhom jiġu rreġistrati għal kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba anormali, sfigurazzjonijiet jew leżjonijiet kbar. Imġiba normali hija kkaratterizzata minn imrieżeb sospiżi fil-kolonna tal-ilma bid-denb 'il fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tlugħ perjodiku fil-wiċċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wiċċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wiċċ, u ma tantx ikunu risponsivi għall- istimoli. Barra minn hekk, għandu jinżamm rekord tad-differenzi gross fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (eż. deformitajiet tas-saqajn), leżjonijiet emorraġiċi, infezzjonijiet batterjali jew fungali, li huma biss ftit minnhom. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali ta' kontroll. Jekk l-okkorrenza jew ir-rata ta' okkorrenza tkun ikbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ dawn għandhom jitqiesu bħala evidenza għal tossiċità kbira.

DEJTA U RAPPORTAR

Ġbir ta' Dejta

42. Id-dejta kollha għandha tinġabar bl-użu ta' sistemi elettroniċi jew manwali li jikkonformaw ma' prattiki tajbin tal-laboratorju (GLP). Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Is-sustanza kimika tat-test:

— Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: karatteristiċi fiżikokimiċi; informazzjoni fuq l-istabbiltà u l-bijodegradabilità;

— Informazzjoni u dejta dwar is-sustanza kimika: metodu u frekwenza tal-preparazzjoni ta' dilwizzjonijiet. L-informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test tinkludi konċentrazzjonijiet propji u nominali tas-sustanza kimika tat-test, u f'xi każijiet, sustanza kimika mhux oriġinarja, kif xieraq. Il-kejliet tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jkunu meħtieġa għal soluzzjonijiet ewlenin kif ukoll għal soluzzjonijiet tat-test;

— Solvent (jekk mhuwiex ilma): ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent, u karatterizzazzjoni tas-solvent (għamla, konċentrazzjoni użata);

Kundizzjonijiet tat-test:

— Rekords operazzjonali: dawn jikkonsistu f'osservazzjonijiet li jappartjenu għat-tħaddim tas-sistema tat-test u l-ambjent u l-infrastruttura ta' sostenn. Ir-rekords tipiċi jinkludu: temperatura ambjentali, temperatura tat-test, fotoperjodu, status tal-komponenti kritiċi tas-sistema ta' espożizzjoni (eż. pompi, ċiklometri, pressjonijiet), rati tal-fluss, livelli tal-ilma, bidliet tal-flixkun tal-istokkijiet, u rekords dwar it-tmigħ. Il-parametri ġenerali tal-kwalità tal-ilma jinkludu: pH, DO, kondottività, jodju totali, alkalinità u l-ebusija;

— Devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar: din l-informazzjoni għandha tinkludi kwalunkwe informazzjoni jew deskrizzjoni narrattiva ta' devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar;

Riżultati:

— Osservazzjonijiet u dejta bijoloġiċi: dawn jinkludu osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità, konsum ta' ikel, imġiba anormali tal-għawm, letarġija, telf ta' ekwilibriju, sfigurazzjonijiet, leżjonijiet, eċċ. Osservazzjonijiet u dejta miġburin f'intervalli prestabbiliti jinkludu: stadju tal-iżvilupp, tul tas-sieq ta' wara, tul mill-imnieħer sal-anus, u l-piż imxarrab;

— Tekniki analitiċi statistiċi u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati; riżultati tal-analiżi statistika, idealment f'forma ta' tabella;

— Dejta istoloġika: dawn jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi, kif ukoll il-punteġġi tas-severità u l-inċidenza kklassifikati tal-osservazzjonijiet speċifiċi, kif spjegati fid-dokument ta' gwida dwar l-istopatoloġija;

— Osservazzjonijiet ad hoc: dawn l-osservazzjonijiet għandhom jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi tal-istudju li ma joqogħdux fil-kategoriji deskritti qabel.

Rapportar tad-dejta

43. L-Appendiċi 2 fih spreadsheets tal-ġbir ta' dejta ta' kuljum li jistgħu jintużaw bħala gwida għat-tidħil tad-dejta mhux ipproċessata u għall-kalkoli ta' statistiki sommarji. Barra minn hekk, huma pprovduti tabelli tar-rapportar li huma konvenjenti għall-komunikazzjoni ta' sommarji ta' dejta dwar il-punti ta' tmiem. It-tabelli ta' rapportar għal valutazzjonijiet istoloġiċi jistgħu jinstabu fl-Appendiċi 2.

Kriterji tal-Prestazzjoni u Aċċettabilità/Validità tat-Test

44. Ġeneralment, devjazzjonijiet kbar mill-metodu ta' ttestjar ser iwasslu għal dejta mhux aċċettabbli għall-interpretazzjoni jew ir-rapportar. Għaldaqstant, il-kriterji li ġejjin fit-Tabella 4 ġew żviluppati bħala gwida sabiex tiġi stabbilita l-kwalità tat-test imwettaq, il-prestazzjoni ġenerali tal-organiżmi ta' kontroll.

Tabella 4.

Il-kriterji ta' prestazzjoni għall-AMA.

Kriterju	Limiti aċċettabbli
Konċentrazzjonijiet tat-test	Miżmuma f'≤ 20 % CV(varjabbiltà tal-konċentrazzjoni tat-test imkejla) tul it-test ta' 21 jum
Mortalità fil-kontrolli	≤ 10 % — il-mortalità fi kwalukwe rreplikat minnhom fil-kontrolli ma għandhiex taqbeż iż-2 imrieżeb
L-istadju tal-iżvilupp medju minimu tal-kontrolli fi tmiem it-test	57
Il-firxa tal-istadju tal-iżvilupp fil-grupp ta' kontroll	L-10 u d-90 perċentil tad-distribuzzjoni tal-istadju tal-iżvilupp ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn 4 stadji
Ossiġenu Dissolt	≥ 40 % saturazzjoni tal-arja (*)

Kriterju	Limiti aċċettabbli
pH	il-pH għandha tinżamm bejn 6,5-8,5. Id-differenzjali interreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5.
Temperatura tal-ilma	22° ± 1 °C — id-differenzjali interreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5 °C
Konċentrazzjonijiet tat-test mingħajr tossiċità ċara	≥ 2
Prestazzjoni tal-irreplikati	≤ 2 irreplikati fit-test jistgħu jkunu f'riskju
Kundizzjonijiet speċjali għall-użu ta' solvent	Jekk jintuża solvent trasportatur, għandu jintuża kemm kontroll tas-solvent kif ukoll kontroll tal-ilma nadif u r-riżultati għandhom jiġu rrapportati
	Differenzi statistikament importanti bejn il-kontroll tas-solvent u l-gruppi ta' kontroll tal-ilma huma ttrattati b'mod separat. Ara iktar 'il quddiem għal iktar informazzjoni
Kundizzjonijiet speċjali għas-sistema ta' tiġdid statiku	Għandhom jiġu rrapportati l-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi rappreżentattivi qabel u wara t-tiġdid
	Il-livelli tal-ammonijaka għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-parametri kollha tal-kwalità tal-ilma elenkati fit-Tabella 1 tal-Appendiċi 1 għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-perjodu ta' tiġdid ma għandux jaqbeż it-72 siegħa
	L-iskeda xierqa tat-tmigħ (50 % tal-proporzjon tal-ikel ta' kuljum tal-għalf kummerċjali tal-imrieżeb) (*)

(*) L-ossiġenazzjoni tal-ilma tista' tinkiseb b'apparati baqbieqa. Huwa rrakkomandat li l-apparati baqbieqa jiġu stabbiliti f'livelli li ma joħolqux stress żejjed għall-imrieżeb.

Validità tat-Test

45. Ir-rekwiżiti li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati sabiex test jitqies aċċettabbli/validu:

Esperiment validu f'test stabbilit bħala negattiv għall-attività tat-tirojde:

(1) Għal kwalunkwe trattament partikolari (inklużi kontrolli), il-mortalità ma tistax taqbeż l-10 %. Għal kwalunkwe rreplikat partikolari, il-mortalità ma tistax taqbeż it-tliet imrieżeb, inkella l-irreplikat jitqies li huwa f'riskju

(2) Tal-inqas żewġ livelli tat-trattament, bl-erba' rreplikati mhux f'riskju kollha, għandhom ikunu disponibbli għal analiżi

(3) Tal-inqas żewġ livelli mingħajr tossiċità kbira għandhom ikunu disponibbli għal analiżi

Esperiment validu f'test stabbilit bħala pożittiv għal attività tat-tirojde:

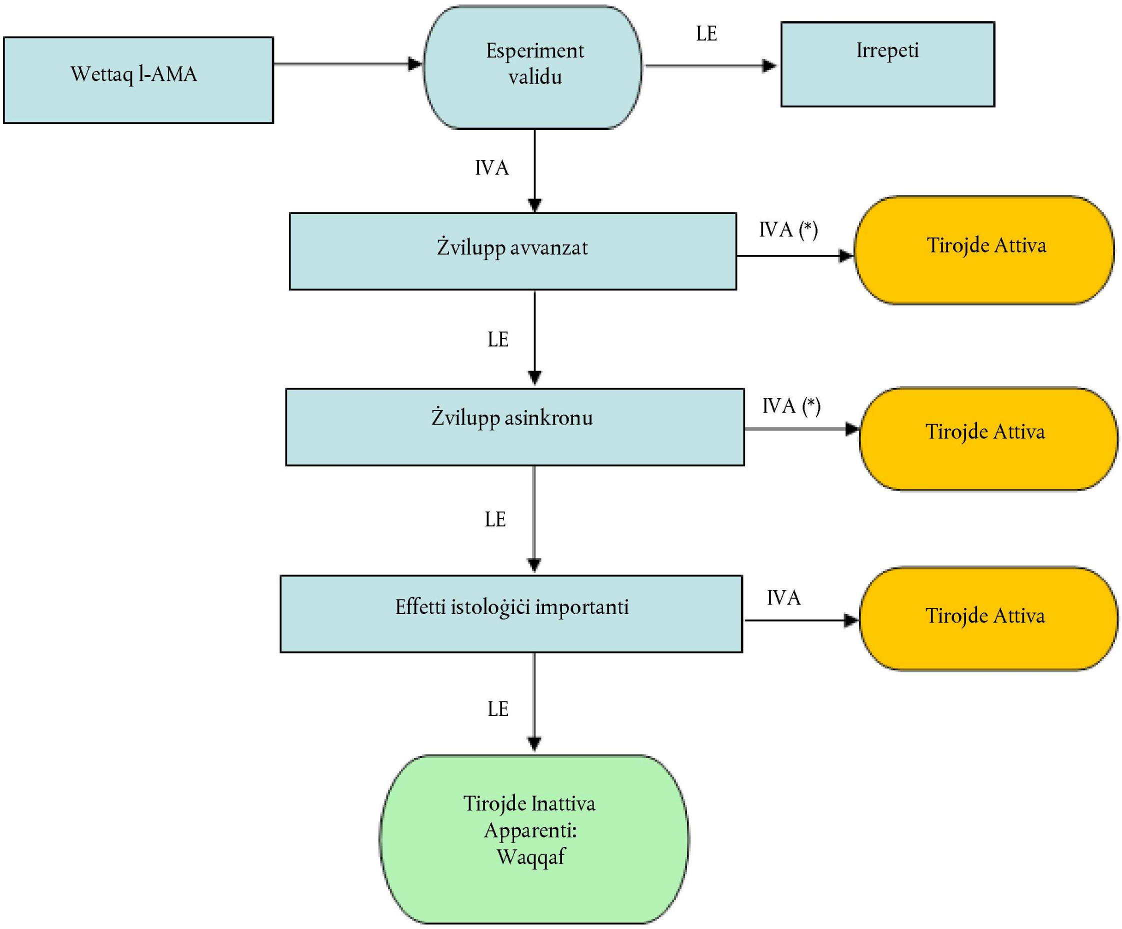
(1) Il-mortalità ta' mhux iktar minn żewġ imrieżeb/irreplikati fil-grupp ta' kontroll tista' sseħħ

Loġika wara d-deċiżjoni għat-twettiq tal-AMA

46. Il-loġika wara d-deċiżjoni ġiet żviluppata għall-AMA sabiex tingħata assistenza loġika fit-twettiq u l-interpretazzjoni tar-riżultati tal-bijoassaġġ (ara l-flowchart fil-Figura 3). Essenzjalment, il-loġika wara d-deċiżjoni tixtarr il-punti ta' tmiem f'dak l-iżvilupp avvanzat, l-iżvilupp asinkroniku u l-istopatoloġija tat-tirojde jingħataw ponderazzjoni importanti, filwaqt li l-iżvilupp tardiv, it-tul mill-imnieħer sal-anus u l-piż tal-ġisem imxarrab, parametri li għandhom il-potenzjal li jkunu affettwati mit-tossiċità ġenerali, jingħataw ponderazzjoni inqas importanti.

Figura 3.

Il-loġika wara d-deċiżjoni għat-twettiq tal-AMA.



(*) L-istoloġija tista' tkun meħtieġa minn ċerti awtoritajiet regolatorji minkejja differenzi importanti fl-iżvilupp avvanzat u asinkroniku. L-entità li tagħmel dan it-test hija mħeġġa tikkonsulta lill-awtoritajiet meħtieġa qabel tagħmel it-test sabiex tistabbilixxi liema punti ta' tmiem huma meħtieġa.

Żvilupp avvanzat (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-HLL)

47. L-iżvilupp avvanzat huwa magħruf li jseħħ biss bl-effetti li huma relatati mal-ormon tat-tirojde. Dawn jistgħu jkunu effetti tat-tessut periferali bħal interazzjoni diretta mar-riċettur tal-ormon tat-tirojde (bħal bit-T4) jew effetti li jibdlu l-livelli tal-ormon tat-tirojde ċirkolanti. Ikun xi jkun il-każ, dan jitqies bħala prova biżżejjed li tindika li s-sustanza kimika għandha attività fit-tirojde. L-iżvilupp avvanzat huwa evalwat b'mod wieħed minn tnejn. L-ewwel, l-istadju tal-iżvilupp ġenerali jista' jiġi evalwat billi jintuża l-approċċ standardizzat spjegat f'Nieuwkoop and Faber (8). It-tieni, karatteristiċi morfoloġiċi speċifiċi jistgħu jiġu kkwantifikati, bħat-tul tas-sieq ta' wara, fil-jum 7 u 21, li għandu assoċjazzjoni pożittiva mal-effetti agonistiċi fuq ir-riċettur tal-ormon tat-tirojde. Jekk isiru avvanzi statistikament sinifikanti fl-iżvilupp jew fit-tul tas-sieq ta' wara, f'dak il-każ it-test jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde.

48. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp mgħaġġel b'rabta mal-popolazzjoni ta' kontroll ser tkun imsejsa fuq ir-riżultati ta' analiżijiet statistiċi mwettqin għall-erba' punti ta' tmiem li ġejjin:

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 7 tal-istudju

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 21 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 7 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 21 tal-istudju

49. L-analiżijiet statistiċi tat-tul tas-sieq ta' wara għandhom isiru fuq il-bażi tal-kejliet tat-tul tas-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara huwa normalizzat billi jittieħed il-proporzjon tat-tul tas-sieq ta' wara għat-tul mill-imnieħer għall-anus ta' individwu. Imbagħad titqabbel il-medja tal-valuri normalizzati għal kull livell tat-trattament. Imbagħad, l-aċċelerazzjoni tal-iżvilupp tiġi indikata minn żieda importanti fit-tul medju tas-sieq ta' wara (normalizzat) fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju (ara l-Appendiċi 3).

50. L-analiżijiet statistiċi tal-istadju tal-iżvilupp għandhom isiru fuq il-bażi tal-istabbiliment tal-istadji tal-iżvilupp skont il-kriterji morfoloġiċi deskritti minn Nieuwkoop and Faber (8). Żvilupp mgħaġġel huwa indikat meta l-analiżi multikwantali ssib żieda importanti fil-valuri tal-istadju tal-iżvilupp fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju.

51. Fil-metodu ta' ttestjar tal-AMA, effett importanti fuq kwalunkwe wieħed mill-erba' punti ta' tmiem imsemmijin hawn fuq jitqies biżżejjed għal identifikazzjoni pożittiva ta' żvilupp mgħaġġel. Jiġifieri, effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien speċifiku ma jeħtiġux li jiġu korroborati minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilupp f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Min-naħa tagħhom, effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilpp f'punt ta' żmien speċifiku ma jeħtiġux li jiġu korroborati minn effetti importanti fl-istadju tal-iżvilupp f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Il-piż tal-evidenza għall-iżvilupp mgħaġġel xorta waħda ser jiżdied jekk jinstabu effetti importanti għal iktar minn punt ta' tmien wieħed.

Żvilupp asinkroniku (stabbilit bl-użu ta' kriterji tal-istadju tal-iżvilupp)

52. L-iżvilupp asinkroniku huwa kkaratterizzat minn tfixkil tat-twaqqit relattiv tal-morfoġenesi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti fi ħdan marżebba individwali. In-nuqqas ta' ħila li jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp ta' organiżmu bl-użu tal-firxa ta' punti ta' tmiem morfoloġiċi meqjusin tipiċi ta' kwalunkwe stadju partikolari jindika li t-tessuti qed jiżviluppaw b'mod asinkroniku bil-metamorfożi. L-iżvilupp asinkroniku huwa indikatur ta' attività fit-tirojde. L-uniċi modalitajiet magħrufin ta' azzjoni li jikkaġunaw żvilupp asinkroniku huma permezz tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fuq azzjoni tal-ormon tat-tirojde periferali u/jew metaboliżmu tal-ormon tat-tirojde fl-iżvilupp ta' tessuti kif inhu osservat b'inibituri tad-dejodinażi.

53. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp asinkroniku relatat mal-popolazzjoni tal-kontroll ser tkun ibbażata fuq valutazzjoni morfoloġika gross tal-annimali tat-test fil-jum 7 tal-istudju u fil-jum 21 tal-istudju.

54. Id-deskrizzjoni tal-iżvilupp normali tal-*Xenopus laevis* minn Nieuwkoop and Faber (8) tipprovdi l-qafas għall-identifikazzjoni ta' ordni sekwenzjali tar-rimodellar tat-tessut normali. It-terminu 'żvilupp asinkroniku' jirreferi

b'mod speċifiku għal dawk id-devjazzjonijiet fl-iżvilupp morfoloġiku gross tal-imrieżeb li ma jippermettux li jiġi stabbilit b'mod definittiv stadju tal-iżvilupp skont il-kriterji ta' Nieuwkoop and Faber (8) għaliex tragwardi morfoloġiċi importanti juru karatteristiċi ta' stadji differenti.

55. Kif jimplika t-terminu 'żvilupp asinkroniku', huma biss każijiet li juru devjazzjonijiet fil-progress ta' mmudellar mill-ġdid tat-tessuti speċifiċi relatati mal-progress tal-immudellar mill-ġdid ta' tessuti oħrajn li għandhom jiġu kkunsidrati. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu dewmien jew nuqqas ta' emerġenza tas-saqajn ta' wara minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, jew ir-risorbiment prekoċi tal-garġi b'rabta mal-istadju tal-morfoġenesi tas-saqajn ta' wara u r-risorbiment tad-denb. Annimal ser jiġi rreġistrat li qed juri żvilupp asinkroniku jekk ma jkunx jista' jiġi assenjat fi stadju għaliex jonqos milli jissodisfa l-maġġor parti tal-kriterji tal-iżvilupp tragward għal stadju partikolari ta' Niewkoop and Faber (8), jew jekk ikun hemm ittardjar jew aċċelerazzjoni estremi ta' karatteristika importanti waħda jew iktar (eż. risorbiment sħiħ tad-denb, iżda s-saqajn ta' quddiem ma jkunux feġġew). Din il-valutazzjoni ssir b'mod kwalitattiv u għandha teżamina l-firxa sħiħa ta' karatteristiċi tragward elenkati minn Niewkoop and Faber (8). Madankollu, ma hemmx bżonn li jiġi rreġistrat l-istat tal-iżvilupp tad-diversi karatteristiċi tragward tal-annimali osservati. Annimali rreġistrati li juru żvilupp asinkroniku mhumiex assenjati stadju tal-iżvilupp ta' Niewkoop and Faber (8).

56. B'hekk, kriterju ċentrali għad-deżinjazzjoni ta' każijiet ta' żvilupp morfoloġiku anormali bħala 'żvilupp asinkroniku' huwa li t-twaqqit relattiv tal-immudellar mill-ġdid tat-tessuti u l-morfoġenesi tat-tessut huwa mxekkel filwaqt li l-morfoloġija tat-tessuti affettwati mhijiex anormali biċ-ċar. Eżempju li juri din l-interpretazzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi gross huwa li l-morfoġenesi ttardjata tas-saqajn ta' wara b'rabta mal-iżvilupp ta' tessuti oħrajn ser tissodisfa l-kriterju ta' 'żvilupp asinkroniku' filwaqt li każijiet li juru saqajn ta' wara niqsin, swaba' anormali (eż. ettrodattilja, polidattilja), jew sfigurazzjonijiet ċari oħrajn tas-saqajn ma għandhomx jitqiesu bħala 'żvilupp asinkroniku'.

57. F'dan il-kuntest, it-tragwardi morfoloġiċi l-kbar li għandhom jiġu evalwati għall-progress metamorfiku koordinat tagħhom għandhom jinkludu morfoġenesi tas-saqajn ta' wara, morfoġenesi tas-saqajn ta' quddiem, feġġa tas-saqajn ta' quddiem, l-istadju tar-risorbiment tad-denb (b'mod partikolari r-risorbiment tal-pinna tad-denb), u l-morfoloġija tar-ras (eż. daqs tal-garġi u daqs tar-risorbiment tal-garġi, morfoloġija tax-xedaq ta' taħt, protrużjoni tal-qarquċa ta' Mechel).

58. Skont il-modalità tal-azzjoni tas-sustanza kiika, jistgħu jseħħu fenotipi morfoloġiċi gross differenti. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu ttardjar jew nuqqas ta' feġġa tas-saqajn ta' quddiem minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, risorbiment prekoċi tal-garġi b'rabta mal-immudellar mill-ġdid tas-saqajn ta' wara u tad-denb.

Istopatoloġija

59. Jekk is-sustanza kimika ma tikkaġunax tossiċità importanti u ma tħaffifx l-iżvilupp jew tikkaġuna żvilupp asinkroniku, f'dak il-każ l-istopatoloġija tal-glandoli tat-tirojde tiġi evalwata bl-użu tad-dokument ta' gwida xieraq (9). L-ittardjar tal-iżvilupp, fin-nuqqas ta' tossiċità, huwa indikatur b'saħħtu ta' attività antitirojde, iżda l-analiżi tal-istadju tal-iżvilupp hija inqas sensittiva u inqas djanjostika mill-analiżi istopatoloġika tal-glandola tat-tirojde. Għalhekk, f'dan il-każ huwa meħtieġ li jsiru analiżijiet istopatoloġiċi tal-glandoli tat-tirojde. L-effetti fuq l-istoloġija tal-glandola tat-tirojde ntwerew fin-nuqqas ta' effetti tal-iżvilpp. Jekk iseħħu bidliet fl-istopatoloġija tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija attiva fit-tirojde. Jekk ma jkun osservat ebda ttardjar fl-iżvilupp jew leżjonijiet istoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija inattiva fit-tirojde. Il-ħsieb wara din id-deċiżjoni huwa li l-glandola tat-tirojde hija taħt l-influwenza tat-TSH u kwalunkwe sustanza kimika li tibdel l-ormon tat-tirojde ċirkolanti biżżejjed tant li tinbidel is-sekrezzjoni tat-TSH ser tirriżulta f'bidliet istopatoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde. Diversi modalitajiet u mekkaniżmi ta' azzjoni jistgħu jibdlu l-ormon tat-tirojde ċirkolanti. B'hekk, filwaqt li l-livell tal-ormon tat-tirojde jindika effett marbut mat-tirojde, dan mhuwiex biżżejjed sabiex jiġi stabbilit liema modalità jew mekkaniżmu ta' azzjoni huma marbutin mar-rispons.

60. Peress li dan il-punt ta' tmiem mhuwiex attribwibbli għal approċċi statistiċi bażiċi, opinjoni esperta ta' patoloġist għandha tistabbilixxi effett marbut mal-espożizzjoni għal sustanza kimika.

Żvilupp tardiv (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, HLL, BW, SVL)

61. Żvilupp tardiv jista' jseħħ permezz ta' mekkaniżmi antitirojde u permezz ta' tossiċità indiretta. Ittardjar ħafif fl-iżvilupp flimkien ma' sinjali ċari ta' tossiċità aktarx li jindikaw effett tossiku mhux speċifiku. Evalwazzjoni tat-tossiċità mhux tat-tirojde hija element essenzjali tat-test biex titnaqqas il-probabilità ta' riżultati ta' pożittiv falz. Mortalità eċċessiva hija indikazzjoni ovvja li qed iseħħu mekkaniżmi tossiċi oħrajn. B'mod simili, tnaqqisiet

ħfief fit-tkabbir, kif stabbiliti mill-piż imxarrab u/jew it-tul tal-SVL, jissuġġerixxu tossiċità mhux tat-tirojde wkoll. Żidiet apparenti fit-tkabbir huma osservati spiss b'sustanzi kimiċi li jaffettwaw l-iżvilupp normali b'mod negattiv. Konsegwentement, il-preżenza ta' annimali kbar mhux bilfors li tindika tossiċità mhux tat-tirojde. Madankollu, it-tkabbir qatt ma għandu jkun l-unika bażi sabiex tiġi stabbilita t-tossiċità tat-tirojde. Minflok għandhom jintużaw it-tkabbir flimkien mal-istadju tal-iżvilupp u l-istopatoloġija tat-tirojde sabiex tiġi stabbilita l-attività tat-tirojde. Punti ta' tmiem oħrajn għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta tiġi stabbilita tossiċità ċara inklużi edema, leżjonijiet emorraġiċi, letarġija, konsum inqas ta' ikel, imġiba tal-għawm stramba/mibdula, eċċ. Jekk il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test juru sinjali ta' tossiċità ċara, is-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi evalwata f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test qabel jiġi stabbilit jekk is-sustanza kimika hijiex potenzjalment attiva jew inattiva fit-tirojde.

62. Ittardjar statistikament importanti fl-iżvilupp, fin-nuqqas ta' sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara, jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde (antagonistika). Fin-nuqqas ta' risponsi statistiċi kbar, dan l-eżitu jista' jissaħħaħ b'riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde.

Analiżijiet statistiċi

63. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-dejta għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (11). Għall-punti ta' tmiem kwantitattivi kontinwi kollha (HLL, SVL, piż imxarrab) konsistenti ma' doża-rispons monotoni, għandu jiġi applikat it-test rigressiv ta' Jonckheere-Terpstra sabiex jiġi stabbilit effett tat-trattament importanti.

64. Għal punti ta' tmiem kontinwi li mhumiex konsistenti ma' doża-rispons monotoni, id-dejta għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment billi jintuża t-test ta' Shapiro-Wilk jew Anderson-Darling) u omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iż-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi minn ANOVA. Jista' jintuża ġudizzju espert minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u l-omoġenità tal-varjanza, għad li t-testijiet formali huma ppreferuti. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, għandha titfittex trasformazzjoni normalizzanti li tistabbilizza l-varjanza. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza omoġena, it-test ta' Dunnett jistabbilixxi effett tat-trattament sinifikanti. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza eteroġena, it-test ta' Tamhane-Dunnett jew T3 jew it-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon jistabbilixxi effett tat-trattament sinifikanti. Meta ma tkun tista' tinstab ebda trasformazzjoni normalizzanti, effett tat-trattament jiġi stabbilit mit-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon bl-użu ta' aġġustament ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. It-test ta' Dunnett huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test-F ANOVA u t-test ta' Mann-Whitney huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali ta' Kruskall-Wallis.

65. Mortalità sinifikanti mhijiex mistennija iżda għandha tiġi vvalutata mit-test rigressiv ta' Cochran-Armitage li fih id-dejta hija konsistenti mal-monotoniċità tad-doża-rispons, u nkella mit-test Eżatt ta' Fisher b'aġġustament Bonferroni-Holm.

66. Effett importanti tat-trattament għal stadju tal-iżvilupp huwa stabbilit mill-applikazzjoni rigressiva tat-test ta' Jonckheere-Terpstra applikat għall-medji tal-irreplikati. Inkella, u idealment, għandu jintuża t-test multikwantali ta' Jonckheere mill-20 sat-80 perċentil sabiex jiġi stabbilit l-effett, peress li jieħu f'kunsiderazzjoni bidliet fil-profil tad-distribuzzjoni.

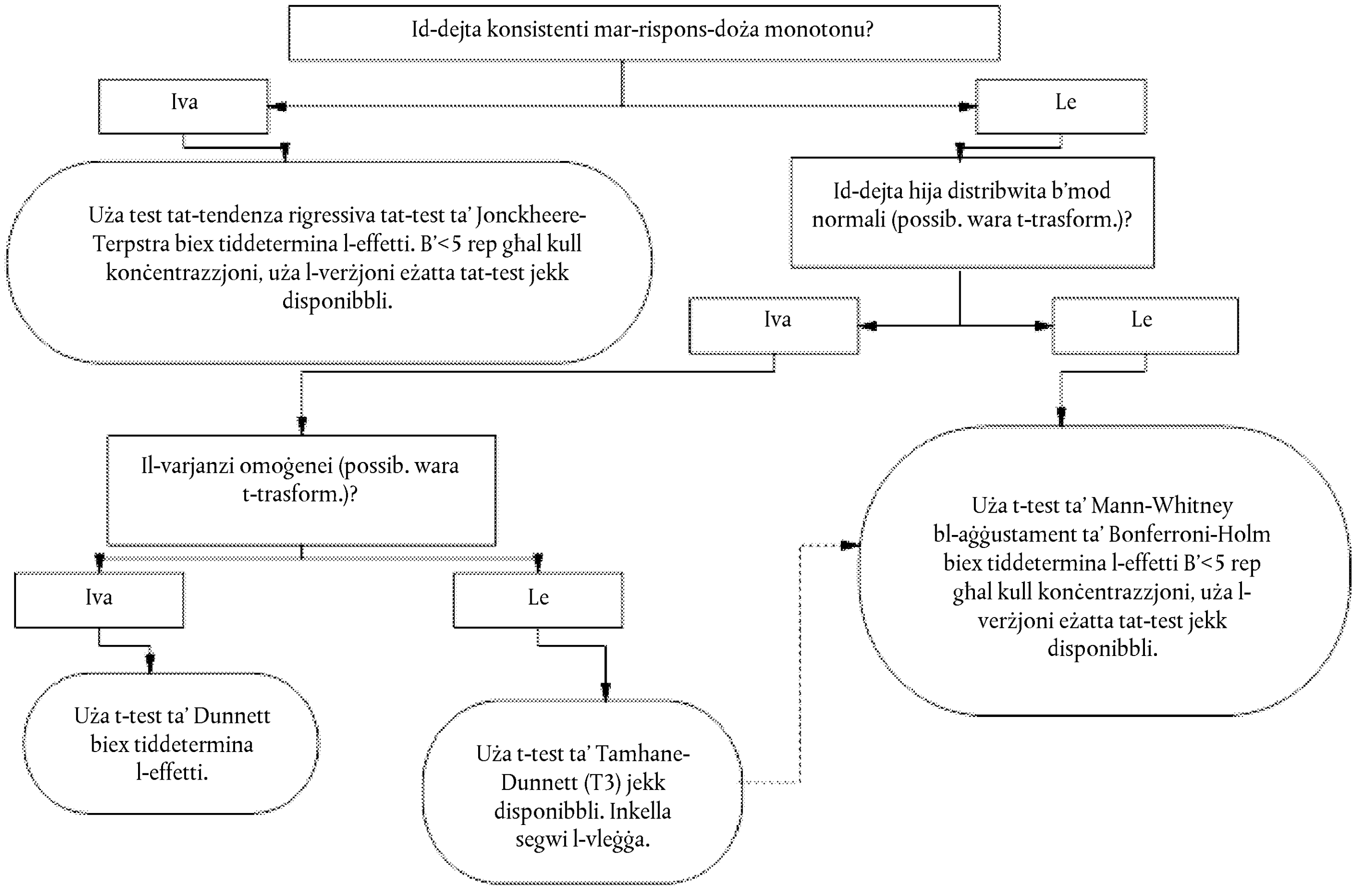
67. L-unità xierqa ta' analiżi hija l-irreplikat sabiex id-dejta tkun tikkonsisti f'medjani tal-irreplikati jekk jintuża t-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test-U ta' Mann-Whitney, jew il-medji tal-irreplikati jekk jintuża t-test ta' Dunnett. Il-monotoniċità tad-doża-rispons tista' tiġi vvalutata viżwalment mill-medji jew il-medjani tal-irreplikati u t-trattament jew minn testijiet formali bħal dawk deskritti qabel (11). Bi ftit inqas minn ħames irreplikati għal kull trattament jew kontroll, għandhom jintużaw il-verżjonijiet ta' permutazzjoni eżatti tat-testijiet ta' Jonckheere-Terpstra u Mann-Whitney jekk disponibbli. L-importanza statistika tat-testijiet kollha indikati hija ġġudikata fil-livell ta' sinifikanza 0,05.

68. Il-Figura 4 hija flow-chart għat-twettiq ta' testijiet statistiċi fuq dejta kontinwa.

Figura 4.

Flow-chart għal approċċi statistiċi għal dejta dwar ir-rispons kontinwu.

Flow-Chart għal Rispons Kontinwu



Kunsiderazzjonijiet speċjali għall-analiżi tad-dejta

Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju

69. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk irreplikat jew trattament sħiħ jurix tossiċità ċara u għandux jitneħħa mill-analiżi. Tossiċità ċara hija ddefinita bħala > 2 mortalitajiet fi kwalunkwe rreplikat li jistgħu jiġu spjegati biss b'tossiċità u mhux żball tekniku. Sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara jinkludu emorraġija, imġiba anormali, xejriet tal-għawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku ieħor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif.

Kontrolli tas-solvent

70. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkunu ġew ikkunsidrati l-għażliet kollha l-oħrajn ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess ħin kontroll b'ilma nadif. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll tas-solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif. L-iktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma l-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-piż imxarrab, peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet mhux tirojdali. Jekk jinstabu differenzi statistikament importanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif u dak ta' kontroll bis-solvent, sib il-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontroll bl-ilma nadif. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti bejn il-kontroll bl-ilma nadif u l-kontroll bis-solvent għall-varjabbli tar-rispons kollha mkejlin, stabbilixxi l-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontrolli bl-ilma ta' dilwizzjoni u bis-solvent raggruppati.

Gruppi tat-trattament li jilħqu l-istadju 60 u iktar tal-iżvilupp

71. Wara l-istadju 60, l-imrieżeb juru tnaqqis fid-daqs u l-piż minħabba risorbiment tat-tessut u tnaqqis tal-kontenut tal-ilma assolut. B'hekk, il-kejliet tal-piż imxarrab u l-SVL ma jistgħux jintużaw kif xieraq fl-analiżijiet statistiċi għal differenzi fir-rati ta' tkabbir. Għaldaqstant, il-piż imxarrab u d-dejta dwar it-tul mill-organiżmi > NF60 għandhom jiġu ċensurati u ma jistgħux jintużaw fl-analiżijiet tal-medji tal-irreplikati jew il-medjani tal-irreplikati. Jistgħu jintużaw żewġ approċċi differenti sabiex jiġu analizzati dawn il-parametri relatati mat-tkabbir.

72. Approċċ minnhom huwa li jiġu kkunsidrati biss imrieżeb fl-istadju 60 tal-iżvilupp jew inqas għall-analiżijiet statistiċi tal-piż imxarrab u/jew l-SVL. Dan l-approċċ huwa mifhum li jipprovdi informazzjoni robusta biżżejjed dwar is-serjetà tal-effetti possibbli tat-tkabbir diment li sehem żgħir biss mill-annimali tat-test jitneħħew mill-analiżijiet (≤ 20 %). Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 (≤ 20 %), f'konċentrazzjoni nominali waħda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha sabiex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir dovuti għal trattamenti kimiċi filwaqt li jiġi kkunsidrat l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir. L-Appendiċi 3 jipprovdi gwida dwar l-analiżi ANOVA b'żewġ fatturi tal-piż u t-tul.

LETTERATURA

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelpia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

Appendiċi 1

Tabella 1

Kundizzjonijiet Sperimentali għall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji fuq 21 jum

Annimal tat-Test	Larva *Xenopus laevis*	
Stadju Inizjali tal-Larva	Stadju 51 ta' Nieuwkoop and Faber	
Perjodu ta' Espożizzjoni	21 jum	
Kriterji tal-Għażla tal-Larva	Stadju tal-iżvilupp u tul totali (mhux obbligatorju)	
Konċentrazzjonijiet tat-test	Minimu ta' 3 konċentrazzjonijiet li jvarjaw bejn wieħed u ieħor ordni wieħed ta' kobor	
Reġim ta' Espożizzjoni	Fluss kontinwu (preferut) u/jew tiġdid statiku	
Rata tal-Fluss tas-Sistema tat-Test	25 ml/min (sostituzzjoni tal-volum sħiħ bejn wieħed u ieħor kull 2,7 siegħa)	
Punti ta' Tmiem Primarji / Jiem tal-Istabbiliment	Mortalità	Kuljum
	Stadju tal-Iżvilupp	J 7 u 21
	Tul tas-Sieq ta' Wara	J 7 u 21
	Tul mill-Imnieħer sal-Anus	J 7 u 21
	Piż tal-Ġisem Imxarrab	J 7 u 21
	Istoloġija tat-Tirojde	J 21
Ilma ta' Dilwizzjoni / Kontroll tal-Laboratorju	Ilma tal-vit deklorinat (iffiltrat għall-karbonju) jew is-sors tal-laboratorju ekwivalenti	
Densità tal-Larva	20 larva / reċipjent tat-test (5 / l)	
Soluzzjoni tat-Test / Reċipjent tat-Test	4-10 l (tal-inqas 10-15 cm ilma) / Reċipjent tat-test tal-ħġieġ jew tal-Azzar Inossidabbli (eż., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikazzjoni	4 reċipjenti tat-test tal-irreplikati / konċentrazzjoni u kontroll tat-test	
Rata ta' Mortalità Aċċettabbli fil-Kontrolli	≤ 10 % għal kull reċipjent tat-test tal-irreplikati	
Fissazzjoni tat-Tirojde	Numru Ffissat	L-imrieżeb kollha (fil-bidu jiġu evalwati 5/irreplikat)
	Reġjun	Ras jew ġisem sħiħ
	Fluwidu tal-Fissazzjoni	Fissattiv ta' Davidson

Tmigħ	Ikel	Sera Micron® jew ekwivalenti
	Ammont / Frekwenza	Ara t-Tabella 1 għar-reġim tat-tmigħ bl-użu ta' Sera Micron®
Dawl	Fotoperjodu	12-il siegħa Dawl: 12-il siegħa dlam
	Intensità	600 sa 2 000 lux (Imkejlin fil-Wiċċ tal-Ilma)
Temperatura tal-Ilma		22° ± 1 °C
pH		6,5 — 8,5
Konċentrazzjoni ta' Ossiġenu Dissolt (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % Saturazzjoni tal-Arja)
Skeda tal-Kampjun Kimiku Analitiku		Darba / Ġimgħa (4 Avvenimenti tal-Kampjun / Test)

Appendiċi 2

Tabelli tar-rapportar għad-dejta mhux ipproċessata u d-dejta sommarja

Tabella 1

Informazzjoni ġenerali dwar is-sustanza kimika tat-test

Informazzjoni kimika			
	Daħħal is-sustanza kimika tat-test, l-unitajiet tal-konċentrazzjoni, u t-trattamenti		
	Sustanza kimika tat-test:		
	Unitajiet tal-konċentrazzjoni:		
	Trattament 1		
	Trattament 2		
	Trattament 3		
	Trattament 4		
	Data (jum 0):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 7):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 21):		Daħħal id-data (xx/jj/ss)

Tabella 2

Skedi għall-ġbir ta' dejta mhux ipproċessata għall-jiem 7 u 21

JUM X
DATA 00/00/00

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Sħiħ (mg)
RIN-GIELA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Sħiħ (mg)
RIN-GIELA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Sħiħ (mg)
RIN-GIELA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Konċen-trazzjoni	Numru tat-Tratta-ment	Numru tal-Irrepli-kat	Numru tal-indi-vidwu	Identifika-tur tal-In-dividwu	Stadju tal-Iżvilupp	Tul tal-SVL (mm)	Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar-rab tal-Or-ganiżmu Sħiħ (mg)
RIN-GIELA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Tabella 3

Sommarji kkalkolati għad-dejta dwar il-punti ta' tmiem mill-jiem 7 u 21

		Stadju tal-Iżvilupp			SVL (mm)		Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)		Piż (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDJAN	MASS	MEDJA	ŻVI STD	MEDJU	ŻVI STD	MEDJU	ŻVI STD
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 2.

Tabella 4

Dejta dwar il-mortalità ta' kuljum

Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Għadd tal-irreplikati		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Għadd tat-Trattament		0				0				0				0			

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

Tabella 5

Kriterji tal-Kwalità tal-Ilma

Sistema ta' Espożizzjoni (bi fluss kontinwu/tiġdid statiku):
Temperatura:
Intensità tad-dawl:
Ċiklu dawl-dlam:
Ikel:
Rata tat-tmigħ:
pH tal-ilma:
Konċentrazzjoni tal-jodju fl-ilma tat-test:

Tabella 6

Dejta kimika sommarja

Isem is-Sustanza Kimika:																					
Każ #:																					
Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				

Isem is-Sustanza Kimika:																					
Każ #:																					
Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

Tabella 7

Tabelli għar-rapportar tal-istopatoloġija għall-kriterji ċentrali

Data: Sustanza kimika: Patoloġista:

		Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1					
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2					
Total:					

		Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1					
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2					
Total:					

		Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1					
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2					
Total:					

		Ipertrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Ipertrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplażja taċ-ċelloli follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1					
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2					
Total:					

Tabella 8

Kriterji addizzjonali tal-istopatoloġija

Data: Sustanza kimika: Patoloġista:

		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1			
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2			
Total:			

		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Annimal tad-Doża ID — irreplikat 1			
Annimal tad-Doża ID — irreplikat 2			
Total:			

		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1			
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2			
Total:			

		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1			
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2			
Total:			

Tabella 9

Deskrizzjonijiet narrattivi għal sejbiet istopatoloġiċi

Data:

Sustanza kimika:

Patoloġista:

	Deskrizzjoni narrattiva	
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tal-Kontroll — irreplikat 2		

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		

ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Annimal tad-Doża — irreplikat 2		

Tabella 10

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar għall-jum × (7 jew 21) tal-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
Punt ta' tmiem	Irreplikat	Medju	SD	CV	N	Medju	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p
Sieq ta' Wara Tul (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
Piż imxarrab (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

Tabella 11

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar għal dejta dwar l-istadju tal-iżvilupp tal-jum × (7 jew 21) għall-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
	Irreplikat	Medjan	Min	Mass	N	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	Medjan	valur-p
Stadju tal-Iż-vilupp	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

Appendiċi 3

Analiżi alternattiva tal-piż u t-tul fil-każ ta' żvilupp tardiv tal-istadju li jaqbeż l-20 % tal-imrieżeb f'konċentrazzjoni waħda jew iktar

Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 (≥ 20 %) f'konċentrazzjoni nominali waħda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha biex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir minħabba trattamenti kimiċi filwaqt li jittieħed f'kunsiderazzjoni l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir.

Il-proposta hija sabiex tintuża d-dejta kollha iżda jingħata kont lill-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju. Dan jista' jsir b'ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta. Iddefinixxi StadjuTard = 'Iva' għal annimal jekk l-istadju tal-iżvilupp tiegħu huwa 61 jew ikbar. Inkella, iddefinixxi StadjuTard = 'Le'. F'dak il-każ tista' ssir ANOVA b'żewġ fatturi b'konċentrazzjoni u StadjuTard u l-interazzjoni tagħhom, b'fattur għal għarrieda Rep(Conc) u fattur ieħor għal għarrieda Marżebba(Rep). Dan xorta jittratta lir-rep bħala l-unità tal-analiżi u essenzjalment jagħti l-istess riżultati bħala analiżi ponderata tal-medji tar-rep*stadjutard, ponderati bin-numru ta' annimali għal kull medja. Jekk id-dejta tikser ir-rekwiżiti dwar l-omoġenità tal-varjanza jew in-normalità tal-ANOVA, f'dak il-każ tista' ssir trasformazzjoni tal-ordni tal-klassifikazzjoni normalizzata sabiex titneħħa dik l-oġġezzjoni.

Minbarra t-testijiet-F standard tal-ANOVA għall-effetti ta' Konċ, StadjuTard, u l-interazzjonijiet tagħhom, it-test-F tal-interazzjoni jista' jinqasam f'żewġ testijiet-F addizzjonali tal-ANOVA, wieħed fuq ir-risponsi medji fil-konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = 'Le' u ieħor fuq ir-risponsi medji fuq konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = 'Iva'. Isiru wkoll paraguni oħrajn tal-medji tat-trattament kontra l-kontroll fi ħdan kull livell ta' StadjuTard. Tista' ssir analiżi tat-tip tax-xejra bl-użu tal-kuntrasti xierqa jew jistgħu jsiru paraguni sempliċi bejn il-pari jekk ikun hemm evidenza ta' doża-rispons mhux monotoni fi ħdan livell tal-varjabbli ta' StadjuTard. Aġġustament Bonferroni-Holm għall-valuri-p isir biss jekk it-taqsima-F korrispondenti ma tkunx sinifikanti. Dan jista' jsir fl-SAS u, presumibbilment, f'pakketti ta' software statistiċi oħrajn. Jistgħu jirriżultaw kumplikazzjonijiet meta ma jkun hemm ebda annimali bi stadju tardiv f'ċerti konċentrazzjonijiet, iżda dawn is-sitwazzjonijiet jistgħu jiġu ġestiti b'mod dirett.

Appendiċi 4

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar

C.39. **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-KOLLEMBOLANI FIL-ĦAMRIJA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 232 tal-OECD (2009). Dan il-metodu ta' ttestjar tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq ir-riżultati riproduttivi tal-kollembolani fil-ħamrija. Huwa bbażat fuq proċeduri eżistenti (1) (2). Il-partenoġenetiċi *Folsomia candida* u s-sesswalment riproduttivi *Folsomia fimetaria* huma tnejn mill-iktar speċijiet aċċessibbli ta' Kollembola, u huma kolturabbli u disponibbli fis-suq. Meta jkunu jridu jiġu vvalutati ħabitats speċifiċi mhux koperti miż-żewġ speċijiet, il-proċedura tista' tiġi estiża wkoll għal speċijiet oħrajn ta' Kollembola jekk kapaċi jissodisfaw il-kriterji tal-validità tat-test.

2. Kollembola li jgħixu fil-ħamrija huma speċijiet ekoloġikament relevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Il-kollemboli huma esapodi b'eksoskeletru rqiq ferm permeabbli għall-arja u l-ilma, u jirrappreżentaw speċijiet ta' artropodi b'rotta differenti u rata differenti ta' espożizzjoni meta mqabblin mal-ħniex u l-enkitraeidi.

3. Id-densitajiet tal-popolazzjoni tal-Kollembola spiss jilħqu l-10^5 m^{-2} fil-ħamrija u s-saffi ta' skart tal-weraq f'ħafna ekosistemi terrestri (3) (4). L-adulti tipikament ikunu twal 0,5 — 5 mm, il-kontribuzzjoni tagħhom għar-respirazzjoni u l-bijomassa totali tal-annimali tal-ħamrija hija baxxa, stmata bejn 1 % u 5 % (5). Għalhekk, l-iktar rwol importanti tagħhom jista' jkun bħala regolaturi potenzjali tal-proċessi permezz ta' predazzjoni tal-mikrobivori u mikrofawna. L-ispringtails huma annimali tal-priża għal firxa wiesgħa ta' invertebrati endoġeiċi u epiġeiċi, bħal dud, ċentopiedi, brimb, Carabidae u kappillani. Il-Kollembola jikkontribwixxu għall-proċessi ta' dekompożizzjoni f'ħamrija aċidużi fejn jistgħu jkunu l-iktar invertebrati importanti tal-ħamrija minbarra enkitraeidi, peress li normalment il-ħniex u d-diplopodi jkunu niqsin.

4. *F. fimetaria* għandha distribuzzjoni madwar id-dinja u hija komuni f'diversi tipi ta' ħamrija li jvarjaw minn ħamrija mrammla sa raba' kif ukoll ħamrija aċidużi u oħrajn li mhumiex. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Ġiet irreġistrata fil-ħamrija agrikoli madwar l-Ewropa kollha (6). Għandha drawwa ta' ikel omnivoru, inklużi ifa fungali, batterji, protożoa u detrite fl-alimentazzjoni tagħha. Tinteraġixxi permezz ta' ragħha b'infezzjonijiet ta' fungi patoġeniċi tal-pjanti (7) u tista' tinfluwenza l-mikorriża, kif inhu magħruf li huwa l-każ għal F. candida. Bħal ħafna mill-ispeċijiet kollembolani, tirriproduċi sesswalment u teħtieġ il-preżenza permanenti tar-raġel għall-fertilizzazzjoni tal-bajd.

5. *F. candida* hija distribwita madwar id-dinja wkoll. Għad li mhijiex komuni f'ħafna mill-ħamrija naturali, spiss issibha f'numru kbar ħafna f'siti rikki f'ħamrija humus. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Għandha furka żviluppata sew (organu biex taqbeż) u moviment ta' ġiri attiv u taqbeż mill-ewwel meta disturbata. Ir-rwol ekoloġiku ta' *F. candida* jixbah ir-rwol ta' *F. fimetaria*, iżda l-ħabitats huma ħamrija iktar organikament rikki. Tirriproduċi partenoġenetikament. L-irġiel jistgħu jkunu inqas minn 1 f'elf.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Kollembola adulti (*F. fimetaria*) jew żgħar (*F. candida*) sinkroniċi huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta f'ħamrija artifiċjali mmodifikata (8) bl-użu ta' kontenut ta' materja organika ta' 5 % (jew ħamrija oħra). Ix-xenarju tat-test jista' jinqasam f'żewġ stadji:

— Test tas-sejbien tal-medda, fil-każ li ma jkunx hemm biżżejjed informazzjoni dwar it-tossiċità disponibbli, li fih il-mortalità u r-riproduzzjoni jkunu l-punti ta' tmiem ewlenin ivvalutati wara ġimgħatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimgħat għal *F. candida*.

— Test definittiv tar-riproduzzjoni li fih jiġi vvalutat n-numru totali ta' żgħar prodotti mill-annimali ġenituri u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul ta' dan it-test definittiv huwa ta' 3 ġimgħat għal *F. fimetaria* jew 4 ġimgħat għal *F. candida*.

L-effett tossiku tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riżultati tal-mortalità u tar-riproduzzjoni tal-adulti jingħata bħala LC_x u EC_x billi d-dejta titqiegħed f'mudell xieraq permezz ta' rigressjoni mhux lineari biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaġuna mortalità ta' x % jew tnaqqis fir-riżultat tar-riproduzzjoni, rispettivament, jew inkella bħala l-valur NOEC/LOEC (9).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa l-karatteristiċi fiżiċi, is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma ħamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Tajjeb li jkun hemm informazzjoni addizzjonali dwar l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija, bħar-rati tal-fotoliżi u idroliżi u d-degradazzjoni bijotika. L-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura tal-IUPAC, in-numru tas-CAS, il-lott, il-formula strutturali u l-purità għandha tiġi ddokumentata meta disponibbli.

8. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jista' jintuża għal sustanzi li jinħallu u dawk li ma jinħallux fl-ilma. Madankollu, il-modalità ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser tvarja skont il-każ. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

VALIDITÀ TAT-TEST

9. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin fil-kontrolli mhux ittrattati sabiex riżultat tat-test jitqies validu:

— Il-mortalità medja fl-adulti ma għandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test;

— In-numru medju ta' żgħar għal kull reċipjent għandu jkun tal-inqas 100 fi tmiem it-test;

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta' żgħar għandu jkun inqas minn 30 % fi tmiem it-test definittiv.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

10. Sustanza kimika ta' referenza għandha tiġi ttestjata fil-konċentrazzjoni EC_{50} tagħha għat-tip ta' ħamrija tat-test magħżul f'intervalli regolari jew inkella possibbilment inkluża f'kull test sabiex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organiżmi tat-test fis-sistema tat-test qiegħed fi ħdan il-livell normali. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija aċidu boriku, li għandu jnaqqas ir-riproduzzjoni b'50 % (10 (11) f'madwar 100 mg/kg piż xott tal-ħamrija għaż-żewġ speċijiet.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Reċipjenti u tagħmir tat-test

11. Kontenituri li jifilħu 30 g ħamrija niedja huma reċipjenti tat-test xierqa. Il-materjal għandu jkun tal-ħġieġ jew tal-plastik inerti (mhux tossiku). Madankollu, l-użu ta' kontenituri tal-plastik għandu jiġi evitat jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test tonqos minħabba sorbiment. Ir-reċipjenti tat-test għandu jkollhom żona trażversali li tippermetti sabiex il-fond propju tal-ħamrija fir-reċipjent tat-test ikun 2-4 cm. Ir-reċipjenti għandu jkollhom għotjien (eż. ħġieġ jew polietilen) imfaslin biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu li jgħaddu gassijiet bejn il-ħamrija u l-atmosfera. Il-kontenitur għandu jkun tal-inqas parzjalment trasparenti biex ikun jista' jgħaddi d-dawl.

12. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dawn li ġejjin:

— armadju tat-tnixxif;

— sterjomikroskopju;

— metru tal-pH u metru tad-dawl;

— imwieżen preċiżi xierqa;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mgħottija bl-għotjien);

— inkubatur jew kamra żgħira bit-temperatura kkontrollata;

— forċipi jew apparat tal-fluss tal-arja b'irdigħ baxx.

Tħejjija tal-ħamrija tat-test

13. Tintuża ħamrija artifiċjali mmodifikata (8) b'kontenut ta' materja organika ta' 5 %. Inkella tista' tintuża ħamrija naturali, peress li l-ħamrija artifiċjali ma tixbahx lil ħamrija naturali. Il-kompożizzjoni rrakkomandata tal-ħamrija artifiċjali hija kif ġej (ibbażata fuq piżijiet nixfin, imnixxfin għal piż kostanti f'105 °C):

— 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mitħun fin (daqs ta' partikola ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);

— 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);

— madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' $CaCO_3$ (ara hawn taħt), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.

— 1,0 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$, polverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' 6,0 ± 0,5; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' $CaCO_3$ meħtieġ ser ikun jiddependi mill-komponenti tas-substrat tal-ħamrija u għandu jiġi stabbilit billi titkejjel il-pH tas-subkampjuni tal-ħamrija niedja preinkubata eżatt qabel it-test.

Nota 2: Huwa rrakkomandat li titkejjel il-pH u jistgħu jitkejlu wkoll il-proprozjon C/N, il-Kapaċità ta' Skambju ta' Katjoni (CEC) u l-kontenut ta' materja organika tal-ħamrija sabiex tkun tista' ssir normalizzazzjoni fi stadju iktar tard u jiġu interpretati aħjar ir-riżultati.

Nota 3: Jekk meħtieġ, eż. għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar, ħamrija naturali minn siti mhux imniġġsin jistgħu jservu ta' test u/jew substrat tal-koltura wkoll. Madankollu, jekk tintuża ħamrija naturali, għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas skont l-oriġini (sit ta' ġbir), il-pH, is-sawra (distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli), is-CEC u l-kontenut ta' materja organika u għandha tkun ħielsa minn kwalunkwe kontaminazzjoni. Għal ħamrija naturali huwa rakkomandat li tintwera l-adegwatezza tagħha għal test u għall-ilħuq tal-kriterji ta' validità tat-test qabel ma tintuża l-ħamrija f'test definittiv.

14. Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija huma mħalltin sew (eż. f'ħallat tal-laboratorju fuq skala kbira). Il-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-ħamrija artifijali hija stabbilita skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Il-kontenut ta' umdità tal-ħamrija tal-ittestjar għandu jiġi ottimizzat sabiex tinkiseb struttura tal-ħamrija poruża laxka li tippermetti sabiex il-kollembolani jidħlu fil-pori. Normalment, dan uwa bejn 40-60 % tad-WHC massima.

15. Il-ħamrija artifiċjali niexfa tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali ta' ilma 2-7 ijiem qabel jibda t-test, sabiex tiġi ekwilibrata/stabbilizzata l-aċidità. Sabiex tiġi stabbilita pH, tintuża taħlita ta' ħamrija u soluzzjoni ta' 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M klorur tal-kalċju ($CaCl_2$) fi proporzjon ta' 1:5 (skont l-Appendiċi 6). Jekk il-ħamrija hija iktar aċiduża mill-medda meħtieġa, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied ammont xiearq ta' $CaCO_3$. Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied aċidu inorganiku li ma jagħmilx ħsara lill-kollembolani.

16. Il-ħamrija mxarrba minn qabel tinqasam f'porzjonijiet li jaqblu man-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn xieraq) u l-kontrolli użati għat-test. Jiddaħħlu s-sustanzi kimiċi tat-test u jiġi rregolat il-kontenut ta' ilma skont il-paragrafu 24.

Għażla u tħejjija tal-annimali tat-test

17. Il-partenoġenetika *F. candida* hija l-ispeċi rrakkomandata, peress li fir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar (11), din l-ispeċi ssodisfat il-kriterji ta' validità għas-sopravivenza ħafna iktar mill-*F. fimetaria*. Jekk tintuża speċi oħra, din trid tissodisfa l-kriterji ta' validità spjegati fil-paragrafu 9. Fil-bidu tat-test, l-annimali għandhom ikunu mitmugħin sew u jkollhom età ta' bejn 23-26 jum għal *F. fimetaria* u 9-12-il jum għal *F. candida*. Għal kull irreplikat, in-numru ta' *F. fimetaria* għandu jkun ta' 10 irġiel u 10 nisa, u għal *F. candida* għandhom jintużaw 10 nisa (ara l-Appendiċi 2 u l-Appendiċi 3). L-annimali sinkroniċi jingħażlu għal għarrieda mid-dixxijiet u l-kundizzjoni tas-saħħa u fiżika tagħhom tiġi vverifikata għal kull lott imdaħħal f'irreplikat. Kull grupp ta' 10/20 individwu jiddaħħal f'kontenitur tat-test magħżul għal għarrieda u jingħażlu n-nisa l-kbar tal-*F. fimetaria* sabiex tiġi żgurata distinzjoni xierqa mill-*F. fimetaria* rġiel.

Tħejjija tal-konċentrazzjonijiet tat-test

18. Jistgħu jintużaw erba' metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: 1) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija bl-ilma bħala trasportatur, 2) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija b'solvent organiku bħala trasportatur, 3) taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija bir-ramel bħala trasportatur, jew 4) applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija. L-għażla tal-metodu xieraq jiddependi mill-karatteristika tas-sustanza kimika u l-iskop tat-test. B'mod ġenerali, huwa rrakkomandat it-taħlit tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madankollu, jistgħu jkunu meħtieġa proċeduri ta' applikazzjoni li huma konsistenti mal-użu prattiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. sprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pestiċidi speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-żerriegħa). Il-ħamrija tiġi ttrattata qabel ma jiddaħħlu l-kollembolani, ħlief meta s-sustanza kimika tat-test tiddaħħal f'wiċċ il-ħamrija, il-kollembolani għandhom jitħallew jidħlu fil-ħamrija.

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test titħejja f'ilma dejonizzat fi kwantità biżżejjed għall-irreplikati kollha ta' konċentrazzjoni waħda tat-test. Kull soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test titħallat sew ma' lott ħamrija mxarrba minn qabel qabel ma tiddaħħal fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinħallux fl-ilma, iżda jinħallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' solvent xieraq (eż. aċetun) li xorta waħda jiżgura taħlit xieraq tas-sustanza kimika fil-ħamrija u titħallat ma' porzjon tar-ramel kwarzuż meħtieġ. Għandhom jintużaw solventi volatili biss. Meta jintuża solvent organiku, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test u kontroll addizzjonali negattiv bis-solvent għandu jkun fihom l-istess ammont minimu tas-solvent. Il-kontenituri tal-applikazzjoni għandhom jitħallew mikxufin għal ċertu perjodu biex is-solvent assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ikun jista' jevapora, u jiġi żgurat li ma ssir ebda dissipazzjoni tas-sustanza kimika tul dan iż-żmien.

Sustanza kimika tat-test li bilkemm tinħall fl-ilma u f'solventi organiċi

21. Għal sustanzi kimiċi li bilkemm jinħallu fl-ilma u f'solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż, li għandu jkun parti mir-ramel totali mdaħħal fil-ħamrija, jitħallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test sabiex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa tat-test. Din it-taħlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiddaħħal fil-ħamrija mxarrba minn qabel u titħallat sew wara li jiddaħħal ammont xieraq ta' ilma dejonizzat sabiex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' umdità. It-taħlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jitħejja kontroll xieraq ukoll.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-ħamrija

22. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun pestiċida, jista' jkun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija billi tiġi sprejjata. Il-ħamrija tiġi ttrattata wara li jiżdiedu l-kollembolani. L-ewwel il-kontenituri tat-test jimtlew bis-substrat tal-ħamrija mxarrba, jiddaħħlu l-annimali u mbagħad jintiżnu l-kontenituri tat-test. Sabiex tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta tal-annimali għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' kuntatt dirett, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata tal-inqas nofs siegħa wara li jiżdiedu l-Kollembola. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-ħamrija b'mod imqassam tajjeb kemm jista' jkun bl-użu ta' apparat xieraq li jisprejja fuq skala tal-laboratorju li jkun jixbah l-applikazzjoni bi sprej fl-għelieqi. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura fi ħdan ± 2 °C tal-varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni tal-ilma skont ir-rakkomandazzjonijiet tal-valutazzjoni tar-riskju. Ir-rata għandha tiġi vverifikata bl-użu ta' teknika xierqa ta' kalibraġġ. Formulazzjonijiet speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-żerriegħa jistgħu jiġu applikati b'mod konsistenti mal-użu agrikolu. L-ikel jiżdied wara l-isprejjar.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tat-test

23. It-temperatura medja tat-test għandha tkun ta' 20 ± 1 °C b'medda tat-temperatura ta' 20 ± 2 °C. It-test isir f'ċikli ta' dawl-dlam ikkontrollati (idealment 12-il siegħa dawl u 12-il siegħa dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.

24. Sabiex tiġi vverifikata l-umdità tal-ħamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu, fin-nofs u fi tmiem it-test. Telf ta' piż ta' > 2 % tpatti għalih żieda ta' ilma dejonizzat. Ta' min jinnota li t-telf tal-ilma jista' jitnaqqas billi tinżamm umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.

25. Il-pH għandha titkejjel fil-bidu u fi tmiem kemm it-test ta' sejbien tal-medda kif ukoll fit-test definittiv. Il-kejliet għandhom isiru f'kampjun ta' kontroll wieħed żejjed u kampjun żejjed wieħed mill-kampjuni ta' ħamrija ttrattati (il-konċentrazzjonijiet kollha) imħejjijin u miżmumin bl-istess mod bħall-kolturi tat-test, iżda bla ma jiżdiedu l-kollembolani.

Proċedura u kejliet tat-test

26. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, ammont tal-ħamrija tat-test li jikkorrispondi għal 30 g piż frisk jitqiegħed fir-reċipjent tat-test. Jitħejjew ukoll kontrolli tal-ilma, mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża veikolu għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, għandha ssir serje ta' kontroll li jkun fiha l-veikolu waħdu minbarra s-serje tat-test. Il-konċentrazzjoni tas-solvent jew id-dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test.

27. L-ispringtails individwali jiġu ttrasferiti bir-reqqa f'kull reċipjent tat-test (allokati għal għarrieda fir-reċipjenti tat-test) u jitqiegħdu f'wiċċ il-ħamrija. Għal trasferiment effiċjenti tal-annimali jista' jintuża apparat tal-fluss tal-arja b'irdigħ baxx. In-numru ta' rreplikati għall-konċentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi mid-disinn tat-test użat. Ir-reċipjenti tat-test jitqiegħdu għal għarrieda fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jerġgħu jingħażlu għal għarrieda kull ġimgħa.

28. Għat-test tal-*F. fimetaria* għandhom jintużaw għoxrin adult, 10 irġiel u 10 nisa, b'età ta' 23-26 jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 21, il-kollembolani jiġu estratti mill-ħamrija u jingħaddu. Għal *F. fimetaria*, is-sessi jiġu diskriminati skont id-daqs fil-lott tal-annimali sinkronizzati użat għat-test. In-nisa huma ferm ikbar mill-irġiel (Ara l-Appendiċi 3)

29. Għat-test tal-*F. candida*, għandhom jintużaw għaxar żgħar b'età ta' 9-12-il jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 28, il-kollembolani jiġu estrattati mill-ħamrija u jingħaddu.

30. Bħala sors tal-ikel xieraq, fil-bidu tat-test u wara madwar ġimgħatejn jiżdied ma' kull kontenitur ammont suffiċjenti, eż. 2-10 mg, ta' ħmira mnixxfa u mfarrka tal-furnar, disponibbli fis-suq għal użu domestiku.

31. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni. Wara 3 ġimgħat (*F. fimetaria*) jew 4 ġimgħat (*F. candida*), il-kollembolani jiġu estrattati mill-ħamrija tat-test (ara l-Appendiċi 4) u jingħaddu (12). Kollembolan jiġi rreġistrat mejjet jekk ma jinstabx fl-estrazzjoni. Il-metodu ta' estrazzjoni u għadd għandu jiġi vvalidat. Il-validità tinkludi effiċjenza fl-estrazzjoni taż-żgħar ogħla minn 95 %, eż. billi jiżdied numru magħruf fil-ħamrija.

32. Sommarju prattiku u skeda taż-żmien tal-proċedura tat-test huma spjegati fl-Appendiċi 2.

Disinn tat-test

Test ta' sejbien tal-medda

33. Meta jkun hemm bżonn, isir test ta' sejbien tal-medda, pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg piż xott ta' ħamrija u żewġ irreplikati għal kull trattament u kontroll. Informazzjoni addizzjonali, minn testijiet b'sustanzi kimiċi simili jew minn tagħrif, dwar il-mortalità jew ir-riproduzzjoni tal-Kollembola, tista' tkun siewja wkoll meta tittieħed deċiżjoni fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet li ser jintużaw fit-test ta' sejbien tal-medda.

34. Id-durata tat-test ta' sejbien tal-medda hija ta' ġimgħatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimgħat għal *F. candida* sabiex jiġi żgurat li ġiet prodotta tqegħida waħda ta' żgħar. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni tal-Kollembola. Għandhom jiġu rreġistrati n-numru ta' adulti u l-okkorrenza ta' żgħar.

Test finali

35. Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC_{10}, EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rrakkomandati minimu ta' żewġ irreplikati għal kull trattament b'konċentrazzjoni tat-test u sitt irreplikati tal-kontroll. Il-fattur ta' spazjar jista' jvarja skont il-mudell tad-doża-rispons.

36. Għad-determinazzjoni tal-NOEC/LOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament bil-konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jitferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

37. Approċċ kombinat jippermetti li jiġu stabbiliti kemm l-NOEC/LOEC kif ukoll l-EC_x. Għal dan l-approċċ kombinat, għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet tat-trattament f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jitferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.

38. Jekk ma jiġi osservat ebda effett fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test ta' sejbien tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jsir bħala test tal-limitu, bl-użu ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg u l-kontroll. Test tal-limitu ser jipprovdi l-opportunità li jintwera li ma hemm ebda effett statistikament sinifikanti fil-konċentrazzjoni limitu. Għandhom jintużaw tmien irreplikati kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll għall-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

39. Ir-riżultat tar-riproduzzjoni huwa l-punt ta' tmiem ewlieni (eż. in-numru ta' żgħar prodotti għal kull reċipjent tat-test). L-analiżi statistika, eż. il-proċeduri tal-ANOVA, tqabbel it-trattamenti skont it-test-t ta' Student, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati għal medji tat-trattamenti individwali.

40. In-numru ta' adulti sopravissuti fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità kbir u għandu jiġi ddokumentat. Bħal fit-test ta' sejbien tal-medda, is-sinjali dannużi kollha l-oħrajn għandhom jiġu rrapportati fir-rapport finali wkoll.

LC_x u EC_x

41. Il-valuri EC_x, inklużi l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % inferjuri u superjuri assoċjati magħhom għall-parametru huma kkalkolati bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa (eż. il-funzjoni loġistika jew Weibull, il-metodu Spearman-Karber trimmjat, jew sempliċi interpolazzjoni). EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja tal-kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC_{50} jew kwalunkwe EC_x oħra, is-sett sħiħ ta' dejta għandu jkun soġġett għal analiżi tar-rigressjoni. LC_{50} normalment tiġi stmata permezz ta' analiżi probit jew analiżi simili li tieħu f'kunsiderazzjoni d-dejta dwar il-mortalità distribwita b'mod binomjali.

NOEC/LOEC

42. Jekk analiżi statistika tkun maħsuba sabiex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hemm bżonn tal-istatistiki għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu li huma rreplikati). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (9). B'mod ġenerali, effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-kontroll huma investigati bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi fuq naħa waħda b'$p \leq 0,05$.

43. Distribuzzjoni normali u omoġenità tal-varjanza jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' test statistiku xieraq, eż. it-test ta' Shapiro-Wilk u t-test ta' Levene, rispettivament ($p \leq 0,05$). Jistgħu jsiru analiżi tal-Varjanza Unidirezzjonali (ANOVA) u testijiet multiparaguni sussegwenti. Jistgħu jintużaw testijiet b'bosta paraguni (eż. it-test ta' Dunnett) jew testijiet tax-xejriet rigressivi (eż. it-test ta' Williams) sabiex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi importanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u l-bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (għażla tat-test irrakkomandat skont id-Dokument 54 tal-OECD (9)). Inkella, jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. test-U-Bonferroni skont it-test tax-xejriet ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġu stabbiliti l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

44. Jekk sar test tal-limitu (paragun tal-kontroll u trattament wieħed biss) u l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriku (normalità, omoġenità) huma ssodisfati, ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-test ta' Student (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametriku, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati.

45. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

46. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test

— l-identità tas-sustanza kimika tat-test, il-lott u n-numru tas-CAS, il-purità;

— il-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log Kow, is-solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija) jekk disponibbli;

— il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-addittivi għandhom jiġu speċifikati jekk ma tiġix ittestjata s-sustanza kimika pura;

Organiżmi tat-test

— identifikazzjoni tal-ispeċijiet u l-fornitur tal-organiżmi tat-test, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-tgħammir u l-medda tal-etajiet tal-organiżmi tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

— deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura tal-esperiment;

— dettalji dwar it-tħejjija tal-ħamrija tat-test; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża ħamrija naturali (l-oriġini, l-istorja, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli, il-pH, il-kontenut ta' materja organika);

— il-kapjenza tal-ilma tal-ħamrija;

— deskrizzjoni tat-teknika użata biex is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata għall-ħamrija;

— il-kundizzjonijiet tat-test: l-intensità tad-dawl, id-durata taċ-ċikli ta' dawl-dlam, it-temperatura;

— deskrizzjoni tar-reġim tat-tmigħ, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati tat-tmigħ;

— il-pH u l-kontenut ta' ilma tal-ħamrija fil-bidu u fi tmiem it-test (kontroll u kull trattament);

— deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni u l-effiċjena tal-estrazzjoni;

Riżultati tat-test

— in-numru ta' żgħar stabbilit f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— in-numru ta' adulti u l-mortalità tagħhom (%) f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;

— deskrizzjoni tas-sintomi fiżjoloġiċi jew patoloġiċi ovvji jew tal-bidliet ċari fl-imġiba;

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;

— il-valuri tal-NOEC/LOEC, LC_x għall-mortalità u l-EC_x għar-riproduzzjoni (l-iktar LC_{50}, LC_{10}, EC_{50}, u EC_{10}) flimkien mal-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %. Graff tal-mudell adattat użat għall-kalkolu, l-ekwazzjoni tal-funzjoni tiegħu u l-parametri tiegħu (Ara (9));

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha siewja sabiex jiġu interpretati r-riżultati;

— is-saħħa tat-test propju jekk isir l-ittestjar tal-ipoteżi (9);

— id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test;

— il-validità tat-test;

— għall-NOEC, meta stmata, id-differenza identifikabbli minima.

LETTERATURA

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Il-Kapitolu C.36 ta' dan l-Anness, *Test tar-riproduzzjoni tad-Dud Predatorju (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) fil-ħamrija*.

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet effettivi kollha jingħataw bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull massa niexfa tal-ħamrija tat-test):

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

NOEC (konċentrazzjoni mingħajr effetti osservabbli) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha ma huwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi ħdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi ħdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbla mal-kontroll.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organiżmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC_{50} hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Is-sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

L-azzjonijiet ewlenin u skeda ta' żmien għat-twettiq ta' test tal-kollembolani

L-istadji tat-test jistgħu jinġabru fil-qosor kif ġej:

Ħin (ġurnata)	Azzjoni
– 23 sa – 26	Tħejjija tal-koltura tal-*F. fimetaria* sinkronika
– 14	Ħejji l-ħamrija artifiċjali (taħlit tal-kostitwenti nixfin) Ivverifika l-pH tal-ħamrija artifiċjali u aġġustaha kif xieraq Kejjel id-WHC mass tal-ħamrija
– 9 sa – 12	Tħejjija tal-koltura tal-*F. candida* sinkronika
– 2 sa – 7	Ħamrija mxarrba minn qabel
– 1	Qassam iż-żgħar f'lottijiet Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hemm bżonn ta' solvent
0	Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hija sustanza kimika solida, tinħall fl-ilma jew hemm bżonn ta' applikazzjoni fuq il-wiċċ. Kejjel il-pH tal-ħamrija u iżen il-kontenituri. Żid l-ikel. Daħħal il-kollembolani.
14	Test ta' sejbien tal-medda tal-*F. fimetaria*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż) Testijiet definittivi: Kejjel il-kontenut tal-umdità u erġ'imla l-ilma u żid 2-10 mg ħmira
21	Test definittiv tal-*F. fimetaria*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż) Sejbien tal-medda tal-*F. candida*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż)
28	Test definittiv tal-*F. candida*: Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-ħamrija u t-telf ta' ilma (piż)

Appendiċi 3

Gwida dwar it-trobbija u s-sinkronizzazzjoni ta' *F. fimetaria* u *F. candida*

Iż-żmien u d-durati mogħtijin f'din il-gwida għandhom jiġu vverifikati għal kull razza ta' kollembolani speċifiċi sabiex jiġi żgurat li t-twaqqit ikun biżżejjed għal żgħar sinkronizzati biżżejjed. Bażikament, l-inċidenza tal-ovipożizzjoni wara li l-adulti jiġu ttrasferiti għal substrat frisk u t-tifqis tal-bajd jiddetermina l-jum xieraq għall-ġbir tal-bajd u l-ġbir ta' żgħar sinkroniċi.

Huwa rrakkomandat li wieħed ikollu koltura permanenti ta' stokk li tikkonsisti f', eż., 50 kontenitur/dixx Petri. Il-koltura tal-istokk għandha tinżamm f'kundizzjoni tajba ta' tmigħ permezz ta' tmigħ, tisqija u tneħħija ta' ikel u karkassi qodma. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed kollembolani fis-substrat jista' jkun hemm inibizzjoni minħabba tkabbir fungali msaħħaħ. Jekk il-koltura tal-istokk tintuża spiss wisq għall-produzzjoni tal-bajd, il-koltura tista' tgħeja. Sinjali ta' għeja huma adulti mejtin u moffa fuq is-substrat. Il-bajd li jifdal mill-produzzjoni ta' annimali sinkroniċi jistgħu jintużaw biex tiġġedded il-koltura.

F'koltura sinkronika tal-*F. fimetaria*, issir distinzjoni bejn l-irġiel u n-nisa, primarjament skont id-daqs. L-irġiel huma ferm iżgħar min-nisa, u l-irġiel jimxu b'rata iktar mgħaġġla min-nisa. L-għażla korretta tas-sess ftit li xejn teħtieġ prattika u tista' tiġi kkonfermata bi spezzjoni mikroskopika taż-żona ġenitali (13).

1. Trobbija

1.a. *Tħejjija tas-substrat tal-koltura*

Is-substrat tal-koltura huwa materjal tal-kisi ta' Pariġi (sulfat tal-kalċju) b'karbonju attivat. Dan jipprovdi substrat niedi, bil-funzjoni li l-karbonju jassorbi gassijiet ta' skart u eskreti (14) (15). Jistgħu jintużaw forom differenti ta' karbonju biex jiġu ffaċilitati osservazzjonijiet tal-Kollembola. Pereżempju, jintuża karbonju mitħuna għal *F. candida* u *F. fimetaria* (li jipproduċi materjal tal-kisi iswed/griż ta' Pariġi):

Kostitwenti tas-substrat:

— 20 ml karbonju attivat

— 200 ml ilma distillat

— 200 ml materjal tal-kisi ta' Pariġi

jew

— 50 g karbonju mitħun attivat

— 260-300 ml ta' ilma distillat

— 400 g materjal tal-kisi ta' Pariġi.

It-taħlita tas-substrat titħalla toqgħod qabel tintuża.

1.b. *Tgħammir*

Il-kollembolani jinżammu f'kontenituri bħal dixxijiet Petri (90 mm × 13 mm), bil-qiegħ miksi b'saff ta' 0,5 cm substrat tal-karbonju/ materjal tal-kisi. Huma kkolturati f'20 ± 1 °C f'ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Il-kontenituri jridu jinżammu mxarrbin il-ħin kollu billi jiġi żgurat li l-umdità tal-arja fi ħdan il-kontenituri tkun ta' 100 %. Dan jista' jiġi ggarantit bil-preżenza ta' ilma ħieles fi ħdan il-materjal tal-kisi poruż, iżda tiġi evitata l-ġenerazzjoni ta' rita tal-ilma fuq wiċċ il-materjal tal-kisi. It-telf ta' ilma jista' jiġi evitat billi tiġi pprovduta arja ambjentali umda. Kwalunkwe individwu mejjet għandu jitneħħa mill-kontenituri, kif ukoll kwalunkwe ikel immuffat. Biex tiġi stimolata l-produzzjoni ta' bajd, hemm bżonn li l-annimali adulti jitqiegħdu f'dixxijiet Petri b'materjal tal-kisi ta' Pariġi ppreparat ġdid/substrat tal-karbonju.

1.c. *Sors tal-ikel*

Tintuża ħmira mnixxfa u mitħuna tal-furnar bħala l-unika provvista ta' ikel kemm għal *F. candida* kif ukoll *F fimetaria*. Ikel frisk jiġi pprovdut darba jew darbtejn fil-ġimgħa, sabiex tiġi evitata l-moffa. Jitqiegħed eżatt fuq il-materjal tal-kisi ta' Pariġi f'munzell żgħir. Il-massa tal-ħmira tal-furnar miżjuda għandha tiġi aġġustata għad-daqs tal-popolazzjoni tal-kollembolani, iżda bħala regola ġenerali 2-15-il mg huma biżżejjed.

2. **Sinkronizzazzjoni**

It-test għandu jsir b'annimali sinkronizzati sabiex jinkisbu annimali tat-test omoġeni tal-istess instar u daqs. Barra minn hekk, is-sinkronizzazzjoni tippermetti d-diskriminazzjoni tal-*F. fimetaria* rġiel u nisa mill-età ta' 3 ġimgħat 'il quddiem fuq il-bażi ta' dimorfiżmu sesswali, jiġifieri differenzi fid-daqs. Il-proċedura ta' hawn taħt hija suġġeriment fuq kif jinkisbu annimali sinkronizzati (l-istadji prattiċi mhumiex obbligatorji).

2.a. *Sinkronizzazzjoni.*

— Ħejji l-kontenituri b'saff ta' 0,5 cm ta' materjal tal-kisi ta' Pariġi/substrat tal-karbonju.

— Meta jiġu biex ibidu, ittrasferixxi 150-200 *F. fimetaria* adult u 50-100 *F. candida* mill-aħjar 15-20 kontenitur tal-koltura tal-istokk b'substrat ta' 4-8 ġimgħat għall-kontenituri u itmagħhom 15-il mg ħmira tal-furnar. Evita milli tinkludi liż-żgħar flimkien mal-adulti peress li l-preżenza taż-żgħar tista' tinibixxi l-produzzjoni tal-bajd.

— Żomm il-koltura f'20 ± 1 °C (il-medja għandha tkun ta' 20 °C) u ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Ara li jkun hemm ikel frisk disponibbli u l-arja hija saturata bl-ilma. Nuqqas ta' ikel jista' jwassal sabiex l-annimali jneħħu l-ħmieġ fuq il-bajd, u dan jirriżulta fi tkabbir fungali fuq il-bajd jew inkella l-*F. candida* jistgħu jikkannibalizzaw il-bajd tagħhom stess. Wara 10 ijiem, il-bajd jinġabar bir-reqqa b'labra u spatula u jitqiegħed f'karti tal-bajd' (biċċiet żgħar ta' karta filtru mxappa fil-materjal tal-kisi ta' Pariġi/ sospensjoni magħquda tal-karbonju) li jitqiegħdu f'kontentur b'substrat ta' materjal tal-kisi frisk/substrat tal-karbonju). Jiżdiedu ftit ħbub tal-ħmira mas-substrat sabiex jiġu attirati ż-żgħar u jkollhom jitilqu mill-karti tal-bajd. Importanti li l-karti tal-bajd u s-substrat jibqgħu umdi, jew inkella l-bajd jiġi deidratat. Inkella, l-annimali adulti jistgħu jitneħħew mill-kaxex tal-koltura tas-sinkronizzazzjoni wara li jipproduċu l-bajd għal jumejn jew tlieta.

— Wara tliet ijiem, ħafna mill-bajd fuq il-karti tal-bajd ser ikun faqqas, u wħud miż-żgħar jistgħu jispiċċaw taħt il-karti tal-bajd.

— Biex ikun hemm żgħar b'età ndaqs, il-karti tal-bajd b'bajd li ma faqqasx jitneħħew mid-dixx Petri bil-forċipi. Iż-żgħar, issa 0-3 ijiem, jibqgħu fid-dixx u jintemgħu ħmira tal-furnar. Il-bajd li ma jfaqqasx jintrema.

— Il-bajd u ż-żgħar li faqqsu jiġu kkolturati bl-istess mod bħall-adulti. B'mod partikolari għall-*F. fimetaria*, għandhom jittieħdu l-miżuri li ġejjin: żgurar li jkun hemm biżżejjed ikel frisk, jitneħħa l-ikel qadim li qed jimmoffa, wara ġimgħa ż-żgħar jitqassmu f'dixxijiet Petri ġodda diment li d-densità tkun ta' iktar minn 200.

2.b. *Ġestjoni tal-kollembolani fil-bidu tat-test*

— *F. candida* b'età ta' 9-12-il jum jew il-*F. fimetaria* b'età ta' 23-26 jum jinġabru, eż. b'irdigħ, u jinħelsu f'kontenitur żgħir b'materjal tal-kisi mxarrab/substrat tal-karbonju u l-kundizzjoni fiżika tagħhom tiġi vverifikata taħt il-mikroskopju binokulari (annimali li korrew u li weġġgħu jitneħħew). Il-passi kollha għandhom jittieħdu filwaqt li l-kollembolani jinżammu f'atmosfera niedja biex jiġi evitat stress minn nixfa, eż. billi jintużaw uċuħ imxarrbin ecc.

— Dawwar il-kontenitur minn fuq għal isfel u taptap fuqu biex tittrasferixxi l-kollembolani fil-ħamrija. Elettriku statiku għandu jiġi newtralizzat, inkella l-annimali jaf jaqbdu u jtiru fl-arja, jew jeħlu mal-ġenb tal-kontenitur tat-test u jinxfu. Għal newtralizzazzjoni jistgħu jintużaw jonizzatur jew biċċa niedja taħt il-kontenitur.

— L-ikel għandu jitferrex fuq il-wiċċ kollu tal-ħamrija u mhux biss f'munzell wieħed.

— Matul it-trasportar u matul il-perjodu ta' ttestjar, għandhom jiġu evitati daqqiet jew disturb fiżiku ieħor fuq il-konterituri tat-test, peress li dan jista' jżid l-kompattar tal-ħamrija, u jxekkel l-interazzjoni bejn il-kollembolani.

3. **Speċijiet ta' Kollembolani alternattivi**

Jistgħu jingħażlu speċijiet ta' kollembolani oħrajn għall-ittestjar skont dan il-metodu ta' ttestjar bħal Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. L-ewwel iridu jiġu ssodisfati numru ta' prerekwiżiti qabel ma jintużaw speċijiet alternattivi:

— Għandhom jiġu identifikati bla ekwivoki;

— Għandha tiġi spjegata l-motivazzjoni wara l-għażla tal-ispeċijiet;

— Għandu jiġi żgurat li l-bijoloġika riproduttiva tkun inkluża fil-fażi tal-ittestjar sabiex tkun mira potenzjali matul l-espożizzjoni;

— Il-ġrajja għandha tkun magħrufa: l-età tal-maturità, id-durata tal-iżvilupp tal-bajd, u l-instars soġġetti għal espożizzjoni;

— Il-kundizzjonijiet ottimali għat-tkabbir u r-riproduzzjoni għandhom jiġu pprovduti mis-substrat tat-test u l-provvista tal-ikel;

— Il-varjabbiltà għandha tkun baxxa biżżejjed biex tinħareġ stima preċiża u eżatta tat-tossiċità.

Appendiċi 4

Estrazzjoni u għadd tal-annimali

1. **Jistgħu jintużaw żewġ metodi ta' estrazzjoni.**

1.a. L-ewwel metodu: Jista' jintuża estrattur tal-gradjent bit-temperatura kkontrollata bbażat fuq il-prinċipji minn MacFadyen (1). Is-sħana li ġejja minn element tat-tisħin fil-quċċata tal-kaxxa ta' estrazzjoni (irregolata minn termistur imqiegħed fuq wiċċ il-kampjun tal-ħamrija). It-temperatura fil-likwidu mkessaħ madwar ir-reċipjent miġbur huwa rregolat permezz ta' termistur li jinsab fil-wiċċ tal-kaxxa tal-ġbir (imqiegħda taħt il-qalba tal-ħamrija). It-termisturi huma mqabbdin ma' unità ta' kontroll programmabbli li jżid it-temperatura skont skeda pprogrammata minn qabel. L-annimali jinġabru fil-kaxxa ta' ġbir imkessħa (2 °C) b'saff tal-qiegħ tal-materjal tal-kisi ta' Pariġi/karbonju. L-estrazzjoni tinbeda f'25 °C u t-temperatura tiżdied b'5 °C b'mod awtomatiku kull 12-il siegħa u għandha durata totali ta' 48 siegħa. Wara 12-il siegħa f'40 °C l-estrazzjoni tkun lesta.

1.b. It-tieni metodu: Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni sperimentali, in-numru ta' Kollembola żgħar jiġi vvalutat biż-żamma fil-wiċċ. Għal dan il-għan, it-test isir fir-reċipjenti b'volum ta' bejn wieħed u ieħor 250 ml. Fi tmiem it-test, jiddaħħal 200 ml ilma distillat. Il-ħamrija titħawwad bilmod b'pinzell fin biex il-Kollembola jkunu jistgħu jżommu f'wiċċ l-ilma. Jista' jiżdied ammont żgħir, madwar 0,5 ml, ta' kolorant fotografiku Kentmere mal-ilma biex jgħin fl-għadd billi jżid il-kuntrast bejn l-ilma u l-Kollembola bojod. Il-kolorant mhuwiex tossiku għall-Kollembola.

2. **L-għadd:**

L-għadd tal-kwantità jista' jsir bl-għajnejn jew taħt mikroskopju ħafif bl-użu ta' grilja mqiegħda fuq ir-reċipjent taż-żamma fil-wiċċ jew permezz ta' ritratt tal-wiċċ ta' kull reċipjent u billi wara jingħaddu l-Kollembola fuq ritratti stampati kbar jew slides tal-projjettur. L-għadd jista' jsir ukoll bl-użu ta' tekniki ta' pproċessar ta' immaġnijiet diġitali (12). It-tekniki kollha għandhom jiġu vvalidati.

Appendiċi 5

Determinazzjoni tad-WHC massima tal-ħamrija

Instab li l-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-ħamrija huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Ħamrija — Effetti tas-sustanzi niġġiesa fuq il-ħniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni).

Iġbor kwantità definita (eż. 5 g) tas-substrat tal-ħamrija tat-test billi tuża apparat tal-kampjunar xieraq (tubu trapan eċċ.). Għatti qiegħ it-tubu b'biċċa mxarrba ta' karta filtru u mbagħad qiegħdu fuq xtilliera f'banjumarija. It-tubu għandu jitgħaddas b'mod gradwali sakemm il-livell tal-ilma jkun fuq wiċċ il-ħamrija. Imbagħad għandu jitħalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-ħamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-ħamrija għandu jitħalla jitbattal għal perjodu ta' saghtejn billi t-tubu jitqiegħed fuq medda ramel kwarzuż mitħun fin u mxarrab ħafna li jinsab f'reċipjent mgħotti (biex jiġi evitat tnixxif). Imbagħad, il-kampjun għandu jintiżen, imnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapjenza tal-ilma (WHC) għandha tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f'\% ta' massa niexfa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa niexfa ta' substrat

Appendiċi 6

Determinazzjoni tal-pH tal-ħamrija

Il-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-pH ta' ħamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija fl-ISO DIS 10390: Kwalità tal-Ħamrija — Stabbiliment tal-pH.

Kwantità ddefinita ta' ħamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-ħamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' ħamrija) f'ħames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku ($CaCl_2$). Is-sospensjoni mbagħad titħallat sew għal ħames minuti u mbagħad titħalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel bl-użu ta' metru tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl bl-użu ta' sensiela xieraq ta' soluzzjonijiet ta' bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

C.40. **TEST TAT-TOSSIĊITÀ TAĊ-ĊIKLU TAL-ĦAJJA TAL-KIRONOMIDI F'ILMA TAN-NAQAL BL-UŻU TA' ILMA MIŻJUD JEW NAQAL MIŻJUD**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 233 (2010) tal-OECD. Tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tal-espożizzjoni tul il-ħajja tas-sustanzi kimiċi fuq id-ditteru tal-ilma ħelu *Chironomus* sp., billi jkopri bis-sħiħ l-ewwel ġenerazzjoni (ġenerazzjoni P) u l-parti bikrija tat-tieni ġenerazzjoni (ġenerazzjoni F1). Huwa estensjoni tal-metodi ta' ttestjar eżistenti C.28 (1) jew C.27 (15) bl-użu ta' xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma miżjud jew xenarju tan-naqal miżjud, rispettivament. Jieħu f'kunsiderazzjoni l-protokolli eżistenti dwar l-ittestjar tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus dilutus* (qabel imsejħin *C. tentans* (2)) li ġew żviluppati fl-Ewropa u l-Amerika ta' Fuq (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) u li mbagħad sarilhom ringtest (1) (7) (10) (11) (12). Jistgħu jintużaw speċijiet kironomidi oħrajn iddokumentati sew, eż. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Id-durata sħiħa tal-espożizzjoni hija ta' madwar 44 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u –madwar 100 jum għal *C. dilutus*.

2. Kemm ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma kif ukoll dak tan-naqal huma deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. L-għażla ta' xenarju ta' espożizzjoni xieraq jiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma, b'żieda mal-kolonna tal-ilma, huwa maħsub sabiex jistimola avveniment ta' deriva sprejjata tal-pestiċidi u jkopri l-konċentrazzjoni massima inizjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. Iż-żieda mal-ilma hija siewja wkoll għal tipi oħrajn ta' espożizzjoni (inkluż it-tixrid ta' sustanzi kimiċi), iżda mhux għal proċessi ta' akkumulazzjoni fi ħdan in-naqal li jdum iktar mill-perjodu tat-test. F'dak il-każ, u anki meta l-iskol ikun ir-rotta ewlenija ta' dħul ewlenija tal-pestiċidi fil-korpi tal-ilma, disinn ta' naqal miżjud jista' jkun iktar xieraq. Jekk ikun hemm xenarji ta' espożizzjoni oħrajn ta' interess, id-disinn tat-test jista' jiġi adattat malajr. Pereżempju, jekk id-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-fażi tal-ilma u s-saff tan-naqal ma tkunx ta' interess u l-assorbiment fin-naqal irid jiġi minimizzat, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tan-naqal artifiċjali surrogat (eż. ramel kwarzuż).

3. Sustanzi kimiċi li jeħtieġu testijiet ta' organiżmi li jgħixu fin-naqal jistgħu jibqgħu fin-naqal tul perjodi twal. L-organiżmi li jgħixu fin-naqal jistgħu jiġu esposti għal għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u ż-żmien meħud għal kull waħda sabiex tikkontribwixxi għall-effett tossiku globali, tiddependi mill-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika. Għal sustanzi kimiċi b'assorbiment qawwi jew għal sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal, l-inġestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni importanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' sustanzi kimiċi ferm lipofiliċi, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-ikel imdaħħal fin-naqal qabel tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 31). Għalhekk, huwa possibbli li jiġu inklużi r-rotot kollha ta' espożizzjoni u l-istadji kollha tal-ħajja.

4. Il-punti ta' tmiem imkejlin huma n-numru totali ta' adulti li jfeġġu (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), ir-rata ta' żvilupp (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), il-proporzjon tas-sessi tal-adulti li feġġew bis-sħiħ u ħajjin (kemm għall-1 ġenerazzjoni kif ukoll għat-2), in-numru taċ-ċwiemi bajd għal kull mara (l-ewwel ġenerazzjoni biss) u l-fertilità taċ-ċwiemi bajd (l-ewwel ġenerazzjoni biss).

5. Huwa ferm rakkomandat naqal ifformulat. Naqal ifformulat għandu bosta vantaġġi fuq naqal naturali:

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas għaliex tagħmel parti minn 'matriċi standardizzat' riproduċibbli u titneħħa l-ħtieġa li jinkiseb naqal nadif mhux ikkontaminat;

— it-testijiet jistgħu jinbdew fi kwalunkwe ħin mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġjonali fin-naqal tat-test u ma hemm ebda bżonn ta' pretrattament tan-naqal biex titneħħa fawna indiġena;

— inqas spejjeż meta mqabbel mal-ġbir fuq il-post ta' biżżejjed kwantitajiet għal testijiet ta' rutina;

— in-naqal ifformulat jippermetti li jsiru paraguni tat-tossiċità bejn l-istudji u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi kif xieraq (3).

6. Id-definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel larva kironomidi instar huma esposti għal medda ta' konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'sistema tal-ilma tan-naqal. It-test jibda billi titqiegħed l-ewwel larva instar (l-ewwel ġenerazzjoni) fil-bekkijiet tat-test li fihom naqal miżjud jew inkella s-sustanza kimika tat-test tiġi miżjuda fl-ilma wara li tiddaħħal il-larva. Jiġu vvalutati l-emerġenza kironomida, iż-żmien sal-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin. L-adulti li feġġew huma ttrasferiti f'gaġeġ tat-tgħammir, biex jitħaffu l-ġmigħ, it-tgħammir u l-ovipożizzjoni. Jiġu vvalutati n-numru ta' ċwiemi bajd prodotti u l-fertilità tagħhom. Minn dawn iċ-ċwiemi bajd, jinkisbu l-ewwel larva instar tat-tieni ġenerazzjoni. Dawn il-larva jitqiegħdu f'bekkijiet tat-test ippreparati ġodda (il-proċedura ta' żieda bħal dik għall-1 ġenerazzjoni) sabiex tiġi stabbilita l-vijabbiltà tat-2 ġenerazzjoni permezz ta' valutazzjoni tal-feġġa tagħhom, iż-żmien għall-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin (preżentazzjoni skematika tat-test taċ-ċiklu tal-ħajja hija pprovduta fl-Appendiċi 5). Id-dejta kollha tiġi analizzata jew permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaġuna tnaqqis ta' X % fil-punt ta' tmiem relevanti, jew bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi sabiex tiġi stabbilita Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC). Din tal-aħħar teħtieġ paragun tar-risponsi għat-trattament bir-risponsi ta' kontroll xierqa bl-użu ta' testijiet statistiċi. Ta' min jinnota li fix-xenarju tal-ilma miżjud, fil-każ ta' sustanzi kimiċi b'degradazzjoni veloċi, l-istadji tal-ħajja aħħarin ta' kull ġenerazzjoni (eż. il-fażi ta' pupa) jistgħu jkunu esposti għal livell ta' konċentrazzjoni konsiderevolment inqas fl-ilma tal-madwar milli fl-ewwel larva instar. Jekk dan huwa ta' tħassib, u hemm bżonn ta' livell ta' espożizzjoni paragunabbli għal kull stadju tal-ħajja, jistgħu jiġu kkunsidrati l-emendi li ġejjin tal-metodu ta' ttestjar:

— serje parallela b'żidiet fi stadji differenti tal-ħajja, jew

— żidiet ripetuti (jew tiġdid tal-ilma tal-madwar) tas-sistema tat-test matul iż-żewġ fażijiet ta' ttestjar (l-ewwel u t-tieni ġenerazzjonijiet), filwaqt li l-intervalli taż-żidiet (tiġdid) għandhom jiġu aġġustati għall-karatteristiċi tal-eżitu tas-sustanza kimika tat-test.

It-tali emendi huma fattibbli biss fix-xenarju tal-ilma miżjud, iżda mhux fix-xenarju bin-naqal miżjud.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

8. Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar u l-log K_{ow} tagħha, għandha tkun magħrufa l-partizzjoni mkejla jew ikkalkolata fin-naqal u l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal. Għandu jkun hemm disponibbli metodu analitiku affidabbli biex tiġi kkwantifikata s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal bi preċiżjoni u limitu ta' detezzjoni magħrufin u rrapportati. Informazzjoni siewja tinkludi l-formula strutturali u l-purità tas-sustanza kimika tat-test. L-eżitu kimiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. dissipazzjoni, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) huwa siewi wkoll. F'(16) hija pprovduta gwida ulterjuri għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi bi karatteristiċi fiżikokimiċi li jagħmluhielhom diffċli biex isirilhom it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jiġu ttestjati b'mod perjodiku bħala mezz sabiex jiġi żgurat li s-sensittività tal-popolazzjoni tal-laboratorju ma nbidlitx. Bħal bid-dafnidi, biżżejjed li jsir test akut fuq 48 siegħa (skont 17). Madankollu, sakemm ikun hemm linja gwida akuta vvalidata disponibbli, jista' jiġi kkunsidrat test skont il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness. Eżempji ta' tossikanti ta' referenza użati b'suċċess fir-ringtests u studji ta' validazzjoni huma: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, klorur tal-kadmju u klroru tal-potassju. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Sabiex it-test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— il-feġġa medja fit-trattament tal-kontroll għandha tkun tal-inqas 70 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaż-żewġ ġenerazzjonijiet (1) (7);

— għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, 85 % tal-insetti adulti totali li feġġew mit-trattament tal-kontroll fiż-żewġ ġenerazzjonijiet għandha ssehh bejn il-jum 12 u 23 wara t-tidħil tal-ewwel larva instar fir-reċipjenti; għal *C. dilutus*, huwa aċċettabbli perjodu ta' 20 sa 65 jum;

— il-proporzjon medju tas-sessi tal-adulti li feġġew kompletament u ħajjin (bħala frazzjoni ta' nisa jew irġiel) fit-trattament tal-kontroll taż-żewġ ġenerazzjonijiet għandu jkun tal-inqas 0,4, iżda ma jaqbiżx iż-0,6;

— għal kull gaġġa tat-tgħammir, in-numru ta' ċwiemi bajd fil-kontrolli tal-ewwel ġenerazzjoni għandu jkun tal-inqas 0,6 għal kull mara miżjuda fil-gaġġa tat-tgħammir;

— il-frazzjoni taċ-ċwiemi bajd fertili f'kull gaġġa tat-tgħammir tal-kontrolli tal-ewwel ġenerazzjoni għandha tkun tal-inqas 0,6;

— fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaż-żewġ ġenerazzjonijiet, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun tal-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV ([1])), u l-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 fir-reċipjenti tat-test kollha;

— it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,0 °C.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test u gaġeġ tat-tgħammir

11. Il-larva hija esposta f'bekki tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru ta' madwar 8,5 cm (ara l-Appendiċi 5). Reċipjenti oħrajn huma xierqa, iżda għandhom jiggarantixxu fond tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Il-wiċċ tan-naqal għandu jkun biżżejjed sabiex jingħataw 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar għandu jkun ta' madwar 1:4. Bħala minimu għandhom jintużaw gaġeġ tat-tgħammir (tal-inqas 30 cm fit-tliet dimensjonijiet kollha kemm huma) b'xibka tal-wajer (daqs tax-malja madwar 1 mm) fin-naħa ta' fuq u fil-ġenb tal-gaġġa (ara l-Appendiċi 5). F'kull gaġġa jitqiegħed dixx kristallizzanti ta' 2 l, li fih ilma u naqal tat-test, għal ovipożizzjoni. Anki għad-dixx kristallizzanti, il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar għandu jkun ta' madwar 1:4. Wara li ċ-ċwiemi bajd jinġabru mid-dixx kristallizzanti, jitqiegħdu fi platt mikrotiter bi 12-il toqba (ċima waħda għal kull toqba li fiha tal-inqas 2,5 ml ilma mid-dixx kristallizzanti miżjud) u wara dan il-platti jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti oħrajn xierqa sabiex jinżammu ċ-ċwiemi bajd. Bl-eċċezzjoni tal-platti tal-mikrotiter, ir-reċipjenti kollha tat-test u l-apparati kollha l-oħrajn li ser jidħlu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament interi ieħor (eż. Politetrafluworoetilen).

Għażla tal-ispeċijiet

12. Idealment, l-ispeċi li għandha tintuża fit-test hija *Chironomus riparius*. Tista' tintuża *C. yoshimatsui*. Tista' tintuża *C. dilutus* ukoll iżda diffiċli timmaniġġjaha u teħtieġ perjodu ta' ttestjar itwal. Id-dettalji dwar il-metodi tal-koltura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal *C. riparius*. Hemm informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet tal-koltura disponibli għal *C. dilutus* (5) u *C. yoshimatsui* (14). L-identifikazzjoni tal-ispeċi għanda tiġi kkonfermata qabel l-ittestjar iżda mhijiex meħtieġa qabel kull test jekk l-organiżmi jkunu ġejjin minn koltura meħuda mil-laboratorju stess.

Naqal

13. Idealment għandu jintuża naqal ifformulat (imsejjaħ ukoll naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (tal-inqas il-pH, il-kontenut ta' karbonju organiku, l-istabbiliment ta' parametri oħrajn bħall-proporzjon C/N u l-granulometrija huma rrakkomandati wkoll) u għandu jkun ħieles minn kwalunkwe kontaminazzjoni u organiżmu ieħor li jista' jikkompeti mal-larva kironomida jew jikkonsmaha. Qabel l-ittestjar huwa rrakkomandat ukoll li n-naqal jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fil-kundizzjonijiet tat-test. In-naqal ifformulat li ġej, kif deskritt f'(1), huwa rrakkomandat (1) (20) (21):

a. 4-5 % pit (piż xott): qrib pH 5,5 sa 6,0 kemm jista' jkun; importanti li jintuża pit f'forma ta' trab, mitħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss;

b. 20 % tafal tal-kawlina (piż xott) (idealment il-kontenut tal-kawlina jkun iktar minn 30 %);

([1]) F'20 °C taħt pressjoni atmosferika standard, l-ASV fl-ilma ħelu huwa ta' 9,1 mg/l (60 % isarraf f'5,46 mg/l)

c. 75-76 % ramel kwarzuż (piż xott) (ir-ramel fin għandu jkun predominanti b'iktar minn 50 fil-mija tal-partikoli bejn 50 u 200 μm);

d. Jiddaħħal ilma dejonizzat sabiex tinkiseb umdità tat-taħlita finali fil-medda ta' 30–50 %;

e. Il-karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura ($CaCO_3$) jiżdied sabiex tiġi aġġustata l-pH tat-taħlita finali tan-naqal għal 7,0 ± 0,5;

f. Il-kontenut tal-karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun ta' 2 % (± 0,5 %) u jrid jiġi aġġustat billi jintużaw l-ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

14. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina u r-ramel għandu jkun magħruf. Il-komponenti tan-naqal għandhom jiġu kkontrollati sabiex jiġi żgurat li ma hemmx kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforużi). Eżempju għat-tħejjija tan-naqal iffrmulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit tal-kostitwenti nixfin huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. partikoli tal-pit li jżommu fil-wiċċ), u li l-pit jew in-naqal huwa kkondizzjonat biżżejjed.

Ilma

15. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Kwalunkwe ilma xieraq, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit deklorinat huma aċċettabbli bħala ilma tal-koltura u ilma tat-test, jekk il-kironomidi jgħixu fih mingħajr ma juru sinjali ta' stress sakemm jitlestew il-koltura u t-testijiet. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandha tkun ta' bejn 6 u 9 u l-ebusija totali mhijiex ikbar minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Madankollu, jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma tal-ebusija inferjuri (u b'hekk, f'din is-sitwazzjoni ma għandux jintuża l-Elendt Medium M4). L-istess tip ta' ilma għandu jintuża tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu tal-inqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi setgħu nbidlu ħafna.

Soluzzjonijiet ewlenin — Ilma miżjud

16. a. Il-konċentrazzjonijiet tat-test huma kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet tal-kolonna tal-ilma, jiġifieri l-ilma ta' fuq in-naqal. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin normalment jitħejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Idealment is-soluzzjonijiet ewlenin jitħejjew billi tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tat-test. L-użu ta' solventi jew dispersivi jista' jkun meħtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Eżempji ta' solventi xierqa huma aċetun, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetileter, dimetilformamid u trietilen glikol. Id-dispersivi li jistgħu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, metilċelluloża 0,01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni tal-aġent solubilizzanti fil-midjum tat-test finali għandha tkun minima (jiġifieri ≤ 0,1 ml/l) u għandha tkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent solubilizzanti, ma għandu jkollu ebda effett importanti fuq is-sopravivenza kif muri minn kontroll bis-solvent meta mqabbel ma' kontroll negattiv (bl-ilma). Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali materjali.

Soluzzjonijiet ewlenin — Naqal miżjud

16. b. In-naqal miżjud fil-konċentrazzjoni magħżula normalment jitħejja billi tiżdied soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test direttament fin-naqal. Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test dissolta f'ilma dejonizzat titħallat man-naqal ifformulat mitħna ta' rrumblar, ħallat tal-għalf jew taħlit bl-idejn. Jekk ftit li xejn tinħall fl-ilma, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi dissolta f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku xieraq (eż. essan, aċetun jew kloroformi). Imbagħad is-soluzzjoni titħallat ma' 10 g ramel kwarzuż fin għal kull reċipjent tat-test. Is-solvent jitħalla jevapora u għandu jitneħħa kompletament mir-ramel; imbagħad ir-ramel jitħallat mal-ammont xieraq tan-naqal. Jistgħu jintużaw biss aġenti li jivvolatilizzaw malajr sabiex iħollu,

jifirxu jew jemulsifikaw is-sustanza kimika tat-test. Ta' min ifakkar li r-ramel ipprovdut mis-sustanza kimika tat-test u t-taħlita ta' ramel għandu jittieħed f'kunsiderazzjoni meta jitħejja n-naqal (jiġifieri, b'hekk, in-naqal għandu jitħejja b'inqas ramel). Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal hija mifruxa u mqassma sew fin-naqal. Jekk hemm bżonn, is-subkampjuni jistgħu jiġu analizzati sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test huwa marbut mal-għażla tan-numru u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull konċentrazzjoni, in-numru ta' larva għal kull reċipjent, in-numru ta' dixxijiet kristallizzanti u l-gaġeġ tat-tgħammir. Id-disinji għall-EC_x, NOEC u test tal-limitu huma deskritti hawn taħt.

Disinn għall-analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni effettiva (EC_x,) u l-medda tal-konċentrazzjoni li huwa ta' interess l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuqha, għandha tkun ikkalibrata mit-test, b'tali mod li l-punt ta' tmiem ma jiġix estrapolat barra l-konfini tad-dejta ġġenerata. Għandha tiġi evitata estrapolazzjoni ferm inqas mill-inqas jew ogħla mill-ogħla konċentrazzjoni. Test preliminari tas-sejbien tal-medda skont il-Metodi ta' Ttestjar C.27 jew C.28 jista' jkun siewi meta tiġi biex tingħażel medda xierqa tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

19. Għal approċċ tal-EC_x, huma meħtieġa tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet u tmien irreplikati għal kull konċentrazzjoni. Għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw żewġ gaġeġ tat-tgħammir (A u B). It-tmien irreplikati jinqasmu f'żewġ gruppi ta' erba' rreplikati biex iservu kull gaġġa tat-tgħammir. Dan it-tagħqid tal-irreplikati huwa meħtieġ minħabba n-numru ta' insetti meħtieġa fil-gaġġa għall-valutazzjonijiet tar-riproduzzjoni tal-ħsejjes. Madankollu, it-tieni ġenerazzjoni għandha tmien irreplikati wkoll, li l-ewwel bdew fil-popolazzjonijiet esposti fil-gaġeġ tat-tgħammir. Il-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet li fihom il-kurva ta' doża — rispons ikollha inklinazzjoni grafika baxxa). In-numru ta' rreplikati f'kull trattament jista' jitnaqqas sa sitta (tlieta f'kull gaġġa tat-tgħammir) jekk jiżdied in-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti. Iż-żieda tan-numru ta' rreplikati jew it-tnaqqis tad-daqs tal-intervalli tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar madwar l-EC_X.

Disinn għall-istima ta' NOEC

20. Għal approċċ tal-NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas tmien irreplikati (4 għal kull gaġġa tat-tgħammir, A u B) u l-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. In-numru ta' rreplikati għandu jkun biżżejjed sabiex tiġi żgurata saħħa statistika adegwata sabiex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % (α = 0,05). Għar-rata tal-iżvilupp, il-fekondità u l-fertilità, normalment xieraq li ssir analiżi tal-varjana (ANOVA), segwita minn test ta' Tunnett jew ta' Williams (22-25). Għall-proporzjon tal-feġġa u l-proporzjon tas-sessi, it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni Bonferroni), jew it-test Mantel-Haentzal jistgħu jkunu xierqa.

Test tal-limitu

21. Jista' jsir test tal-limitu (konċentrazzjoni waħda tat-test u kontroll(i)) jekk ma jiġu osservati ebda effetti fit-test preliminari fakultattiv ta' sejbien tal-medda sa konċentrazzjoni massima. L-iskop tat-test tal-limitu huwa li jindika li nstab xi effett tossiku tas-sustanza kimika f'livelli ogħla mill-konċentrazzjoni limitu ttestjata. Huwa ssuġġerit li għall-ilma jintużaw 100 mg/l u għan-naqal 1 000 mg/kg (piż xott). Normalment, ikun hemm bżonn ta' minimu ta' tmien irreplikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera saħħa statistika adegwata biex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % (α = 0,05). B'risponsi metriċi (eż. rata tal-iżvilupp), it-test-t huwa metodu statistiku xieraq jekk id-dejta tissodisfa r-rekwiżiti ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġeni). Jista' jintuża test-t tal-varjanza mingħajr ekwivoku jew test mhux parametriku, bħat-test ta' Wilcoxon-Mann-Whitney, jekk ma jkunux issodisfati dawn ir-rekwiżiti. Bil-proporzjon tal-feġġa, xieraq li jintuża t-test eżatt ta' Fisher.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-espożizzjoni

Tħejjija tas-sistema tal-ilma-naqal (ilma miżjud)

22. a. Naqal ifformulat (ara l-paragrafi 13-14 u l-Appendiċi 3) jiddaħħal f'kull reċipjent tat-test u dixx kristallizzanti sabiex jiġi fformat saff ta' tal-inqas 1,5 cm (għad-dixx kristallizzanti jista' jkun kemxejn inqas) iżda mhux iktar minn 3 cm. L-ilma (ara l-paragrafu 15) jiżdied sabiex il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal u l-fond tal-ilma ma jaqbiżx il-1:4. Wara li jitħejjew ir-reċipjenti tat-test, is-sistema tan-naqal-ilma għandha titħalla tieħu arja ħafifa għal madwar sebat ijiem qabel ma tiddaħħal l-ewwel larva instar tal-ewwel jew it-tieni ġenerazzjoni (ara l-paragrafu 14 u l-Appendiċi 3). Is-sistema tan-naqal-ilma tad-dixxijiet kristallizzanti ma tingħatax arja matul it-test, peress li dawn ma għandhomx bżonn isostnu s-sopravivenza tal-larva (qabel ma jfaqqsu ċ-ċwiemi bajd diġà miġburin). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin matul iż-żieda tal-ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik filwaqt li jitferra' l-ilma fiha. Id-diska titneħħa eżatt wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn.

Tħejjija tas-sistema ta' ilma-naqal (naqal miżjud)

22. b. Kull naqal miżjud imħejji skont il-paragrafu 16b jitqiegħed fir-reċipjent u dixx kristallizzanti u jitferra' l-ilma tal-madwar sabiex jiġi prodott proporzjon tal-volum tan-naqal-ilma ta' 1:4. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jvarja bejn 1,5 sa 3 cm (jista' jkun kemxejn inqas għad-dixx kristallizzanti). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin meta jitferra' l-ilma fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik meta jkun qed jitferra' l-ilma, u d-diska titneħħa għal kollox wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn. Ladarba jitħejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment tkun tista' ssir partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-fażi milwiema (4) (5) (7) (18). Idealment dan għandu jsir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u tal-arja użati fit-test. Iż-żmien għall-ekwilibrazzjoni xierqa huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza kimika, u jista' jvarja bejn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa ħames ġimgħat. Peress li sa dan iż-żmien ħafna sustanzi kimiċi jibdew jiddegradaw, m'hemmx bżonn li wieħed jistenna ekwilibriju, iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' 48 siegħa għall-ekwilibrazzjoni. Madankollu, meta n-nofs ħajja tad-degradazzjoni tas-sustanza kimika fin-naqal ikun magħruf bħala wieħed twil (ara l-paragrafu 8), il-ħin għall-ekwilibrazzjoni jista' jiġi estiż. Fi tmiem dan il-perjodu mtawwal għall-ekwilibrazzjoni, għandha titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjoni u waħda inqas (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test jippermettu sabiex jiġi kkalkolat il-bilanċ tal-massa u jinħarġu r-riżultati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet imkejlin.

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk hemm bżonn, matul l-istudju jista' jiżdied l-ilma biex ipatti għall-evaporazzjoni bil-għan li jerġa' jintlaħaq il-volum oriġinali. Dan għandu jsir bl-użu ta' ilma distillat jew dejonizzat sabiex tiġi evitata kwalunkwe akkumulazzjoni ta' melħ. Id-dixxijiet kristallizzanti fil-gaġeġ tat-tgħammir mhumiex mgħottijin u jistgħu, iżda mhux bilfors, jiġu aġġustati sabiex ipattu għat-telf tal-ilma matul il-perjodu tat-test, peress li ċ-ċwiemi bajd jidħlu f'kuntatt mal-ilma għal madwar jum wieħed biss u d-dixxijiet jintużaw biss għal perjodu qasir tat-test.

Tidħil tal-organiżmi tat-test

24. Erba' sa ħamest ijiem qabel ma tiddaħħal l-ewwel larva għall-ewwel ġenerazzjoni, il-mases tal-bajd għandhom jittieħdu mill-koltura u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum tal-koltura. Jista' jintuża midjum antik mill-koltura tal-istokk jew inkella midjum imħejji ġdid. Xorta waħda dejjem għandu jiżdied ammont żgħir ta' ikel, eż. ftit taqtiriet ta' filtrat minn sospensjoni mitħuna sew ta' għalf tal-ħut imsaffaf, mal-midjum tal-koltura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss mases ta' bajd frisk. Is-soltu, il-larva tibda taqqas ftit tal-jiem wara li l-adulti jbidu (jumejn sa 3 ijiem għal *C. riparius* f'20 °C u bejn jum u erbgħa għal *C. dilutus* at 23 °C u *C. yoshimatsui* f'25 °C) u t-tkabbir tal-larva jseħħ f'erba' instars, b'kull wieħed b'durata ta' bejn 4 u 8 ijiem. Fit-test għandu jintuża l-ewwel larva instar (massimu ta' 48 siegħa wara t-tifqis). L-istadju instar tal-larva jista' jiġi vverifikat billi tintuża l-wisgħa tal-kapsula tar-ras (7).

25. L-ewwel għoxrin larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni jiġu allokati għal għarrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma jibqax jingħata l-arja meta tkun qed tiddaħħal il-larva fir-reċipjenti tat-test u dan għandu jibqa' jseħħ għal 24 siegħa wara li tiddaħħal il-larva (ara l-paragrafu 32). Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull konċentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull konċentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_X u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull konċentrazzjoni). Fid-disinn tan-naqal miżjud, l-espożizzjoni tibda billi tiddaħħal il-larva.

Ilma tal-madwar miżjud

26. Erbgħa u għoxrin siegħa wara li tiddaħħal l-ewwel larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni, is-sustanza kimika tat-test tiżdied fil-kolonna tal-ilma tal-madwar, u terġa' tingħata ftit arja (għal emendi possibbli fid-disinn tat-test, ara l-paragrafu 7). Jiġu applikati volumi żgħar tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Fid-disinn tal-ilma miżjud, l-espożizzjoni tibda biż-żieda fl-ilma (jiġifieri jum wara li tiddaħħal il-larva).

Ġbir tal-adulti li feġġew

27. L-insetti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni jinġabru tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (ara l-punt 36) mir-reċipjenti tat-test bl-użu ta' aspiratur, eżawrient jew apparat simili (ara l-Appendiċi 5). Għandha tingħata attenzjoni speċjali sabiex l-adulti ma jġarrbux ġrieħi. L-insetti miġburin mill-erba' reċipjenti tat-test fi ħdan trattament wieħed jinħelsu f'gaġġa tat-tgħammir li kienu ġew assenjati fiha. Fil-jum tal-ewwel feġġa (ta' raġel), id-dixxijiet kristalizzanti jiżdiedu permezz ta' pipetta b'volum żgħir tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma (id-disinn tal-ilma miżjud). Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Nominalment, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fid-dixx kristallizzanti hija l-istess bħal fir-reċipjenti tat-trattament li huma assenjati għal dik il-gaġġa tat-tgħammir speċifika. Għad-disinn tan-naqal miżjud, id-dixxijiet kristallizzanti huma mħejjijin f'madwar il-jum 11 wara l-bidu tal-espożizzjoni (jiġifieri t-tidħil tal-larva tal-ewwel ġenerazzjoni) sabiex ikunu jistgħ jekwilibraw għal madwar 48 siegħa qabel jiġu prodotti l-ewwel ċwiemi bajd.

28. Iċ-ċwiemi bajd jinġabru mid-dixx kristallizzanti fil-gaġġa tat-tgħammir bl-użu ta' pinzetti jew pipetta bil-ponta. Kull ċima bajd titqiegħed f'reċipjent li fih midjum tal-koltura mid-dixx kristallizzanti li nġabret minnu (eż. toqba ta' mikroplatt bi 12-il toqba flimkien ma' tal-inqas 2,5 ml midjum). Ir-reċipjenti biċ-ċwiemi bajd huma mgħottjin b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Iċ-ċwiemi tal-bajd jinżammu taħt osservazzjoni għal tal-inqas sitt ijiem wara li jkunu ġew prodotti sabiex ikunu jistgħu jiġu kklassifikati bħala fertili jew infertili.

Għall-bidu tat-tieni ġenerazzjoni, tal-inqas tlieta iżda idealment sitt ċwiemi bajd fertili jingħażlu minn kull gaġġa tat-tgħammir u flimkien ma' xi ikel jitħejjew ifaqqsu. Dawn iċ-ċwiemi bajd ġew prodotti fl-eqqel żmien ta' ovipożizzjoni, li normalment iseħħ madwar il-jum 19 tat-test fil-kontrolli. Idealment, it-tieni ġenerazzjoni tat-trattamenti kollha tinbeda dakinhar stess, iżda minħabba l-effetti relatati mas-sustanza kimika fuq l-iżvilupp tal-larva, dan mhux dejjem ikun possibbli. F'każ bħal dan, il-konċentrazzjonijiet ogħla jistgħu jinbdew iktar tard meta mqabblin mat-trattamenti inqas u l-kontroll (bis-solvent).

29\. a. Fid-disinn tal-ilma miżjud, is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni ġenerazzjoni titħejja billi tiżdied is-sustanza kimika tat-test fil-kolonna tal-ilma tal-madwar madwar siegħa qabel tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test. Jiġu applikati volumi żgħar tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jitħawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Wara ż-żieda, tingħata ftit arja.

29\. b. Fid-disinn tan-naqal miżjud, ir-reċipjenti ta' espożizzjoni li fihom is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni ġenerazzjoni jitħejjew bl-istess mod bħall-ewwel ġenerazzjoni.

30. L-ewwel għoxrin larva instar (mhux iktar minn 48 siegħa wara t-tifqis) tat-tieni ġenerazzjoni jiġu allokati għall-għarrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma miżjuda, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma għandux jibqa' jingħata arja filwaqt li tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test u dan

għandu jibqa' jseħħ għal 24 siegħa oħra wara li tiddaħħal il-larva. Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull konċentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull konċentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_X u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull konċentrazzjoni).

Ikel

31. Hemm bżonn li l-larva jingħataw għalt fir-reċipjenti tat-test, idealment kuljum jew tal-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa. 0,25 — 0,5 mg (0,35 — 0,5 mg għal C. yoshimatsui) għalf għall-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel mitħun fin, eż. Tetra-Min jew Tetra-Phyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) għal kull larva kull jum huwa ammont adegwat ta' ikel għal larva żgħar matul l-ewwel għaxart ijiem tal-iżvilupp tagħhom. Larva ikbar tista' tkun teħtieġ ftit iktar ikel: 0,5 — 1,0 mg għal kull larva kull jum għandu jkun biżżejjed għall-bqija tat-test. Il-porzjon tal-ikel għandha titnaqqas fit-trattamenti kollha u l-kontroll jekk jiġi osservat tkabbir fungali jew jekk tiġi osservata mortalità fil-kontrolli. Jekk l-iżvilupp fungali ma jkunx jista' jitwaqqaf, it-test għandu jiġi rripetut.

Ir-relevanza tossikoloġika tal-espożizzjoni permezz ta' inġestjoni ġeneralment tkun ikbar f'sustanzi kimiċi b'affinità għolja għal karbonju organiku jew sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal. B'hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi b'dawn il-karatteristiċi, l-ammont ta' ikel meħtieġ sabiex jiġu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-larva jista' jiżdied man-naqal iffurmulat qabel il-perjodu ta' stabilizzazzjoni, skont id-domanda regolatorja. Sabiex jiġi evitat milli titgħarraq il-kwalità tal-ilma, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok għalf għall-ħut, eż. żieda ta' 0,5 % (piż xott) weraq mitħunin fini ta' ħurrieq (*Urtica dioica*), ċawsli (*Morus alba*), xnien abjad (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew α-ċelluloża). L-għoti tal-proporzjon sħiħ ta' sors tal-ikel organiku fin-naqal qabel iż-żieda mhuwiex trivjali fir-rigward tal-kwalità tal-ilma u l-prestazzjoni bijoloġika (21), u lanqas metodu standardizzat, iżda studji riċenti jagħtu indikazzjonijiet li dan il-metodu jaħdem (19) (26). Normalment, l-insetti adulti fil-gaġġa tat-tgħammir ma jeħtieġu ebda tmigħ, iżda l-fekondità u l-fertilità jissaħħu meta tajjara mxarrba f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tiġi offruta bħala sors tal-ikel għal adulti li feġġew (34).

Kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. L-għoti ta' ftit arja lill-ilma tal-madwar fir-reċipjenti tat-test isir 24 siegħa wara li tiddaħħal l-ewwel larva instar taż-żewġ ġenerazzjonijiet u jkompli jseħħ matul it-test sħiħ (għandha tingħata attenzjoni li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt ma taqax taħt is-60 % tal-ASV). Tingħata l-arja permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ li l-iżbokk tagħha huwa fiss 2-3 cm 'il fuq mis-saff tan-naqal u tagħti ftit bżieżaq/sek. Meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi volatili, għandha tingħata kunsiderazzjoni sabiex ma tingħatax arja lis-sistema ta' naqal-ilma, filwaqt li fl-istess ħin għandu jiġi ssodisfat il-kriterju ta' validità tal-ASV minimu ta' 60 % (paragrafu 10). Tingħata gwida ulterjuri f'(16).

33. It-test b'*C. riparius* isir f'temperatura kostanti ta' 20°C (± 2 °C). Għal *C. dilutus* u *C. yoshimatsui*, it-temperaturi rrakkomandati huma 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 500 sa 1 000 lux. Għall-gaġeġ tat-tgħammir tista' tiġi inkluża fażi ta' siegħa addizzjonali taż-żerniq u raxx id-dlam.

Durata tal-espożizzjoni

34. Disinn tal-ilma miżjud: Il-perjodu ta' espożizzjoni tal-ewwel ġenerazzjoni jibda meta l-oġġett tat-test jiżdied fl-ilma fir-reċipjenti tat-test (li jsir jum wara t-tidħil tal-larva — għal emendi possibbli tad-disinn tal-espożizzjoni, ara l-paragrafu 7). L-espożizzjoni tat-tieni ġenerazzjoni tal-larva tibda minnufih, peress li tiddaħħal f'sistema tan-naqal-ilma li diġà ġiet miżjuda. Id-durata massima tal-espożizzjoni għall-ewwel ġenerazzjoni hija ta' 27 jum u għat-tieni ġenerazzjoni 28 jum (il-larva tal-ewwel ġenerazzjoni tqatta' jum fir-reċipjenti bla espożizzjoni) għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*. Fid-dawl tas-sovrappożizzjoi, id-durata sħiħa tat-test hija ta' madwar 44 jum. Għal *C. dilutus*, id-durati massimi tal-espożizzjoni huma ta' 64 u 65 jum, għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni, rispettivament. Id-durata totali hija ta' madwar 100 jum.

Disinn tan-naqal miżjud: l-espożizzjoni tibda billi tiddaħħal il-larva u hija ta' massimu ta' 28 jum għaż-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* u massimu ta' 65 jum għaż-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. dilutus*.

Osservazzjonijiet

Emerġenza

35. Iż-żmien tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rġiel u nisa ħajjin u li feġġew kompletament jiġu stabbiliti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet. L-irġiel faċli jiġu identifikati mill-antenni pilużi u l-ġisem irqiq tagħhom.

36. Ir-reċipjenti tat-test taż-żewġ ġenerazzjonijiet għandhom jiġu osservati tal-inqas tliet darbet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżwali ta' kwalunkwe mġiba anormali tal-larva (eż. jitilqu min-naqal, għawm mhux bħassoltu), meta mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu tal-feġġa, li jibda madwar 12-il jum wara t-tidħil tal-larva għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* (wara 20 jum għal *C. dilutus*), l-insetti li jfeġġu jingħaddu u jitqassmu skont is-sess tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (kmieni filgħodu u tard waranofshinar). Wara li jiġu identifikati, l-insetti tal-ewwel ġenerazzjoni jitneħħew bil-galbu mir-reċipjenti u jiġu ttrasferiti f'gaġġa tat-tgħammir. Insetti tat-tieni ġenerazzjoni jitneħħew u jinqatlu wara li jiġu identifikati. Kwalunkwe ċima bajd iddepożitata fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel ġenerazzjoni għandha tinġabar għaliha u tiġi ttrasferita ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatti bi 12-il toqba (jew reċipjenti xierqa oħrajn) li jitgħattew b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. In-numru ta' larva mejta u pupi viżibbli li naqsu milli jfeġġu għandu jiġi rreġistrat ukoll. Eżempji ta' gaġġa tat-tgħammir, reċipjent tat-test u eżawrient huma pprovduti fl-Appendiċi 5.

Riproduzzjoni

37. L-effetti fuq ir-riproduzzjoni huma vvalutati permezz tan-numru ta' ċwiemi bajd prodotti mill-ewwel ġenerazzjoni ta' insetti u l-fertilità ta' dawn iċ-ċwiemi bajd. Iċ-ċwiemi bajd jinġabru darba kuljum mid-dixx kristallizzanti li jitqiegħed f'kull kontenitur tat-tgħammir. Iċ-ċwiemi bajd għandhom jinġabru u jiġu ttrasferiti ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatt bi 12-il toqba (ċima bajd waħda f'kull toqba) jew reċipjenti xierqa oħrajn, li jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Il-karatteristiċi li ġejjin huma ddokumentati għal kull ċima bajd: jum il-produzzjoni, daqs (normali, jiġifieri 1,0 ± 0,3 cm jew żgħar; tipikament ≤ 0,5 cm), u struttura (normali = forma ta' banana bi spaga bajd fi spiral jew anormali, eż. spaga bajd mhux fi spiral) u l-fertilità (fertili jew infertili). Matul is-sitt ijiem wara li tiġi prodotta, tiġi vvalutata l-fertilità ta' ċima bajd. Ċima bajd titqies fertili meta jfaqqsu tal-inqas terz mill-bajd. In-numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir jintuża sabiex jiġi kkalkolat in-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara u n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal ull mara. Jekk ikun hemm bżonn, in-numru ta' bajd f'ċima bajd jista' jiġi stmat mingħajr qirda bl-użu tal-metodu ta' għadd taċ-ċrieki (spjegat fi 32 u 33).

Kejliet analitiċiti

Konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

38. Bħala minimu, il-kampjuni tal-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal għandhom jiġu analizzati fil-bidu tal-espożizzjoni (fil-każ ta' ilma miżjud, idealment siegħa wara l-applikazzjoni) u fi tmiem it-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u waħda inqas. Dan japplika għal reċipjenti miż-żewġ ġenerazzjonijiet. Mid-dixxijiet kristallizzanti fil-gaġġa tat-tgħammir jiġi analizzat l-ilma tal-madwar biss, peress li dan huwa ma' xiex jidħlu f'kuntatt iċ-ċwiemi bajd (għad-disinn tan-naqal miżjud, tista' tiġi kkunsidrata konferma analitika tal-konċentrazzjoni tan-naqal). Jistgħu jsiru kejliet oħrajn tan-naqal, l-ilma tal-pori jew l-ilma tal-madwar matul it-test, jekk dawn jitqiesu neċessarji. Dawn id-determinazzjonijiet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jipprovdu informazzjoni dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma-naqal. Il-kampjunar tan-naqal u l-ilma tal-pori fil-bidu u matul it-test (ara l-paragrafu 39) jeħtieġ reċipjenti addizzjonali tat-test sabiex isiru determinazzjonijiet analitiċi. Il-kejliet fin-naqal fid-disinn tal-ilma miżjud jaf ma jkunux meħtieġa jekk il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u n-naqal tkun iddeterminata biċ-ċar fi studju tal-ilma/naqal f'kundizzjonijiet paragunabbli (eż. proporzjon tan-naqal għall-ilma, it-tip ta' applikazzjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal), jew jekk jintwera li l-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-ilma tal-madwar jibqgħu fi ħdan it-80 sa 120 % tal-konċentrazzjonijiet inizjali nominali jew imkejlin.

39. Meta jsiru kejliet intermedji (eż. fil-jum 7 u/jew 14) u jekk l-analiżi teħtieġ kampjuni kbar li ma jistgħux jittieħdu mir-reċipjenti tat-test bla ma tiġi influwenzata s-sistema tat-test, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza tal-organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

40. Ċentrifugazzjoni, eż., b'10 000 g f'4 °C għal 30 min hija l-proċedura rrakkomandata biex jiġi iżolat ilma interstizjali (= tal-pori). Madankollu, jekk jintwera li s-sustanza kimika tat-test ma tassorbix filtri, tista' tkun aċċettata filtrazzjoni wkoll. F'ċerti każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori peress li l-volum tal-kampjun jista' jkun żgħir wisq.

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH, l-ossiġenu dissolt fl-ilma tat-test u t-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti għandhom jitkelju kif xieraq (ara l-paragrafu 10). L-ebusija u l-ammonijaka għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent tat-test wieħed u f'dixx kristallizzanti fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fi tmiem it-test.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

42. L-iskop ta' dan it-test taċ-ċiklu tal-ħajja huwa li jiġi stabbilit l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u, għal żewġ ġenerazzjonijiet, ir-rata tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rġiel u nisa ħajjin u li feġġew kompletament. Għad-dejta dwar il-proporzjon tal-feġġa, l-irġiel u n-nisa għandhom jiġu raggruppati. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn is-sensitivitajiet fir-rata tal-iżvilupp tas-sessi separati, ir-riżultati tal-irġiel u n-nisa jistgħu jitgħaqqdu flimkien għal analiżi statistika.

43. Il-konċentrazzjonijiet effettivi mogħtijin bħala konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-madwar (għal ilma miżjud) jew fin-naqal (għal naqal miżjud), normalment jiġu kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni (ara l-paragrafu 38). Għalhekk, għal ilma miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fl-ilma tal-madwar tar-reċipjenti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet u dawk tad-dixxijiet kristallizzanti. Għal naqal miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fir-reċipjenti għaż-żewġ ġenerazzjonijiet (u dawk tad-dixxijiet kristallizzanti, iżda mhux bilfors).

44. Biex tiġi kkalkolata stima ta' punt, jiġifieri EC_x, jistgħu jintużaw l-istatistiki għal kull reċipjent u kull gaġġa tat-tgħammir bħala rreplikati veri. Fil-kalkolu ta' intervall tal-kunfidenza għal kwalunkwe EC_x, għandu jingħata kont lill-varjabbiltà bejn ir-reċipjenti, jew inkella għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant hija żgħira li tista' ma tagħtix kasha. Meta l-mudell jiġi adattat skont l-Inqas Kaxex, għandha tiġi applikata trasformazzjoni għall-istatistiki għal kull reċipjent sabiex titjieb l-omoġenità tal-varjanza. Madankollu, il-valuri tal-EC_x għandhom jiġu kkalkolati wara li r-rispons jiġi ttrasformat lura lejn il-valur oriġinali (31).

45. Meta l-analiżi statistika jkollha l-għan li tiddetermina l-NOEC permezz ta' ttestjar tal-ipoteżi, irid jingħata kont lill-varjabblità bejn ir-reċipjenti, u dan huwa ggarantit bl-użu tal-metodi ANOVA (eż. il-proċeduri tat-test ta' Williams u Dunnett). It-test ta' Williams ikun xiraq meta fit-teorija jkun mistenni rispons-doża monotoniku u t-test ta' Dunnett ikun xieraq meta ma tkunx valida l-ipoteżi tal-monotoniċità. Inkella, jistgħu jkunu xierqa testijiet iktar robusti (27) f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet normali tal-ANOVA (31).

Proporzjon tal-feġġa

46. Il-proporzjonijiet tal-feġġa huma dejta kwantali, u jistgħu jiġu analizzati bit-test rigressiv Cochran-Armitage meta jkun mistenni doża-rispons monotoniku u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-aspettattiva. Jekk le, jista' jintuża test eżatt ta' Fisher jew Mantel-Haentzal b'valuri-p aġġustati ta' Bonferroni-Holm. Jekk hemm evidenza ta' varjabbiltà ikbar bejn l-irreplikati fi ħdan l-istess konċentrazzjoni milli tindika distribuzzjoni binomjali (spiss imsejħa bħala varjazzjoni 'extrabinomjali', f'dak il-każ għandu jintuża test eżatt ta' Fisher jew Cochran-Armitage robust bħal kif propost f'(27).

Is-somma tal-insetti ħajjin (irġiel u nisa f'daqqa) li feġġew għal kull reċipjent, n_e, hija stabbilita u maqsuma bin-numru ta' larva mdaħħla, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

fejn:

ER = proporzjon tal-feġġa

n_e = in-numru ta' insetti ħajjin li feġġew għal kull reċipjent

n_a = in-numru ta' larva mdaħħla għal kull reċipjent (normalment 20)

Meta n_e jkun ikbar minn n_a (jiġifieri meta jkun ikbar b'mod imprevist min-numru previst ta' larva mdaħħla) n_a għandu jkun ekwivalenti għal n_e.

47. *Approċċ ieħor li huwa l-iktar xieraq għal daqsijiet ta' kampjuni kbar, meta jkun hemm varjanza binomjali żejda, huwa li l-proporzjon tal-feġġa jiġi ttrattat bħala rispons kontinwu u jintużaw proċeduri konsistenti ma' din id-dejta dwar l-ER*. Daqs ta' kampjun kbir hawnhekk huwa ddefinit bħala n-numru ta' insetti li feġġew u n-numru li ma feġġewx li t-tnejn li huma jaqbżu l-ħamsa, fuq bażi għal kull irreplikat (għal kull reċipjent).

48. Sabiex jiġu applikati l-metodi ANOVA, l-ewwel il-valuri tal-*ER* iridu jiġu ttrasformati mit-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin jew it-trasformazzjoni Tukey-Freeman sabiex tinkiseb distribuzzjoni approssimata normali u biex jiġu ekwalizzati l-varjanzi. Jista' jiġi applikat it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haentzal meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin hija applikata billi jittieħed is-sine invers ($sine^{-1}$) tal-għerq u kwadrat tal-*ER*.

49. Għal proporzjonijiet tal-feġġa, il-valuri EC_x huma kkalkolati bl-użu ta' analiżi tar-rigressjoni (eż. mudelli probit, logit jew Weibull (28)). Jekk l-analiżi tar-rigressjoni ma tirnexxiex (eż. meta jkun hemm inqas minn żewġ risponsi parzjali), jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi oħrajn bħall-medja f'ċaqliq jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata tal-iżvilupp

50. Iż-żmien medju tal-iżvilupp jirrappreżenta l-medda medja ta' żmien bejn it-tidħil tal-larva (jum 0 tat-test) u l-feġġa tal-koorta sperimentali ta' insetti (għall-kalkolu taż-żmien propju tal-iżvilupp, għandha tiġi kkunsidrata l-età tal-larva fi żmien it-tidħil). Ir-rata tal-iżvilupp (unità: 1/jum) hija r-reċiproku taż-żmien tal-iżvilupp u tirrappreżenta dak il-porzjon tal-iżvilupp tal-larva li jseħħ kull jum. Ir-rata tal-iżvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar it-tossiċità tan-naqal u l-varjanza tagħha huwa inqas, u hija iktar omoġena u eqreb distribuzzjoni normali meta mqabbla maż-żmien tal-iżvilupp. B'hekk, jistgħu jintużaw proċeduri tat-test parametriku iktar b'saħħithom bir-rata tal-iżvilupp għall-kuntrarju taż-żmien tal-iżvilupp. Għar-rata tal-iżvilupp bħala rispons kontinwu, EC_x-il-valuri jistgħu jiġu stmati b'analiżi tar-rigressjoni (eż. (29) (30)). NOEC għar-rata medja tal-iżvilupp jista' jiġi stabbilit permezz tal-metodi ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett. Peress li l-irġiel ifeġġu iktar malajr min-nisa, jiġifieri għandhom rata tal-iżvilupp ogħla, jagħmel sens li tiġi kkalkolata r-rata tal-iżvilupp għal kull sess b'mod separat minbarra dik għall-insetti totali.

51. Għall-ittestjar statistiku, huwa supponut li n-numru ta' insetti osservati fil-jum ta' spezzjoni x feġġ fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn il-jum x u l-jum x – l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, normalment jum). Ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent $\bar{x}$ ( ) huwa kkalkolat skont:

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

fejn:

$\bar{x}$: ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent

i: l-indiċi tal-intervall ta' spezzjoni

m: in-numru massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i: in-numru ta' insetti li feġġew fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: in-numru totali ta' insetti li feġġew fi tmiem l-esperiment ( )

x_i: ir-rata tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew fl-intervall i

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

fejn:

jum_i: jum l-ispezzjoni (jiem mit-tidħil tal-larva)

l_i: tul tal-intervall ta' spezzjoni i (jiem, normalment jum)

Proporzjon tas-sessi

52. Il-proporzjonijiet tas-sessi huma dejta kwantali u għaldaqstant għandhom jiġu evalwati permezz ta' test eżatt ta' Fisher jew metodi xierqa oħrajn. Il-proporzjon naturali tas-sessi ta' *C. riparius* huwa wieħed, jiġifieri l-irġiel u n-nisa huma abbundanti ndaqs. Għaż-żewġ ġenerazzjonijiet, id-dejta dwar il-proporzjon tas-sessi għandu jiġi ttrattat bl-istess mod. Peress li n-numru massimu ta' insetti għal kull reċipjent (jiġifieri 20) huwa baxx wisq għal analiżi statistika sinifikanti, in-numru totali ta' insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull sess jingħadd mir-reċipjenti kollha ta' trattament wieħed. Din id-dejta mhux ittrasformata hija ttestjata kontra l-kontroll (bis-solvent) jew dejta kollettiva dwar il-kontroll f'tabella tal-kontinġenza 2 × 2.

Riproduzzjoni

53. Ir-riproduzzjoni, bħall-fekondità, hija kkalkolata bħala n-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara. B'mod iktar speċifiku, in-numru totali ta' ċwiemi bajd prodotti f'gaġġa tat-tgħammir huwa maqsun bin-numru totali ta' nisa ħajjin u mhux korruti mdaħħlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fekondità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.

54. Il-fertilità taċ-ċwiemi bajd tintuża biex tikkwantifika n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal kull mara. In-numru totali ta' ċwiemi bajd fertili prodotti f'gaġġa tat-tgħammir jinqasam bin-numru totali ta' nisa ħajjin u mhux korruti mdaħħlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fertilità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.

Rapport tat-test

55. Ir-rapport tat-test għandu jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

— l-għamla fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent ta' partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal jekk disponibbli), l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal eċċ.);

— dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, il-formula strutturali, in-numru tas-CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Speċijiet tat-test:

— l-organiżmi tat-test użati: l-ispeċijiet, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organiżmi u l-kundizzjonijiet tat-tgħammir;

— informazzjoni dwar kif tqandlu l-mases bajd u l-larva;

— informazzjoni dwar it-tqandil tal-adulti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni bl-għajnuna ta' eżawrient eċċ (ara l-Appendiċi 5)

— l-età tal-organiżmi tat-test fil-ħin tat-tidħil fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— in-naqal użat, jiġifieri naqal naturali jew ifformulat (artifiċjali);

— naqal naturali: post u deskrizzjoni tas-sit mnejn ittieħed kampjun tan-naqal, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni; il-karatteristiċi tan-naqal: il-pH, il-kontenut ta' karbonju argoniku, il-proporzjon C/N u l-granulometrija (jekk xieraq).

— naqal ifformulat: tħejjija, ingredjenti u karatteristiċi (il-kontenut ta' karbonju organiku, il-pH, l-umdità, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu, il-pH, l-ebusija, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);

— il-fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— il-volum tal-ilma tal-madwar u tal-pori; il-piż tan-naqal imxarrab bl-ilma tal-pori u mingħajr għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— reċipjenti tat-test (il-materjal u d-daqs);

— dixxijiet kristallizzanti (il-materjal u d-daqs);

— il-gaġeġ tat-tgħammir (il-materjal u d-daqs)

— il-metodu tat-tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-konċentrazzjonijiet tat-test għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti: konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' rreplikati u s-solventi, jekk meħtieġa;

— il-kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni għar-reċipjenti tat-test: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl, l-għoti ta' arja (bżieżaq fis-sekonda);

— il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għall-gaġeġ ta' tgħammir u d-dixxijiet kristallizzanti: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl;

— il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għaċ-ċwiemi bajd fil-mikroplatti (jew reċipjenti oħrajn): it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl:

— informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ inklużi t-tip ta' ikel, it-tħejjija, l-ammont u r-reġim tat-tmigħ.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejlin tat-test u r-riżultati tal-analiżijiet kollha sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;

— il-kwalità tal-ilma fi ħdan ir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti, jiġifieri l-pH, it-temperatura, l-ossiġenu dissolt, l-ebusija u l-ammonijaka;

— is-sostituzzjoni tal-ilma evaporat tat-test għar-reċipjenti tat-test, jekk tkun seħħet;

— in-numru ta' insetti rġiel u nisa li feġġew għal kull reċipjent u għal kull jum għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— il-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull trattament għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni

— in-numru ta' larva li naqset milli tfeġġ bħala insetti għal kull reċipjent għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— il-perċentwal/frazzjoni tal-feġġa għal kull irreplikat u konċentrazzjoni tat-test (insetti rġiel u nisa kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— ir-rata medja tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin għal kull irreplikat u r-rata tat-trattament (insetti rġiel u nisa separati u anki kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;

— in-numru ta' ċwiemi bajd iddepożitati fid-dixxijiet kristallizzanti għal kull gaġġa tat-tgħammir u l-jum;

— il-karatteristiċi ta' kull ċima bajd (daqs, forma u fertilità);

— il-fekondità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir;

— il-fertilità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdaħħlin fil-gaġġa tat-tgħammir;

— stimi tal-punti ta' tmiem tossiċi eż. EC_x (u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati), l-NOEC u l-metodi statistiċi użati sabiex tiġi stabbilita;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

(1) Il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossiċità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11,06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossiċità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

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

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

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

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

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

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku huwa taħlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi tan-naqal naturali.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jitqiegħed fuq in-naqal fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-post bejn in-naqal u l-partikoli tal-ħamrija.

Ilma miżjud huwa l-ilma tat-test li miegħu tiżdied is-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza kimika jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għall-koltura ta' *Chironomus riparius*

1. Larva *Chironomus* tista' titrabba f'dixxijiet kristallizzanti jew kontenituri kbar. Ramel kwarzuż fin jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 sa 100 mm fond f'qiegħ il-kontenitur. Intwera li anki Kieselgur (eż. Merck, Art 8117) huwa substrat xieraq (saff irqaq sa ftit mm biss huwa biżżejjed). Imbagħad jitferra' ilma xieraq b'fond sa bosta cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jerġgħu jittellgħu kemm ikun hemm bżonn sabiex jitpatta għat-telf mill-evaporazzjoni, u tiġi evitata dessikazzjoni. L-ilma jista' jitbiddel jekk ikun hemm bżonn. Għandha tingħata arja ħafifa. Ir-reċipjenti li fihom titrabba l-larva għandhom jinżammu f'gaġġa xierqa li ser tevita milli jaħarbu l-adulti li jfeġġu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex ikunu jistgħu jinġemgħu l-adulti li jfeġġu, inkella ma jkunx jista' jinħareġ kalkolu (minimu huwa ta' madwar 30 × 30 × 30 cm).

2. Il-gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura tal-kamra jew f'temperatura ambjentali kostanti ta' 20 ± 2 °C b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Ġie rrapportat li umdità fl-arja ta' inqas minn 60 % RH tista' timpedixxi r-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kwalunkwe ilma naturali jew sintetiku xieraq. Spiss jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit deklorinat u midjums artifiċjali (eż. il-midjum Elendt 'M4' or 'M7'). L-ilma għandu jingħata l-arja qabel jintuża. Jekk ikun hemm bżonn, l-ilma tal-koltura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra jew jitbattal mir-reċipjenti tal-koltura bil-galbu mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larva.

Tmigħ tal-larva

4. Larva *Chironomus* għandha tingħata ikel imsaffaf tal-ħut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew ditta simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), b'madwar 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab mitħun xott jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ikel imsaffaf jiżdied ma' 20 ml ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat sabiex tingħata taħlita omoġena. Din il-preparazzjoni tista' tintema' b'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum. (heżżiżha qabel tużaha.) Larva ikbar tista' tingħata iktar.

5. It-tmigħ jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum tal-koltura jsir 'imċajpar', it-tmigħ għandu jitnaqqas. Iż-żidiet tal-ikel għandhom jiġu ssorveljati bil-galbu. Ikel fi kwantitajiet żgħar wisq ser jikkaġuna emigrazzjoni tal-larva lejn il-kolonna tal-ilma, u ikel żejjed ser jikkaġuna attività mikrobjali ikbar u konċentrazzjonijiet inqas tal-ossiġenu. Iż-żewġ kundizzjonijiet jistgħu jirriżultaw f'rati mnaqqsin ta' tkabbir.

6. Jistgħu jiżdiedu wkoll ċerti ċelloli ta' algi ħodor (eż. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) meta jissawru reċipjenti ġodda tal-koltura.

Tmigħ tal-adulti li jfeġġu

7. Ċerti sperimentaturi ssuġġerew li tajjara mxappa f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tista' sservi bħala ikel għal adulti li jfeġġu.

Feġġa

8. F'20 ± 2 °C l-adulti ser jibdew ifeġġu mir-reċipjenti tat-trobbija tal-larva madwar 13 — 15-il jum wara. L-irġiel faċilment jingħarfu minħabba l-antenni pilużi u l-ġisem irqiq tagħhom.

Mases bajd

9. Ladarba l-adulti jkunu preżenti fil-gaġġa tat-tgħammir, ir-reċipjenti kollha tat-trobbija tal-larva għandhom jiġu kkontrollati tliet darbiet fil-ġimgħa għal depożiti tal-mases bajd ġelatinużi. Jekk ikunu preżenti, il-mases bajd għandhom jitneħħew bil-galbu. Għandhom jiġu ttrasferiti f'dixx żgħir li fih kampjun tal-ilma tat-tgħammir. Il-mases bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid tal-koltura (eż. 2- 4 mases bajd / reċipjent) jew jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. L-ewwel larva instar għandha tfaqqas wara jumejn — 3.

Tiswir ta' reċipjenti ġodda tal-koltura

11. Ladarba jiġu stabbiliti l-kolturi, għandu jkun possibbli li jissawwar reċipjent tal-koltura tal-larva frisk fil-ġimgħa jew inqas spiss skont ir-rekwiżiti tal-ittestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti l-qodma wara li jkunu feġġew l-insetti adulti. Bl-użu ta' din is-sistema, tiġi prodotta provvista regolari ta' adulti bl-inqas ħtieġa ta' ġestjoni.

Tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test 'M4' u 'M7'

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midju 'M4'. Il-midjum 'M7' jitħejja bħall-midjum 'M4' ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom il-konċentrazzjonijiet huma erba' darbiet inqas fl-'M7' meta mqabbla mal-'M4'. Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex titħejja skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet tal-$NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 u K_2HPO_4 mogħtijin għat-tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin, peress li dawn mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum 'M7'

13. Kull soluzzjoni ewlenija (I) titħejja għaliha u soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ewlenin (I) (ara t-Tabella 1). Ħamsin ml mis-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ewlenija tal-makronutrijenti li jingħataw fit-Tabella 2 fihom sa litru ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum 'M7'. Soluzzjoni ewlenija tal-vitamini titħejja billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u 0,1 ml soluzzjoni ewlenija tal-vitamini kkombinata tiżdied mal-midjum 'M7' finali ftit qabel l-użu. Is-soluzzjoni ewlenija tal-vitamini tinħażen iffriżata f'alikwoti żgħar. Il-midjum jingħata l-arja u jiġi stabbilizzat.

Tabella 1

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): ħallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \times 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): ħallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-soluzzjonijiet ivarjaw f'M4 u M7, kif indikat iktar 'il fuq.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew għalihom, imbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu awtoklavati minnufih.

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti miżjud biex jitħejja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/L)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tabella 3

Soluzzjoni ewlenija tal-vitamini għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet tal-vitamini kollha huma kkombinati biex jifformaw soluzzjoni ewlenija waħda tal-vitamini.

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	L-ammont ta' soluzzjoni ewlenija tal-vitamini miżjud biex jithejja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tjamin	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

REFERENZI

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

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

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

Appendiċi 3

Tħejjija tan-naqal ifformulat

KOMPOŻIZZJONI TAN-NAQAL

Il-kompożizzjoni tan-naqal ifformulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% tal-piż xott tan-naqal
Pit	Pit ta' sfanju, qrib il-pH 5,5-6,0 kemm jista' jkun, ma jif-dal ebda pjanta viżibbli, mitħun sew (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4 — 5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-ħbub: > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda tal-pit u r-ramel	2 (± 0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, pulverizzat, kimikament pur	0,05 — 0,1
Ilma	Kondottività ≤ 10 μS/cm	30 — 50

TĦEJJIJA

Il-pit jitnixxef bl-arja u mitħun għal trab irqiq. Tiġi ppreparata sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omoġenizzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'tħawwid bil-galbu f'20 ± 2 °C, sabiex tiġi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u għandha tkun ta' 6,0 ± 0,5. Imbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat ma' kosistwenti oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omoġenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Imbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li n-naqal ifformulat jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet prevalenti fit-test sussegwenti.

ĦŻIN

Il-kostitwenti nixfin għat-tħejjija tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u frisk f'temperatura tal-kamra. In-naqal ifformulat (imxarrab) ma għandux jinħażen qabel ma jintuża fit-test. Għandu jintuża minnufih wara perjodu ta' kundizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-tħejjija tiegħu.

REFERENZI

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

Appendiċi 4

Karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

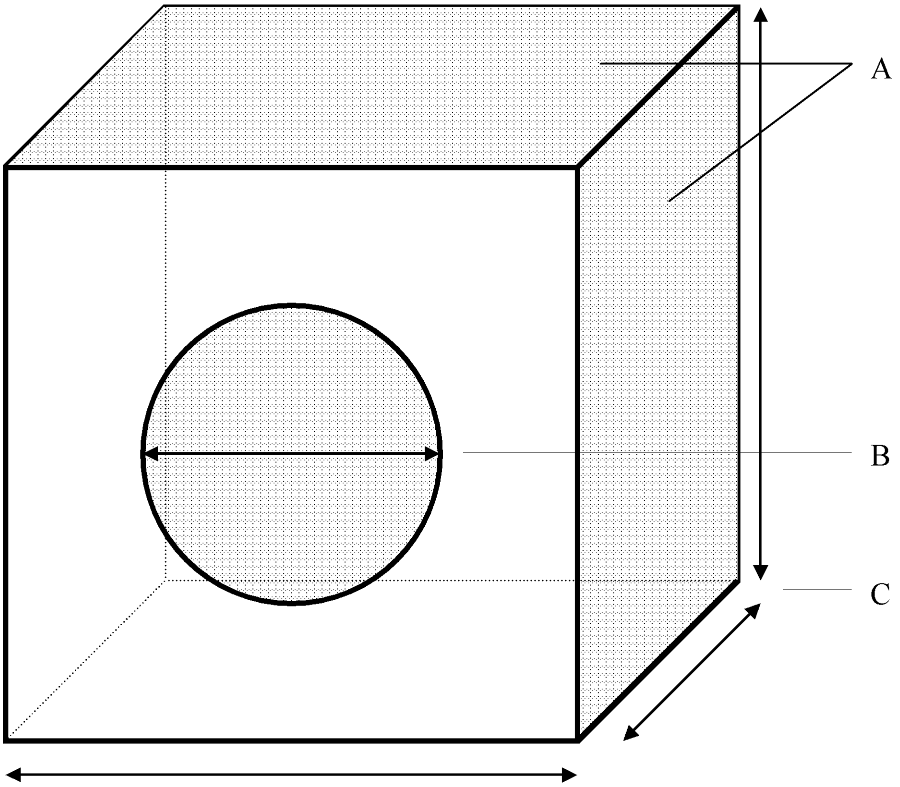
KOSTITWENT	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 μg/l
Ġebla bħal $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwu	< 10 μg/l
Pestiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

(*) Madankollu, ta' min jinnota li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija (u b'hekk, il-Midjum M4 ta' Elendt ma għandux jintuża f'din is-sitwazzjoni).

Appendiċi 5

Gwida għat-twettiq tat-test

Eżempju ta' gaġġa tat-tgħammir:

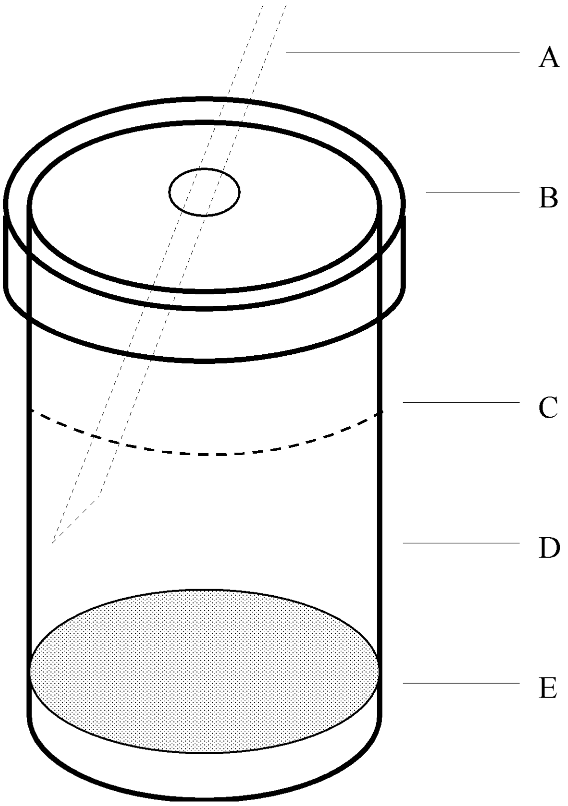


A: xibka fuq u tal-inqas waħda fil-ġenb tal-gaġġa (daqs tal-malja ta' madwar 1 mm)

B: fetħa għat-tqegħid tal-adulti li jfeġġu fil-gaġġa tat-tgħammir u sabiex jitneħħew iċ-ċwiemi bajd imbajdin mid-dixxijiet kristallizzanti (mhux murija f'din il-grafika)

C: daqs minimu tal-gaġġa tat-tgħammir: tul ta' 30 cm, għoli ta' 30 cm u wisgħa ta' 30 cm

Eżempju ta' reċipjent tat-test:



A: pipetta Pasteur għall-provvista tal-arja fl-arja tal-madwar

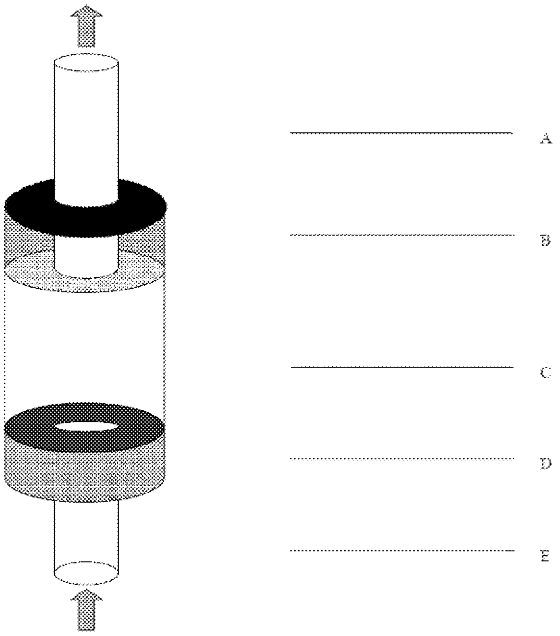
B: għatu tal-ħġieġ biex jiġi evitat milli jaħarbu l-insetti

C: saff tal-wiċċ tal-ilma

D: reċipjent tat-test (bekk tal-ħġieġ tal-inqas ta' 600 ml)

E: saff tan-naqal

Eżempju ta' eżawrient għall-qbid tal-insetti adulti (il-vleġeġ jindikaw id-direzzjoni tal-fluss tal-arja):



A: tubu tal-ħġieġ (dijametru intern ta' madwar 5 mm) imqabbad ma' pompa awtokarikata

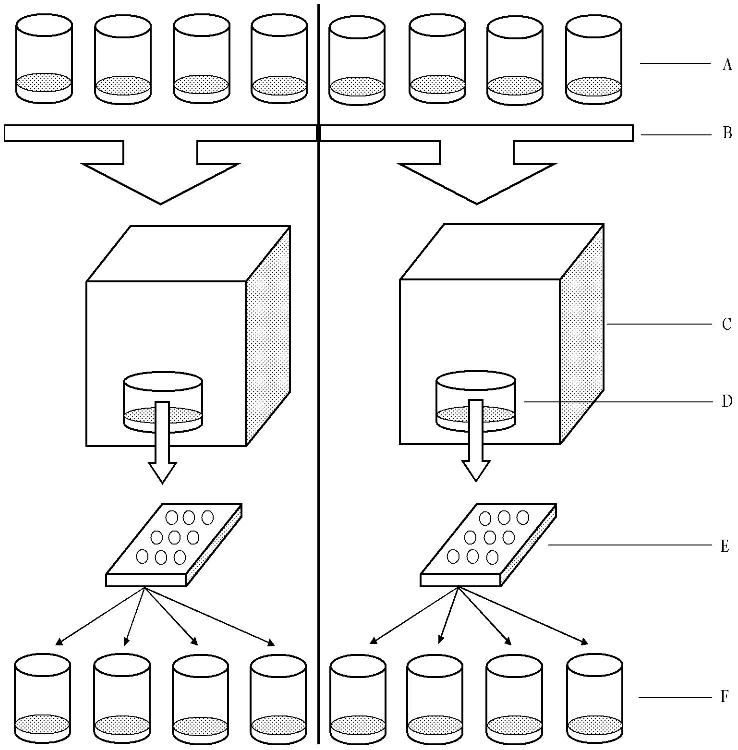
B: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu tal-ħġieġ (A). Fuq ġewwa, il-fetħa tat-tubu tal-ħġieġ (A) titgħatta b'xi qoton u xibka (daqs tal-malja ta' madwar 1 mm) biex tiġi evitata ħsara lill-insetti meta jinġibdu fl-eżawrient

C: kontenitur trasparenti (plastik jew ħġieġ, tul ta' madwar 15-il cm) għall-insetti maqbudin

D: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu (E). Biex l-insetti jinħelsu fil-gaġġa tat-tgħammir, it-tapp tas-sufra D jinħall mill-kontenitur Ċ

E: tubu (plastik jew ħġieġ, dijametru ta' ġewwa ta' madwar 8 mm) biex l-insetti adulti jinġabru mir-reċipjent

Preżentazzjoni skematika ta' test taċ-ċiklu tal-ħajja:



A: l-ewwel ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent

B: erba' reċipjenti tat-test għal kull gaġġa tat-tgħammir, A u B

C: gaġeġ tat-tgħammir (A u B) għall-iffullar, it-tgħammir u l-ovipożizzjoni

D: dixxijiet kristallizzanti għad-depożitu ta' ċwiemi bajd

E: mikroplatti, toqba waħda għal kull ċima bajd

F: it-tieni ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent

C.41. **TEST TAL-IŻVILUPP SESSWALI TAL-ĦUT**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 234 tal-OECD (2011). Huwa bbażat fuq deċiżjoni mill-1998 li jiġu żviluppati metodi ta' ttestjar ġodda jew li jiġu aġġornati dawk eżistenti għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali. It-Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut (FSDT) ġie identifikat bħala metodu ta' ttestjar promettenti li jkopri stadju sensittiv fil-ħajja tal-ħut risponsiv kemm għal sustanzi kimiċi li jibxhu lill-estroġen kif ukoll lill-androġen. Bejn l-2006 u l-2010 il-metodu ta' ttestjar sarlu eżerċizzju ta' validazzjoni interlaboratorja, li fih il-medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*), iż-żebra (*Danio rerio*) u l-ispinarell (*Gasterosteus aculeatus*) ġew ivvalidati u l-karpjun buras (*Pimephales promelas*) ġie parzjalment ivvalidat (41) (42) (43). Dan il-protokoll jinkludi l-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra. Fil-prinċipju, il-protokoll huwa tisħiħ tat-TG 210 tal-OECD 'Fish, Early Life Stage Toxicity Test' (1), li fiha l-espożizzjoni titkompla sakemm il-ħut ikun sesswalment differenzjat, jiġifieri madwar 60 jum wara t-tifqis (dph) għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra (il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jkun iqsar jew itwal għal speċijiet oħrajn li jiġu vvalidati fil-ġejjieni), u żdiedu punti ta' tmiem sensittivi għall-endokrina. L-FSDT jivvaluta l-effetti fl-istadju bikri tal-ħajja u l-konsegwenzi avversi potenzjali ta' sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali putattivi (eż. estroġeni, androġeni u inibituri tal-isterojdoġenesi) fuq l-iżvilupp sesswali. It-taħlita taż-żewġ punti ta' tmiem ċentrali, il-konċentrazzjoni tal-vitelloġenina (VTG) u l-proporzjon tas-sessi fenotipiċi jippermettu sabiex it-test jindika l-modalità ta' azzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Minħabba l-bidla relevanti għall-popolazzjoni fil-proporzjon tas-sessi fenotipiċi, l-FSDT jista' jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji. Madankollu, jekk it-test jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji, ma għandux jintuża l-ispinarell għaliex id-dejta ta' validazzjoni disponibbli s'issa wriet li f'din l-ispeċi l-alterazzjonijiet tal-proporzjon tas-sessi fenotipiċi mis-sustanzi kimiċi tat-test ma kinux komuni.

2. Il-protokoll huwa msejjes fuq ħut espost bl-ilma għal sustanzi kimiċi matul il-perjodu tas-sess li fih il-ħut huwa mistenni jkun iktar sensittiv għall-effetti tas-sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali li jxekklu l-iżvilupp sesswali. Jitkejlu żewġ punti ta' tmiem ċentrali bħala indikaturi ta' aberrazzjonijiet tal-iżvilupp assoċjati mal-endokrina, il-konċentrazzjonijiet tal-VTG u l-proporzjonijiet tas-sessi (proporzjonijiet tas-sessi) stabbiliti bl-istoloġija tal-gonadi. L-istopatoloġija gonadali (evalwazzjoni u sejbien tal-istadju tal-ooċiti u ċelloli spermatoġenetiċi) mhijiex obbligatorja. Barra minn hekk, is-sess ġenetiku huwa stabbilit kull meta jkun possibbli (eż. fil-medaka Ġappuniża u l-ispinarell). Il-preżenza ta' markatur tas-sess ġenetiku hija vantaġġ kbir peress li żżid is-saħħa tal-istatistiki tal-proporzjon tas-sessi u tippermetti li jiġi identifikat bdil lura tas-sess fenotipiku individwali. Punti ta' tmiem apikali oħrajn li għandhom jitkejlu jinkludu r-rata tat-tifqis, is-sopravivenza, it-tul u l-piż tal-ġisem. Il-metodu ta' ttestjar jista' jkun adattabbli għal speċijiet oħrajn minbarra dawk imsemmijin hawn fuq diment li l-ispeċijiet l-oħrajn issirilhom validazzjoni bħal dik li saret għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, li l-ħut tal-kontroll ikunu sesswalment differenzjati fi tmiem it-test, li l-livelli tal-VTG ikunu għoljin biżżejjed biex jiġu identifikati varjazzjonijiet sinifikanti marbutin mas-sustanza kimika, u li s-sensittività tas-sistema tat-test tiġi stabbilita bl-użu ta' sustanzi kimiċi ta' referenza attivi fl-endokrina ((anti)-estroġeni, (anti)-androġeni, inibituri tal-aromatażi eċċ). Barra minn hekk, kwalunkwe rapport ta' validazzjoni li jirreferi għal dejta tal-FSDT li tuża speċijiet oħrajn għandu jiġi rivedut mill-OECD, u l-eżitu tal-validazzjoni għandu jitqies sodisfaċenti.

Kunsiderazzjonijiet inizjali u limitazzjonijiet

3. Normalment il-VTG tiġi prodotta mill-fwied tal-vertebrati oviparużi nisa bħala rispons għall-estroġen endoġenu ċirkolanti (2). Hija prekursur tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demm fl-ovarju, fejn tittieħed u tiġi mmodifikata mill-bajd fi żvilupp. Is-sinteżi tal-VTG hija ferm limitata, għad li identifikabbli, f'ħut immatur u ħut irġiel adulti għaliex dawn ma għandhomx biżżejjed estroġen ċirkolanti. Madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi VTG bħala rispons għal stimulazzjoni tal-estroġen esoġena (3) (4) (5).

4. Il-kejl tal-VTG iservi għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi b'modalitajiet ta' azzjoni estroġeniċi, antiestroġeniċi u androġeniċi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-isterojdoġenesi bħal pereżempju inibituri tal-aromatażi. L-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi estroġeniċi hija possibbli bil-kejl tat-tidhil tal-VTG f'ħut irġiel, u din ġiet iddokumentata ħafna f'tagħrif xjentifiku evalwat bejn il-pari. L-induzzjoni tal-VTG intweriet wara l-espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli wkoll (6) (7). Tnaqqis fil-livell ċirkolanti tal-estroġen fin-nisa, pereżempju bl-inibizzjoni tal-aromatażi li tikkonverti l-androġen endoġenuż fl-estroġen naturali 17β-oestradjol, jikkaġuna tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-VTG, li tintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi bi karatteristiċi li jinibixxu l-aromatażi jew inibituri tal-isterojdoġenesi b'mod iktar mifrux (33). Ir-relevanza bijoloġika tar-rispons

tal-VTG wara inibizzjoni estroġenika/tal-aromatażi hija stabbilita u ġiet iddokumentata sew (8) (9). Madankollu, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tista' tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u l-modalitajiet ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali.

5. Ġew żviluppati u standaridzzati b'suċċess bosta metodi ta' kejl għall-użu b'rutina sabiex il-VTG tiġi kkwantifikata f'kampjuni tad-demm, il-fwied, il-ġisem sħiħ jew l-omoġenati tar-ras/tad-denb miġburin minn ħut individwali. Dan huwa l-każ għaż-żebra, l-ispinarell u l-medaka Ġappuniża u anki l-ispeċi parzjalment ivvalidata karpjun buras; il-metodi speċifiċi għall-ispeċi tal-Assaġġ tal-Immunosorbenti Marbut mal-Enżimi (ELISA) li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-VTG huma disponibbli (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Fil-medaka Ġappuniża u ż-żebra, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla minn kampjuni tal-plażma tad-demm, il-fwied u l-omoġenati għad li l-omoġenati għandhom tendenza li juru valuri ftit inqas minn plażma (17) (18) (19). L-Appendiċi 5 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għal analiżi tal-VTG.

6. Bidla fil-proporzjon tas-sessi fenotipiċi (proporzjonijiet tas-sessi) hija punt ta' tmiem li jirrifletti bidla lura fis-sess. Fil-prinċipju, sustanzi kimiċi li jinibixxu estroġeni, antiestroġeni, androġeni, antiandroġeni u sterojdoġenesi jistgħu jaffettwaw il-proporzjon tas-sessi tal-ħut fi żvilupp (20). Intwera li din il-bidla lura tas-sess hija parzjalment riversibbli fiż-żebra (21) wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-estroġen, filwaqt li l-bidla lura tas-sess wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-androġen hija permanenti (30). Is-sess huwa ddefinit bħala mara, raġel, interess (kemm ooċiti kif ukoll ċelloli spermatoġeniċi f'gonada waħda) jew mhux differenzjat, stabbilit f'ħut individwali permezz ta' eżaminazzjoni istoloġika tal-gonadi. Tingħata gwida fl-Appendiċi 7 u fl-'OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads' (22).

7. Is-sess ġenetiku huwa eżaminat permezz ta' markaturi ġenetiċi meta jkunu jeżistu fi speċi partikolari tal-ħut. Fil-medaka Ġappuniża, il-ġeni XX tan-nisa jew XY tal-irġiel jistgħu jiġu identifikati bir-Reazzjoni Katina tal-Polimerażi (PCR), jew inkella l-ġene tad-dominju DM marbut mal-Y (DMY) jista' jiġi analizzat (negattiv jew pożittiv għad-DMY) kif deskritt fi (23) (24). Fl-isprinarell, hemm metodu ekwivalenti tal-PCR sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku deskritt fl-Appendiċi 10. Meta s-sess ġenetiku jkun jista' jintrabat b'mod individwali għas-sess fenotipiku, is-saħħa tat-test titjieb u għaldaqstant is-sess ġenetiku għandu jiġi stabbilit fi speċijiet b'markaturi tas-sess ġenetiku ddokumentati.

8. Iż-żewġ punti ta' tmiem endokrinali ċentrali, il-VTG u l-proprozjon tas-sess, flimkien, jistgħu juru l-modalità ta' azzjoni endokrinali (MOA) tas-sustanza kimika (Tabella 1). Il-proporzjon tas-sessi huwa bijomarkatur relevanti għall-popolazzjoni (25) (26) u għal ċerti modalitajiet ta' azzjoni ddefiniti sew, ir-riżultati tal-FSDT jistgħu jintużaw għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-perikli u r-riskji meta dan jitqies xieraq mill-aġenzija regolatorja. Bħalissa, dawn il-modalitajiet ta' azzjoni huma estroġeni, androġeni u inibituri tal-isterojdoġenesi.

Tabella 1

Reazzjoni tal-punti ta' tmiem endokrinali għal modalitajiet ta' azzjoni differenti tas-sustanzi kimiċi:

↑ = f'żieda, ↓=fi tnaqqis, — = mhux investigati

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Proporzjon tas-sessi	Referenzi
Agonist dgħajjef tal-estroġen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff	(27) (40)
Agonist b'saħħtu tal-estroġen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff, Le ♂	(28) (40)
Antagonist tal-estroġen	—	—	↓♀, ↑ Mhux diff.	(29)
Agonist tal-androġen	↓ jew —	↓ jew —	↑ ♂, Le ♀	(28) (30)
Antagonist tal-androġen	—	—	↑♀ Intersess	(31)
Inibitur tal-Aromatażi	↓	↓	↓♀	(33)

9. L-FSDT ma jkoprix l-istadju riproduttiv tal-ħajja tal-ħut u, għaldaqstant, is-sustanzi kimiċi li huma ssuspettati li jaffettwaw ir-riproduzzjoni f'konċentrazzjonijiet inqas mill-iżvilupp sesswali għandhom jiġu eżaminati f'test li jkopri r-riproduzzjoni.

10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet għall-fini ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

11. L-FSDT *in vivo* huwa maħsub sabiex jidentifika sustanzi kimiċi bi karatteristiċi androġeniċi u estroġeniċi kif ukoll karatteristiċi li jinibixxu antiandroġeni, antiestroġeni u sterejdoġenesi. Il-fażijiet ta' validazzjoni tal-FSDT (1 u 2) koprew sustanzi kimiċi li jinibixxu estroġeni, androġeni u sterojdoġenesi. L-effetti fl-FSDT ta' antagonisti tal-estroġen u l-androġen jistgħu jinkisbu mit-Tabella 1 iżda dawn l-MOA huma inqas iddokumentati bħalissa.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Fit-test, il-ħut huwa espost, minn bajd iffertilizzat ġdid sat-tlestija tad-differenzazzjoni sesswali, għal tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test dissolta fl-ilma. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu bi fluss kontinwu sakemm dan ma jkunx possibbli minħabba d-disponibilità jew l-għamla (eż. solubilità limitata) tas-sustanza kimika tat-test. It-test jibda billi l-bajd iffertilizzat ġdid (qabel il-qasma tal-blastodiska) jitqiegħed fil-kompartimenti tat-test. It-tagħbija tal-kompartimenti hija deskritta għal kull speċi fil-paragrafu 27. Għall-ispeċijiet tal-ħut ivvalidati, il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, it-test jintemm f'60 dph. Fi tmiem it-test, il-ħut kollu jiġi ewtanizzat b'mod dinjituż. Kampjun bijoloġiku (plażma tad-demm, fwied jew omoġenat tar-ras/tad-denb) jinġabar għal analiżi tal-VTG minn kull ħuta u l-parti li jifdal tiġi ffissata għal evalwazzjoni istoloġika tal-gonadi sabiex jiġi stabbilit is-sess fenotipiku; tista' ssir istopatoloġija (eż. sejbien tal-istadju tal-gonadi, severità tal-interess). Fi speċijiet li għandhom il-markaturi xierqa jittieħed kampjun bijoloġiku (il-pinna anali jew dorsali) sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku (Appendiċijiet 9 u 10).

13. Ħarsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet relevanti tat-test għal speċijiet ivvalidati: Il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

14. Ir-riżultati minn test tat-tossiċità akuta jew assaġġ ieħor tat-tossiċità fuq terminu qasir [eż. il-metodu ta' ttestjar C.14 (34) u it-TG 210 tal-OECD (1)], li idealment isir bl-ispeċijiet magħżulin għal dan it-test, għandhom ikunu disponibbli. Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test huma magħrufin u huwa disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-kompartimenti tat-test, bi preċiżjoni magħrufa u rrapportata u limitu tal-identifikazzjoni.

15. Informazzjoni siewja oħra tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza kimika, l-istabbiltà fl-ilma u d-dawl, pKa, P_{ow} u r-riżultati ta' test għal bijodegradabilità lesta (Metodu ta' Ttestjar C.4) (35).

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

16. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun tal-inqas 60 fil-mija tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) tul it-test;

— It-temperatura tal-arja ma għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C bejn il-kompartimenti tat-test fi kwalunkwe ħin matul il-perjodu ta' espożizzjoni u trid tinżamm fi ħdan il-meded tat-temperatura speċifikati għall-ispeċijiet tat-test (Appendiċi 2);

— Metodu vvalidat għall-analiżi tas-sustanza kimika ta' espożizzjoni b'limitu ta' detezzjoni ferm inqas mill-inqas konċentrazzjoni nominali għandu jkun disponibbli u għandha tinġabar evidenza sabiex jintwera li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medjin imkejlin;

— Is-sopravivenza ġenerali tal-bajd iffertilizzat fil-kontrolli u, meta relevanti, fil-kontrolli bis-solvent, għandha tkun ikbar minn jew daqs il-limiti ddefiniti fl-Appendiċi 2;

— Il-kriterji ta' aċċettazzjoni marbutin mat-tkabbir u l-proporzjonijiet tas-sess fi tmiem it-test huma bbażati fuq dejta mill-gruppi tal-kontroll (kontroll bl-ilma u s-solvent kollettivi sakemm ma jvarjawx ħafna, f'liema każ solvent biss):

		Medaka Ġappuniża	Żebra	Spinarell
Tkabbir	Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Tul (tul standard)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— Meta jintuża solvent, dan ma għandu jkollu ebda effett statistikament sinifikanti fuq is-sopravivenza u ma għandux jipproduċi xi effett ta' interferent endokrinali jew xi effett avvers ieħor fuq l-istadji bikrin tal-ħajja li jinstabu minn kontroll bis-solvent.

Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tad-dejta tat-test u dawn il-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapportar.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Kompartimenti tat-test

17. Jista' jintuża kwalunkwe kompartiment tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli jew xi kompartiment ieħor kimikament inert. Id-dimensjonijiet tal-kompartimenti għandhom ikunu kbar biżżejjed biex tinżamm konformità mal-kriterji dwar ir-rata ta' tagħbija mogħtijin hawn taħt. Idealment, il-kompartimenti tat-test jitqiegħdu f'pożizzjoni għal għarrieda fiż-żona tat-test. Disinn għal għarrieda tal-blokok b'kull konċentrazzjoni preżenti f'kull blokka huwa ppreferut meta mqabbel ma' disinn kompletament għal għarrieda. Il-kompartimenti tat-test għandhom ikunu protetti minn disturbanza mhux mixtieqa.

Għażla tal-ispeċijiet

18. L-ispeċijiet irrakkomandati tal-ħut jingħataw fl-Appendiċi 2. Il-proċeduri għall-inklużjoni ta' speċijiet ġodda jingħataw fil-paragrafu 2.

Iż-żamma tal-ħut ġenituri

19. Id-dettalji dwar iż-żamma tal-ħut ġenituri f'kundizzjonijiet sodisfaċenti jistgħu jinkisbu mit-TG 210 tal-OECD (1). Il-ħut ġenituri għandhom jintemgħu darba jew darbtejn kuljum b'ikel xieraq.

Tqandil ta' embrijuni u larva

20. Għall-ewwel, l-embrijuni u l-larva jistgħu jiġu esposti fi ħdan kompartiment ewlieni f'komponenti tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli, mgħammrin bi xbieki fil-ġenb jew fit-truf biex ikun hemm fluss tas-sustanza kimika tat-test fi ħdan il-komponent. Fluss mhux turbolenti fi ħdan dawn il-kompartimenti żgħar jista' jiġi indott billi jiġu sospiżi minn fergħa mqiegħda biex il-kompartiment jiċċaqlaq 'il fuq u 'l isfel filwaqt li l-organiżmi jibqgħu mgħaddsin.

21. Meta jkunu intużaw kontenituri tal-bajd, grilji jew xbieki biex il-bajd jinżamm fi ħdan il-kompartiment ewlieni tat-test, dawn ir-restrizzjonijiet għandhom jitneħħew wara li tfaqqas il-larva, ħlief li x-xbieki għandhom jinżammu biex jiġi evitat milli jaħrab il-ħut. Jekk ikun hemm bżonn li tiġi ttrasferita l-larva, din ma għandhiex tkun esposta għall-arja u ma għandhomx jintużaw xbieki biex il-ħut jinħeles minn kontenituri tal-bajd. It-twaqqit ta' dan it-trasferiment ivarja skont l-ispeċijiet u mhux bilfors dejjem ikun hemm bżonn isir trasferiment.

Ilma

22. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test turi sopravivenza bil-kontroll li tal-inqas tkun tajba daqs fl-ilma deskritta fl-Appendiċi 3 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Sabiex jiġi żgurat li l-lima ta' dilwizzjoni mhuwiex ser ikollu influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test) jew jaffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk tad-duqqajs, għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għal analiżi. Il-karbonju organiku totali, il-konduttività, il-pH u s-solidi sospiżi għandhom jitkejlu, pereżempju kull tliet xhur meta l-ilma ta' dilwizzjoni jkun magħruf li huwa ta' kwalità relattivament kostanti. Għandhom isiru kejliet tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni l-kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) u l-pestiċidi, jekk ikun hemm dubji dwar il-kwalità tal-ilma. Id-dettalji dwar analiżi kimika u l-ġbir tal-ilma jistgħu jinkisbu mill-paragrafu 34.

Soluzzjonijiet tat-test

23. Jekk dan ikun possibbli fil-prattika, għandha tintuża sistema bi fluss kontinwu. Għal testijiet bi fluss kontinwu, sistema b'distribuzzjoni u dilwizzjoni kontinwi ta' soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, u sistema ta' saturatur) hija meħtieġa sabiex tiddaħħal sensiela ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma ta' dilwizzjoni għandhom jiġu kkontrollati f'ċerti intervalli matul it-test u ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Instab li rata tal-fluss ekwivalenti għal tal-inqas ħames volumi tal-kompartimenti tat-test kull 24 siegħa hija xierqa (1). Għandha tingħat attenzjoni sabiex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik jew materjali oħrajn, u wħud minnhom jista' jkun fihom sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi jew jistgħu jassorbu s-sustanza kimika tat-test.

24. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tithejja mingħajr l-użu ta' solventi permezz ta' sempliċi taħlit jew ċaqliq tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test diffiċli biex tinħall fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fl-OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36). L-użu ta' solventi għandu jiġi evitat iżda jista' jkun meħtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost. Eżempji ta' solventi xierqa jingħataw f'(36).

25. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet tat-test semistatiċi sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għar-raġunijiet validi assoċjati mas-sustanza kimika tat-test (eż. stabbiltà, disponibilità limitata, spejjeż għoljin jew perikli). Għat-teknika semistatika, jistgħu jiġu segwiti żewġ proċeduri differenti ta' tiġdid. Is-soluzzjonijiet tat-test il-ġodda jithejjew f'kompartimenti nodfa u bajd sopravissuti u larva ttrasferita bil-galbu fil-kompartimenti l-ġodda, jew l-organiżmi tat-test jinżammu fil-kompartimenti tat-test filwaqt li kuljum jinbidel proporzjon (tal-inqas żewġ terzi) mill-ilma tat-test.

PROĊEDURA

Kundizzjonijiet tal-Espożizzjoni

Ġbir tal-bajd u d-durata

26. Biex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku, il-bajd jinġabar minn tal-inqas tliet pari jew gruppi tat-tgħammir, imħalltin u magħżulin għal għarrieda biex jinbeda t-test. Għall-ispinarell, ara d-deskrizzjoni tal-fertilizzazzjoni artifiċjali fl-Appendiċi 11. It-test għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara li jkun ġie ffertilizzat il-bajd, idealment filwaqt li l-embrijuni jitgħaddsu fis-soluzzjonijiet tat-test qabel tibda l-qasma blastodiska, jew ftit kemm jista' jkun wara dan l-istadju u mhux iktar tard minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni. It-test għandu jkompli sakemm titlesta d-differenzazzjoni sesswali fil-grupp bil-kontroll (60 dph għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra).

Tagħbija

27. In-numru ta' bajd iffertilizzat fil-bidu tat-test għandu jkun tal-inqas 120 għal kull konċentrazzjoni maqsum bejn tal-inqas 4 irreplikati (allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontroll hija aċċettata). Il-bajd għandu jitqassam għal għarrieda (bl-użu ta' tabelli statistiċi għal każwalizzazzjoni) bejn it-trattamenti. Ir-rata tat-tagħbija (għad-definizzjoni, ara l-Appendiċi 1) għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex tkun tista' tinżamm konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ta' tal-inqas 60 % tal-ASV mingħajr ma tingħata arja diretta fil-kompartimenti. Għal testijiet bi fluss kontinwu, hija rrakkomandata rata tat-tagħbija li ma taqbiżx iż-0,5 g/l f'24 siegħa, u li ma taqbiżx il-5 g/l tas-soluzzjoni fi kwalunkwe ħin. Xejn iktar tard minn 28 jum wara l-fertilizzazzjoni, in-numru ta' ħut għal kull irreplikat għandu jerġa' jiġi distribwit, b'tali mod li kull irreplikat ikun fih numru kemm jista' jkun indaqs ta' ħut. Jekk isseħħ mortalità relatata mal-espożizzjoni, in-numru ta' rreplikati għandu jitnaqqas kif xieraq b'tali mod li d-densità tal-ħut bejn il-livelli tat-trattament jinżamm indaqs kemm jista' jkun.

Dawl u temperatura

28. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet tat-test (ara l-Appendiċi 2 għall-kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT).

Tmigħ

29. L-ikel u t-tmigħ huma kritiċi, u huwa essenzjali li jingħata l-ikel it-tajjeb għal kull stadju f'intervalli xierqa ta' ħin u f'livell biżżejjed sabiex isostni t-tkabbir normali. It-tmigħ għandu jkun *ad libitum* filwaqt li jiġi minimizzat l-eċċess. Biex tinkiseb rata biżżejjed tat-tkabbir, il-ħut għandu jintema' tal-inqas darbtejn kuljum (aċċettat darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa), b'intervall minimu ta' tliet sigħat bejn kull tmigħ. Għandhom jitneħħew ikel u rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart. Hi u tinkiseb esperjenza, l-ikel u r-reġimi tat-tmigħ ikomplu jiġu rfinati sabiex titjieb is-sopravivenza u jiġi ottimizzat it-tkabbir. Għaldaqstant għandu jsir sforz sabiex jiġi kkonfermat ir-reġim propost ma' esperti rikonoxxuti. It-tmigħ għandu jiġi pprojbit 24 siegħa qabel jinetmm it-test. Eżempji ta' oġġetti xierqa tal-ikel huma elenkati fl-Appendiċi 2 (ara wkoll l-OECD Fish Testing Framework (39).

Konċentrazzjonijiet tat-test

30. Is-sustanzi kimiċi tat-test huma spazjati kif deskritt fl-Appendiċi 4. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tat-test f'tal-inqas erba' rreplikati. Il-kurva li tirrelata l-LC_{50} ma' perjodu ta' espożizzjoni fl-istudji akuti disponibbli għandha tiġi kkunsidrata meta tingħażel il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test. Huma rrakkomandati ħames konċentrazzjonijiet tat-test jekk għandha tintuża d-dejta għall-valutazzjoni tar-riskju.

31. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika ogħla minn 10 % tal-LC_{50} akuta fl-adulti jew 10 mg/l, tkun liema tkun l-inqas waħda, ma għandhomx bżonn jiġu ttestjati. Il-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 10 % tal-LC_{50} fl-istadju tal-ħajja tal-larva/taż-żgħar.

Kontrolli

32. Għandu jsir kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (≥ 4 irreplikati) u, jekk relevanti, kontroll bis-solvent (≥ 4 irreplikati) minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Fit-test għandhom jintużaw biss solventi li ġew investigati u li ma għandhom ebda influwenza statistikament sinifikanti fuq il-punti ta' tmiem tat-test.

33. Meta jintuża solvent, il-konċentrazzjoni finali tiegħu ma għandhiex tkun ikbar minn 0,1 ml/l (36) u għandha tkun l-istess konċentrazzjoni fil-kompartimenti kollha tat-test, ħlief il-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali solvent jew sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet tas-solvent għall-minimu possibbli.

Frekwenza tad-Determinazzjonijiet Analitiċi u l-Kejliet.

34. Għandha ssir analiżi kimika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test qabel ma jibda t-test sabiex tiġi vverifikata l-konformità mal-kriterji ta' aċċettazzjoni. L-irreplikati kollha għandhom jiġu analizzati għalihom fil-bidu u fi tmiem it-test. Tal-inqas darba fil-ġimgħa għandu jiġi analizzat irreplikat wieħed għal kull konċentrazzjoni tat-test matul it-test, b'bidla sistematika bejn l-irreplikati (1,2,3,4,1,2 …). Jekk il-kampjuni jinħażnu sabiex jiġu analizzati iktar tard, il-metodu ta' ħżin tal-kampjuni għandu jiġi vvalidat minn qabel. Il-kampjuni għandhom jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs ta' 0,45 μm tal-pori) jew iċċentrifugati sabiex jiġi żgurat li jsiru determinazzjonijiet fuq is-sustanza kimika f'soluzzjoni vera.

35. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH, l-ebusija totali, il-konduttività, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu fil-kompartimenti kollha tat-test. Tal-inqas, l-ossiġenu dissolt, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu kull ġimgħa, u l-pH, il-kondottività u l-ebusija fil-bidu u fi tmiem it-test. Idealment, it-temperatura għandha titkejjel kontinwament f'tal-inqas kompartiment wieħed tat-test.

36. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejlin. Madankollu, jekk il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni tinżamm b'mod sodisfaċenti fi ħdan ±20 % tal-konċentrazzjoni nominali tul it-test sħiħ, f'dak il-każ ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew inkella mkejlin.

Osservazzjonijiet u kejliet

Stadju tal-iżvilupp embrijoniku

37. L-espożizzjoni għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara l-fertilizzazzjoni u qabel tibda l-qasma blastodiska u mhux iktar minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni sabiex tiġi żgurata espożizzjoni matul l-iżvilupp embrijoniku bikri.

Tifqis u sopravivenza

38. Osservazzjonijiet fuq it-tifqis u s-sopravivenza għandhom isiru tal-inqas darba kuljum u n-numri jridu jiġu rreġistrati. Embrijuni, larva u ħut żgħir mejtin għandhom jitneħħew malli jiġu osservati peress li jistgħu jitmermru malajr u jistgħu jiġu disaggregati skont l-azzjonijiet tal-ħut l-ieħor. Għandha tingħata attenzjoni kbira meta jitneħħew l-individwi mejtin sabiex ma jintlaqtux u lanqas ma ssir ħsara fiżika fuq bajd/larva fil-qrib, peress li dawn huma estremament delikati u sensittivi. Il-kriterji għall-mewt ivarjaw skont l-istadju tal-ħajja:

— għall-bajd: b'mod partikolari fl-istadji bikrin, telf qawwi fit-translużenza u l-bidla fil-kolorazzjoni, ikkaġunat minn koagolazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda;

— għal larva u ħut żgħir: immobilità u/jew nuqqas ta' ċaqliq respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit il-qalb u/jew kolorazzjoni opaka bajda tas-sistema nervuża ċentrali u/jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimoli mekkaniċi.

Dehra anormali

39. In-numru ta' larva jew ħut li juri anormalità fil-forma tal-ġisem għandu jiġi rreġistrat, u d-dehra u l-għamla tal-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijuni u larva anormali jseħħu b'mod naturali u jistgħu jkunu fl-ordni ta' perċentwal kbir fil-kontroll(i) f'ċerti speċijiet. Annimali anormali għandhom jitneħħew biss mill-kompartimenti tat-test meta jmutu. Madankollu, skont id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi, jekk l-anormalitajiet jirriżultaw f'uġigħ, tbatija u diffikultà jew ħsara dejjiema, u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati skont id-deskrizzjoni fil-paragrafu 44 u ttrattati bħala mortalità għall-analiżi tad-dejta.

Imġiba anormali

40. Anormalitajiet, eż. iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, trankwillità atipika u mġiba atipika tat-tmigħ għandhom jiġu rreġistrati malli jidhru.

Piż

41. Fi tmiem it-test, il-ħut kollu li jkun għadu ħaj għandu jiġi ewtanizzat (anestetizzat jekk għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm), u għandu jintiżen il-piż imxarrab individwali (imnixxef bit-taptip).

Tul

42. Fi tmiem it-test, għandu jitkejjel it-tul individwali (tul standard).

43. Dawn l-osservazzjonijiet ser jirriżultaw fid-dejta kollha li ġejja jew parti minnha disponibbli għar-rapportar:

— il-mortalità kumulattiva;

— in-numri ta' ħut b'saħħtu fi tmiem it-test;

— iż-żmien sal-bidu tat-tifqis u tmiem it-tifqis;

— it-tul u l-piż tal-annimali li għadhom ħajjin;

— in-numri ta' larva sfigurata;

— in-numri ta' ħut li jesibixxi mġiba anormali.

Kampjunar tal-ħut

44. Il-kampjunar tal-ħut isir fi tmiem it-test. Il-ħut fil-kampjun għandu jiġi ewtanizzat b'eż. MS-222 (100-500 mg għal kull l ibbaferjat b'200 mg $NaHCO_3$ għal kull l) jew FA-100 (4-allil-2-metossifenol: ewġenol) u jitkejjel u jintiżen bħala piż nett (imnixxef bit-taptip) jew anestetizzat jekk għandu jittieħed kampjun tad-demm (ara l-paragrafu 49).

Kampjunar għall-analiżi tal-VTG u determinazzjoni tas-sess permezz ta' evalwazzjoni istoloġika

45. Il-ħut kollu għandu jiġi kampjunat u jitħejja għal analiżi tas-sess u l-VTG. Il-ħut kollu għandu jiġi analizzat istikoloġikament sabiex jiġi ddeterminat is-sess. Għall-kejliet tal-VTG, huwa aċċettat subkampjunar ta' tal-inqas 16-il ħuta minn kull irreplikat. Għandu jiġi analizzat iktar ħut għall-VTG jekk ir-riżultati tas-subkampjunar ma jkunx ċar.

46. Il-proċedura ta' kampjunar għall-VTG u l-istabbiliment tas-sess jiddependu mill-metodu ta' analiżi tal-VTG:

Metodu tal-omoġenat tar-ras/tad-denb għal analiżi tal-VTG

47. Il-ħut huwa ewtanizzat. Ir-ras u d-denb ta' kull ħuta huma sseparati mill-ġisem tal-ħut permezz ta' qatgħat li jsiru eżatt wara l-pinen pettorali, u eżatt wara l-pinna dorsali, bl-użu ta' sikkinka kirurġika (Ara l-Figura 1). Il-parti tar-ras u d-denb minn kull ħuta jinġabru flimkien, jintiżnu u jingħataw numru individwali, jiġu ffriżati f'nitroġenu likwidu u jinħażnu f'-70° jew inqas għala analiżi tal-VTG. Il-parti tal-ġisem tal-ħut tingħata numru u tiġi stabbilita f'fissattiv xieraq għal evalwazzjoni istoloġika (22). Bl-użu ta' dan il-metodu, il-VTG u l-istopatoloġija jiġu evalwati fuq kull individwu u, b'hekk, bidla possibbli fil-livell tal-VTG tista' tkun relatata mas-sess fenotipiku tal-ħut jew is-sess ġenetiku (il-medaka Ġappuniża u l-ispinarell) tal-ħut. Għal iktar informazzjoni, ara l-gwida għall-omoġenizzazzjoni (Appendiċi 5) u gwida għall-kwantifikazzjoni tal-VTG (Appendiċi 6).

Metodu ta' omoġenat tal-fwied għal analiżi tal-VTG

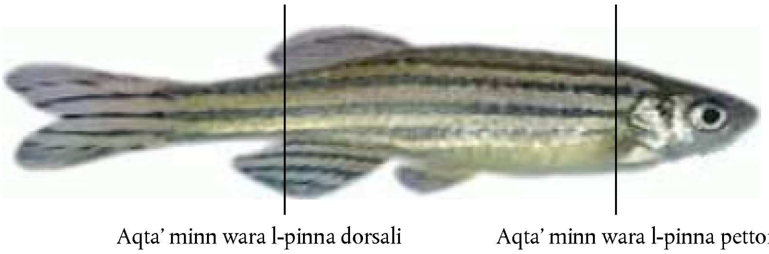
48. Il-ħut jiġi ewtanizzat. Il-fwiet jinqata' u jinħażen f'– 70 °C jew inqas. Il-proċeduri rrakkomandati għal qtugħ tal-fwied u pretrattament huma disponibbli fit-TG 229 tal-OECD (37) jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38). Imbagħad, il-fwied jiġi omoġenizzat b'mod individwali kif deskritt fit-TG 229 tal-OECD jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness. Is-supernatant miġbur jintuża għall-kejl tal-VTG b'teknika ELISA omologa (ara l-Appendiċi 6 għal eżempju ta' kwantifikazzjoni fiż-żebra jew it-TG 229 tal-OECD (37) għal medaka Ġappuniża). Skont dan l-approċċ, huwa possibbli wkoll li jkun hemm dejta tal-ħut individwali kemm fuq il-VTG kif ukoll l-istoloġija tal-gonadi.

Il-metodu tal-plażma tad-demm għal analiżi tal-VTG

49. Id-demm jinġabar mill-ħut anestetizzat b'titqib kardijaku, vina kawdali jew qtugħ tad-denb, u jiġi ċċentrifugat f'4 °C għall-ġbir tal-plażma. Il-plażma tinħażen f'70 °C jew inqas sal-użu. Il-ħut sħiħ jiġi ewtanizzat u ffissat għal istoloġija. Kemm il-kampjuni tal-plażma kif ukoll il-ħut jingħataw numru individwali sabiex il-livelli tal-VTG jiġu relatati mas-sess tal-ħut.

Figura 1

Kif taqta' ħuta għall-kejl tal-VTG fl-omoġenat tar-ras/tad-denb u l-evalwazzjoni istoloġika tas-sezzjoni tan-nofs



Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

50. Jittieħed kampjun bijoloġiku għad-determinazzjoni tas-sess ġenetiku minn ħuta individwali fi speċijiet li għandhom markaturi xierqa. Għal medaka Ġappuniża, tinġabar il-pinna anali jew dorsali. Tingħata deskrizzjoni ddettaljata fl-Appendiċi 9 inkluż il-kampjunar tat-tessut u d-determinazzjoni tas-sess b'metodu tal-PCR. Bl-istess mod, għall-ispinarella, fl-Appendiċi 10 tingħata deskrizzjoni tal-kampjunar tat-tessuti u metodu tal-PCR li jistabbilixxi s-sess.

Kejl tal-VTG

51. Il-kejl tal-VTG għandu jkun ibbażat fuq metodu kwantitattiv u analitikament ivvalidat. L-informazzjoni għandha tkun disponibbli fuq il-varjabbiltà intrassaġġ u interassaġġ tal-metodu użat f'laboratorju partikolari. Is-sors tal-varjabbiltà interlaboratorja u intralaboratorja hija (ferm probabbli) ibbażata fuq l-istadji differenti tal-iżvilupp tal-popolazzjoni tal-ħut. Minħabba l-varjabbiltà tal-kejl tal-VTG, l-NOECs ibbażati fuq dan il-punt ta' tmiem waħdu għandhom jiġu ttrattati bil-galbu. Hemm disponibbli metodi differenti sabiex tiġi vvalutata l-produzzjoni tal-VTG fl-ispeċijiet tal-ħut ikkunsidrati f'dan l-assaġġ. Teknika ta' kejl li hija kemm relattivament sensittiva u speċifika hija d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-proteini permezz tal-assaġġ tal-immuno-sorbenti marbutin mal-enżimi (ELISA). Għandhom jintużaw antikorpi omologi (imrobbijin kontra l-VTG tal-istess speċijiet) u l-iktar standards importanti tal-omologi.

Determinazzjoni tas-sess

52. Skont il-proċedura ta' kampjunar tal-VTG, ħut sħiħ jew is-sezzjoni tan-nofs li jifdal ta' kull ħuta jitqiegħdu f'kaxxetta ta' pproċessar ittikkettata minn qabel u jiġu ffissati f'fissattiv xieraq għad-determinazzjoni istoloġika tas-sess (dan jista' jsir ukoll għall-evalwazzjoni tas-sejbien tal-istadju tal-gonadi). Gwida dwar l-iffissar u l-inkorporazzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 7 kif ukoll fl-'OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads' (22). Wara l-ipproċessar, il-ħut jiġi inkorporat fi blokok tal-paraffina. L-individwi għandhom jitqiegħdu b'mod lonġitudinali fil-blokka tal-paraffina. Minn kull individwu jittieħdu minimu ta' sitt sezzjonijiet lonġitudinali (ħxuna ta' 3-5 μm) fi pjan frontali inkluż tessut gonadali miż-żewġ gonadi. L-intervall bejn dawn is-sezzjonijiet għandu jkun ta' madwar 50 μm għall-irġiel u 250 μm għan-nisa. Madankollu, peress li spiss kull blokka ser ikun fiha rġiel u nisa (jekk iktar minn individwu wieħed jiġi inkorporat f'kull blokka), l-intervall ta' bejn is-sezzjonijiet minn dawn il-blokok għandu jkun ta' madwar 50 μm sakem jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet tal-gonadi minn kull raġel. Wara, l-intervall bejn is-sezzjonijiet jista' jiżdied għal madwar 250 μm għan-nisa. Is-sezzjonijiet jittebbgħu b'ematossilina u eożina u jiġu eżaminati b'mikroskopju ħafif b'enfasi fuq is-sess (irġiel, nisa, intersess jew mhux differenzjati). L-interess huwa ddefinit bħala preżenza ta' iktar minn ooċita waħda f'testikolu għal kull sitt sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatoġeniċi (iva/le) fl-ovarji. L-istopatoloġija u s-sejbien tal-istadju tal-ovarji u t-testikoli mhumiex obbligatorji iżda jekk jiġu investigati, ir-riżultati għandhom jiġu analizzati statistikament u rrapportati. Ta' min jinnota li fin-natura tagħhom ċerti speċijiet tal-ħut ma għandhomx par żviluppat ta' gonadi u jista' jkun hemm gonada waħda (eż. il-medaka Ġappuniża u kultant iż-żebra). Dawn l-osservazzjonijiet kollha għandhom jiġu rreġistrati.

53. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku f'medaka Ġappuniża individwali hija bbażata fuq il-preżenza jew l-assenza tal-ġene ta' determinazzjoni tas-sess maskili tal-medaka, id-DMY, li jinsab fuq il-kromożoma Y. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jista' jiġi identifikat b'sekwenzjar tal-ġene DMY mid-DNA estratt minn, pereżempju, biċċa pinna anali jew dorsali. Il-preżenza tad-DMY tindika individwu (raġel) XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' DMY jindika individwu XX (mara) indipendentement mill-fenotip (23). Fl-Appendiċi 9 tingħata gwida għat-tħejjija tat-tessuti u l-metodu tal-PCR. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku fl-ispinarell issir bil-metodu ta' PCR ukoll, deskritt fl-Appendiċi 10.

54. L-okkorrenza ta' interess (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) għandha tiġi rrapportata.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

55. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji huma taħt kontroll endokrinali fi speċijiet bħall-medaka Ġappuniża; għaldaqstant, l-osservazzjonijiet tad-dehra fiżika tal-ħut għandhom isiru fi tmiem l-espożizzjoni, jekk dan ikun possibbli. Fil-medaka Ġappuniża, il-formazzjoni papillari fuq il-parti ta' wara tal-pinna anali fin-nisa hija sensittiva għall-androġeni. Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38) jipprovdi ritratti relevanti tal-karatteristiċi sesswali sekondarji tal-irġiel u n-nisa androġenizzati.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

56. Importanti li l-iktar test statistiku validu b'saħħtu jistabbilixxi l-punt ta' tmiem. L-irreplikat huwa l-unità sperimentali iżda l-varjabbiltà intrarreplikati għandha tkun inkluża fl-ittestjar statistiku. Flow-chart tad-deċiżjonijiet hija disponibbli fl-Appendiċi 8 biex tgħin fl-iktar test statistiku xieraq li għandu jintuża fuq il-bażi tal-karatteristika tad-dejta miksuba mit-test. Il-livell ta' importanza statistika huwa ta' 0,05 għall-punti ta' tmiem kollha inklużi.

Proporzjonijiet tas-sess u s-sess ġenetiku.

57. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni b'(test tax-xejriet) Jonckheere-Terpstra jekk jeżisti doża-rispons monotonu. Jekk tinstab nonmonotoniċità, f'dak il-każ għandu jiġi applikat pair wise test: Uża t-test ta' Dunnett jekk jistgħu jinkisbu normalità u varjanza omoġena. Uża Tamhane-Dunnett jekk tkun preżenti varjanza eteroġena. Inkella uża test eżatt ta' Mann-Whitney b'aġġustament ta' Bonferroni-Holm. Fl-Appendiċi 8 hemm flow chart li tiddeskrivi l-istatistiki tal-proporzjonijiet tas-sess. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu ppreżentati f'tabelli bħala proporzjonijiet tal-konċentrazzjoni ± SD ta' rġiel, nisa, interess u mhux differenzjati. Għandu jinxteħet dawl fuq is-sinifikat statistika. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42). Is-sess ġenetiku għandu jiġi rrapportat bħala perċentwal tal-bidla lura tas-sess fenotipiku ta' rġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati.

Konċentrazzjonijiet tal-VTG

58. Il-konċentrazzjonijiet tal-VTG għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni. It-test ta' Dunnett huwa ppreferut iktar mit-test-t bil-korrezzjoni ta' Bonferroni. Meta tintuża korrezzjoni Bonferroni, aħjar tintuża l-korrezzjoni ta' Bonferroni-Holm. Għandu jiġi pprovdut għal log-trasformazzjoni tal-VTG sabiex jinkisbu normalità u omoġenità tal-varjanza. Imbagħad, jekk il-konċentrazzjoni-rispons ikun konsistenti ma' monotoniċità, f'dak il-każ aħjar jintuża t-test ta' JonckheereTerpstra u mhux dawk imsemmijin iktar 'il fuq. Jekk jintużaw it-testijiet-t jew it-test ta' Dunnett, ma hemmx bżonn ta' test-F ANOVA ta' sinifikanza biex wieħed jipproċedi. Għad-dettalji, ara l-flow-chart fl-Appendiċi 8. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala medji tal-konċentrazzjoni ± SD għal irġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati b'mod separat. Għandu jinxteħet dawl fuq is-sinifikanza statistika għal nisa fenotipiċi u rġiel fenotipiċi. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Konċentrazzjonijiet propji tas-sustanza kimika tat-test

59. Il-konċentrazzjonijiet propji tal-kompartiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu analizzati fil-frekwenzi deskritti fil-paragrafu 34. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala konċentrazzjoni medja ± SD fuq bażi tal-irreplikati kif ukoll fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni b'enfasi fuq l-informazzjoni dwar in-numru ta' kampjuni u b'outliers mill-konċentrazzjoni medja tat-trattament ± 20 %. L-eżempji jistgħu jinkisbu mir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Interpretazzjoni tar-riżultati

60. Ir-riżultati tat-test għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' identifikazzjoni tal-metodu analitiku.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

— Il-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti; identifikazzjoni tas-sustanza kimika, dejta li tinkludi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

— Il-proċedura tat-test użata (eż. tiġdid/semistatiku bi fluss kontinwu); id-disinn tat-test għandu jinkludi konċentrazzjonijiet tat-test, il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin (f'Anness), il-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejlin u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fil-kompartimenti tat-test u l-metodu li bih inkisbu (il-metodu analitiku użat għandu jiġi ppreżentat f'Anness); Evidenza li l-kejliet jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-kwalità tal-ilma fi ħdan il-kompartimenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmigħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza u l-analiżijiet għall-kontaminanti (eż. il-PCBs, il-PAHs u l-pestiċidi organokloru) jekk relevanti.

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validità: dejta dwar ir-rata ta' tifqis għandha tiġi ppreżentata f'tabelli bħala perċentwal għal kull irreplikat u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji ta' aċċettazzjoni (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati. Is-sopravivenza għandha tiġi ppreżentata bħala perċentwal għal kull irreplikat u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji tal-validità (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati;

— Indikazzjoni ċara tar-riżultati miksubin fuq il-punti ta' tmiem differenti osservati: sopravivenza u tifqis b'suċċess tal-embrijuni; anormalitajiet esterni; tul u piż; kejliet tal-VTG (ng/g omoġenat, ng/ml plażma jew ng/mg fwied); istoloġija tal-gonadi, proporzjon tas-sessi, dejta dwar is-sess ġenetiku; inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli prodott mis-sustanza kimika tat-test.

62. Ir-riżultati għandhom jiġu ppreżentati bħala valur medji ± devjazzjoni standard (SD) jew żball standard (SE). L-istatistiki għandhom jiġu rrapportati tal-inqas bħala NOEC u LOEC u intervalli ta' kunfidenza. Għandha tiġi segwita l-flow-chart statistika (Appendiċi 8).

LETTERATURA

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, 'Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals', Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, 'Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment', Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), 'An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin', Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), 'Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), 'Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters', Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), 'Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone', Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), 'Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances', Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), 'Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), 'Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), 'Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)', Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), 'Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), 'The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction', Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), 'Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka', Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), 'Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology', 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), 'Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)', Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), 'Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), 'Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening', Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), 'Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone', Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), 'An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio', Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), 'Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes', Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), 'Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations', Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), 'Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), 'Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake', Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C. R. Tyler (2006), 'Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)', Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), 'Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), 'Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)', Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), 'Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations', Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), 'Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)', Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), 'Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development', Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), 'Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)', Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Il-Kapitolu C.14 ta' dan l-Anness, Test tat-Tkabbir tal-Ħut Żgħir.

(35) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Bijodegradabilità Lesta.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures,* Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Ħut ta' 21 Jum: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), 'Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio' Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test,* Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test,* Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test,* Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi. ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.

Appendiċi 1

Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaġuna effett fil-livell tal-popolazzjoni

ASV: Valur ta' saturazzjoni tal-arja

Bijomarkatur: Li jikkaġuna effett fil-livell individwali

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Dph: Jiem wara t-tifqis

DMY: Ġene tad-dominju DM speċifiku għall-Y meħtieġ għall-iżvilupp tal-irġiel fil-ħut medaka

ELISA: Assaġġ tal-Immunosorbent Marbut mal-Enżimi

Piż tal-ħut: Piż imxarrab tal-ħut (imnixxef bit-taptip)

FSDT: Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut

Assi tal-HPG: Assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali

Ħut intersess: Ħut b'iktar minn ooċita waħda fit-testikoli għal kull 6 sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatoġeniċi fl-ovarji (iva/le)

Rata tat-tagħbija: Piż imxarrab tal-ħut għal kull volum ta' ilma

MOA: Modalità ta' azzjoni

RT-PCR: Reazzjoni Katina tal-Polimerażi tat-Transkriptażi Rigressiva

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata li tuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Ħut mhux differenzjat: Ħut b'gonadi li ma jesibixxu ebda ċellula ġerminali dixxernibbli.

VTG: Vitelloġenina

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT (speċijiet tal-ilma ħelu)

1. Speċijiet irrakkomandati	Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*)	Żebra (*Danio rerio*)	Spinarell (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Tip tat-test	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa'
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	16-il siegħa dawl, 8 sigħat dlam
7. Daqs minimu tal-kompartiment	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l
8. Skambji tal-volumi tas-soluzzjonijiet tat-test	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum
9. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu tal-espożizzjoni	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid
10. Nru ta' bajd għal kull trattament	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120
11. Nru ta' trattamenti	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)
12. Nru ta' rreplikati għal kull trattament	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (ħlief f'każ ta' allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)
13. Reġim tat-tmigħ	*Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum	Ikel speċjali għall-ħut żgħir, *Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum	*Artemia* ħajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmigħ darbtejn kuljum

14. Għoti tal-arja	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 70 %
15. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif
16. Durata tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test	60-dph	60-dph	60-dph
17. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Suċċess tat-tifqis, morfoloġija Gross tas-Sopravivenza, VTG istoloġija tal-gonadi, Sess ġenetiku Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istoloġija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istoloġija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi
18. Kriterji tal-aċċettabilità tat-test għall-irreplikati kollettivi tal-kontrolli	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %
	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis ≥ 70 % tkabbir
	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 150 mg	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 75 mg	(Piż imxarrab tal-ħut, imnixxef bit-taptip) > 120 mg
	Tul (tul standard) > 20 mm	Tul (tul standard) > 14 mm	Tul (tul standard) > 20 mm
	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %

Appendiċi 3

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

KOSTITWENT	KONĊETRAZZJONI
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 μg /l
Kloru residwu	< 10 μg /l
Pestiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

Appendiċi 4

Mill-metodu ta' ttestjar C.14 /gwida dwar il-konċentrazzjonijiet tat-test

Kolonna (Numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10 jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Minn kolonna tista' tingħażel sensiela ta' tliet konċentrazzjonijiet suċċessivi (jew iktar). Il-punti tan-nofs bejn il-konċentrazzjonijiet fil-kolonna (x) jinsabu fil-kolonna (2x + 1). Il-valuri elenkati jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet mogħtijin bħala perċentwal għal kull volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jiġu mmoltiplikati jew jiġu diviżi bi kwalunkwe power ta' 10 kif xieraq. Tista' tintuża l-kolonna 1 jekk kien hemm inċertezza konsiderevoli fuq il-livell tat-tossiċità.

Appendiċi 5

Gwida għall-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb minn żebra, karpjun buras, spinarell u medaka ġappuniża żgħar

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri li jseħħu qabel ma tiġi kkwantifikata l-konċentrazzjoni tal-VTG. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw fi kwantifikazzjoni paragunabbli tal-VTG. Tista' tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tad-demm jew il-fwied minflok l-omoġenat tar-ras/tad-denb.

Proċedura

1. Il-ħut huwa anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

2. Ir-ras u d-denb jinqatgħu skont id-deskrizzjoni tat-test. **Importanti**: L-istrumenti kollha ta' dissezzjoni, u l-injama tal-qtugħ għandhom jitlaħalħu u jitnaddfu sew (eż. b'etanol 96 %) bejn it-tqandil ta' kull ħuta individwali sabiex jiġi evitat 'tniġġis tal-VTG' minn nisa jew irġiel indotti għal irġiel mhux indotti.

3. Il-piż tar-ras u d-denb kollettivi minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.

4. Wara li jintiżnu, il-partijiet jitqiegħdu f'tubi xierqa (eż. eppendorf 1,5 ml) u jiġu ffriżati f'– 80 °C sal-omoġenizzazzjoni jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistils tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). **Importanti**: *It-tubi għandu jkollhom in-numru xieraq sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu rrelatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istoloġija tal-gonadi.*

5. Meta tinkiseb massa omoġena jiżdied ammont ta' 4-10 darbiet il-piż tat-tessut ta' **bafer ta' omoġenizzazzjoni** (*) kiesaħ silġ (ħu nota tad-dilwizzjoni). Ibqa' aħdem bil-pistils sakemm it-taħlita tiġi omoġena. **Nota importanti**: *Għal kull ħuta jintużaw pistils ġodda.*

6. Il-kampjuni jitqiegħdu fis-silġ saċ-ċentrifugazzjoni f'**4 °C** f'50 000 g għal 30 min.

7. Uża pipetta biex tiddistribwixxi porzjonijiet ta' 20 sa 50 µl (ħu nota tal-ammont) supernatant f'**tal-inqas żewġ** tubi billi tbill il-ponta tal-pipetta taħt is-saff ta' xaħam tal-wiċċ u billi tiġbed bil-galbu s-supernatant mingħajr xaħam- jew frazzjonijiet ta' gerbub.

8. It-tubi jinħażnu f'– 80 °C sakemm jintużaw.

(*) *Bafer ta' omoġenizzazzjoni*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Taħlita tal-inibitur tal-proteażi (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Taħlita tal-inibitur tal-proteażi (jew taħlitiet tal-inibitur tal-proteażi ekwivalenti).

TRIS: TRIS-ULTRA PUR (ICN)

Taħlita tal-inibitur tal-proteażi: Mis-Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott **P 8340**.

Nota: Il-bafer ta' omoġenizzazzjoni għandu jintuża dakinhar tal-manifattura tiegħu. Qiegħdu fuq is-silġ matul l-użu

Appendiċi 6

Gwida għall-kwantifikazzjoni tal-vitelloġenina tal-omoġenat tar-ras u d-denb fiż-żebra (Danio rerio) (immodifikata minn Holbech et al., 2001). jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jużaw standards u antikorpi omologi

1. Il-platti tal-mikrotiter (Maxisorp F96 iċċertifikat, Nunc, Roskilde id-Danimarka) miksijin minn qabel b'5 µg/ml lipovitellina-IgG antiżebra jitħallew joqogħdu u jinħaslu tliet darbiet b'bafer tal-ħasil (*).

2. Il-vitelloġenina ppurifikata standard taż-żebra ([1]) tiġi dilwita b'mod serjali għal 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 u 20 ng/ml f'bafer ta' dilwizzjoni (**) u l-kampjuni jiġu dilwiti tal-inqas 200 darba (sabiex jiġi evitat effett matriċi) f'bafer ta' dilwizzjoni u tiġi applikata għall-platti. Jiġi applikat kontroll tal-assaġġ f'duplikat. Jiġu applikati 150 µl f'kull toqba. L-istandards huma applikati fid-duplikat u l-kampjuni fi triplikat. Inkubahom tul il-lejl f'4 °C fuq xejker.

3. Il-platti jinħaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil (*)

4. HRP akkoppjata ma' katina dextran (eż. AMDEX A/S, id-Danimarka) u antikorpi kkonjugati huma dilwiti f'bafer tal-ħasil; Id-dilwizzjoni propja tvarja skont il-lott u l-età. Jiġu applikati 150 µl għal kull toqba u l-platti jiġu inkubati għal siegħa f'temperatura tal-kamra fuq xejker.

5. Il-platti jinħaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil u qiegħ il-platti jitnaddaf bil-galbu bl-etanol.

6. F'kull toqba jiġu applikati 150 µl TMB plus (***). Ipproteġi l-platt kontra d-dawl b'fojl tal-landa, u ara l-iżvilupp tal-kulur fuq xejker.

7. Meta l-kurva standard tiġi żviluppata bis-sħiħ, l-attività tal-enżima titwaqqaf billi jiżdiedu 150 µl 0,2 M H_2SO_4 f'kull toqba.

8. L-assorbenza titkejjel b'450 nm (eż. fuq Molecular Devices Thermomax plate reader). Id-dejta tiġi analizzata fuq is-software assoċjat (eż. Softmax).

(*) Bafer tal-ħasil:

PBS-stock (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 u imla sa 5 l b'H_2O millipori. Aħżen f'4 °C.

(**) Bafer ta' dilwizzjoni:

PBS-Stock (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 u imla sa 1 l b'H_2O millipori. Aħżen f'4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), ippurifikat skont: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

(***) TMB plus huwa substrat 'lest biex tużah' immanifatturat minn KemEnTec (id-Danimarka). Huwa sensittiv għad-dawl. Aħżen f'4 °C.

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4\ 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Aġġusta l-pH għal 6,8 u imla sa 2 l b'H_2O millipori. Aħżen f'temperatura tal-kamra.

Appendiċi 7

Gwida għat-tħejjija tas-sezzjonijiet tat-tessut għad-determinazzjoni tas-sessi u s-sejbien tal-istadju tal-gonadi

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri li jseħħu qabel l-evalwazzjoni tas-sezzjonijiet istoloġiċi. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw f'determinazzjoni tas-sessi u sejbien tal-istadji tal-gonadi li huma simili.

Bi ftit eċċezzjonijiet, dawn il-proċeduri huma simili għal medaka Ġappuniża (JMD) u żebra (ZF).

Ewtanażja, Nekropsija, u Fissazzjoni tat-Tessuti

Objettivi:

1. Jiġi pprovdut għas-sagrifiċċju dinjituż tal-ħut.

2. Il-kisba tal-piżijiet u l-kejliet meħtieġa.

3. Evalwazzjoni ta' karatteristiċi sekondarji tas-sessi.

4. Dissezzjoni tat-tessuti għal analiżi tal-VTG.

5. Fissazzjoni tal-gonadi.

Proċeduri:

1. Il-ħut għandu jiġi ssagrifikat eżatt qabel in-nekropsija. Għalhekk, sakemm ma jkunx hemm bosta prosetturi disponibbli, ma għandhomx jiġu ssagrifikati diversi ħutiet fl-istess ħin.

2. Bl-użu ta' xibka b'manku żgħir, ħuta titneħħa mill-kompartiment sperimentali u tittieħed fiż-żona tan-nekropsija fil-kontenitur tat-trasport.

3. Il-ħut jitqiegħed fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. Il-ħut jitneħħa mis-soluzzjoni meta jieqaf jieħu nifs u ma jibqax risponsiv għal stimoli esterni.

4. Jittieħed il-piż imxarrab tal-ħut.

5. Għat-tħejjija tat-tessuti għal analiżi tal-VTG, il-ħut jista' jitqiegħed fuq bord tas-sufra fuq il-pjanċa ta' mikroskopju ta' dissezzjoni.

   a. Għaż-żebra, ir-ras tinqata' eżatt wara l-pinna pettorali u d-denb jinqata' eżatt wara l-pinna dorsali.

   b. Għal medaka Ġappuniża, l-addome jinfetaħ permezz ta' qatgħa magħmula bil-galbu li testendi tul il-linja tan-nofs ventrali miċ-ċintura pettorali sa punt kranjali sal-anus. Bl-użu ta' forċipi żgħar u mqass żgħir, jitneħħa bil-galbu l-fwied.

6. Il-kampjuni għall-analiżi tal-VTG jitqiegħed f'tubi eppendorf u jiġu ffriżati minnufih f'nitroġenu likwidu.

7. Il-karkassi inklużi l-gonadi jitqiegħdu f'kaxxetta tat-tessuti tal-plastik immarkata minn qabel, li mbagħad tiġi ttrasferita f'fissattiv ta' Davidson jew Bouin. Il-volum tal-fissattiv għandu jkun tal-inqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Il-kontenitur tal-fissattiv jitħawwad bil-galbu għal ħames sekondi sabiex jinqalgħu l-bżieżaq tal-arja mill-kaxxetta.

8. a. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson tul il-lejl kollu, u mbagħad l-għada jiġu ttrasferiti f'konténituri individwali ta' formalina bbaferjata newtrali ta' 10 %. Il-kontenituri bil-kaxxetti jitħalltu bil-galbu għal 5 sekondi sabiex tiġi żgurata penetrazzjoni adegwata tal-formalina fil-kaxxetti.

   b. It-tessuti jibqgħu f'fissattiv ta' Bouin għal 24 siegħa, u mbagħad jiġu ttrasferiti f'etanol ta' 70 %.

Ipproċessar tat-Tessuti

Objettivi:

1. Tessut deidratat għal penetrazzjoni adegwata tal-paraffina.
2. Introduċi l-paraffina fit-tessut sabiex tinżamm l-integrità tat-tessut u jinħoloq wiċċ sod għal mikrotomija.

Proċeduri:

3. Il-kaxxetti tat-tessut immarkati jitneħħew mill-formalina/ħżin tal-etanol u l-kaxxetti jitqiegħdu fil-basket/basktijiet tal-ipproċessar. Il-basket tal-ipproċessar jiġi kkargat fil-proċessur tat-tessuti.
4. Tingħażel l-iskeda tal-ipproċessar.
5. Meta l-proċessur tat-tessuti jlesti ċ-ċiklu ta' pproċessar, il-basket/basktijiet jista' jiġi ttrasferit fl-istazzjon inkorporata.

Inkorporazzjoni

Objettiv:

Orjenta l-kampjun kif xieraq f'paraffina ssolidifikata għal mikrotomija.

Proċeduri:

1. Il-basket/basktijiet tal-kaxxetti jitneħħa mill-proċessur u jitgħaddas fil-kompartiment ta' quddiem mimli paraffina tal-konsol termali tal-istazzjon ta' inkorporazzjoni jew inkella l-kaxxetti jitqiegħdu f'ħiter tal-paraffina separat.
2. L-ewwel kaxxetta li trid tiġi inkorporata mill-kompartiment ta' quddiem tal-konsol termali jew il-ħiter tal-paraffina. L-għatu tal-kaxxetta jitneħħa u jintrema, u t-tikketta tal-kaxxetta tiġi kkontrollata mar-rekords tal-annimali biex jiġu solvuti diskrepanzi potenzjali qabel l-inkorporazzjoni.
3. Tingħażel kaxxa tat-tiswir ta' inkorporazzjoni b'daqs xieraq.
4. Il-kaxxa tat-tiswir tinżamm taħt iż-żennuna tal-konsol tad-distribuzzjoni u timtela' b'paraffina mdewba.
5. Il-kampjun jitneħħa mill-kaxxetta u jitqiegħed fil-paraffina mdewba fil-kaxxa tat-tiswir. Dan jiġi rripetut b'4-8 kampjuni għal kull kaxxa tat-tiswir tal-paraffina. Il-pożizzjoni tal-ħut individwali tiġi mmarkata billi l-ħuta nru 1 titqiegħed f'180 grad mill-ħuta 2-4/8.
6. Hija meħtieġa paraffina addizzjonali biex ikun kopert il-kampjun.
7. Il-kaxxa tat-tiswir bil-bażi tal-kaxxetta titqiegħed fuq il-platt tat-tkessiħ tal-kriokonsol.
8. Wara li tissolidifika l-paraffina, il-blokka (jiġifieri l-paraffina mwebbsa li fiha t-tessuti u l-bażi tal-kaxxetta) titneħħa mill-kaxxa tat-tiswir.

Mikrotomija

Objettiv:

Aqta' u tella' s-sezzjonijiet istoloġiċi għat-tilwin.

Proċeduri:

1. Il-fażi inizjali tal-mikrotomija msejħa 'facing' issir kif ġej:
   a. Il-blokka tal-paraffina titqiegħed fiċ-ċokk tal-mikrotoma.
   b. Iċ-ċokk jitmexxa billi tiddawwar ir-rota tal-mikrotoma u s-sezzjonijiet ħoxnin jinqatgħu mill-wiċċ tal-paraffina tal-blokka sakemm is-sikkina tilħaq it-tessuti inkorporati.

c. Il-ħxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma hija stabbilita għal bejn 3 — 5 mikroni. Iċ-ċokk jitmexxa u jinqatgħu bosta sezzjonijiet mill-blokka sabiex jitneħħa kwalunkwe oġġett maħluq fuq wiċċ il-qatgħa tat-tessut matul il-qtugħ ta' fuq fuq.

d. Il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel fuq is-silġ biex tassorbi t-tessut.

2. Il-fażi li jmiss tal-mikrotoma hija s-sezzjonar finali u t-tlugħ tas-sezzjonijiet tat-tessut fuq is-slides. Dawn il-proċeduri jsiru kif ġej:

a. Jekk il-blokka tqiegħdet fuq is-silġ, il-blokka titneħħa mis-silġ u tiġi sostitwita fiċ-ċokk tal-mikrotoma.

b. Bil-ħxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma stabbilita għal 3 — 5 mikroni, iċ-ċokk jitmexxa bit-tidwir tar-rota tal-mikrotoma. Is-sezzjonijiet jinqatgħu mill-blokka sakemm tiġi prodotta 'żigarella' waħda li jkun fiha tal-inqas sezzjoni aċċettabbli waħda inklużi l-gonadi. (Skont kif ikun il-bżonn matul is-sezzjonar, il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk, titqiegħed fuq is-silġ biex tixrob it-tessut, u tiġi sostitwita fiċ-ċokk.)

c. Is-sezzjonijiet jiġu ggalleġġati ċatti fuq wiċċ l-ilma fil-banju tal-ilma. Isir tentattiv biex tal-inqas tinkiseb sezzjoni waħda li ma jkun fiha ebda tikmix u ma jkollha ebda bżieżaq tal-arja maqbudin taħtha.

d. Slide tal-mikroskopju titgħaddas taħt l-aħjar sezzjoni, li tinħareġ mill-ilma bl-użu tas-slide. Dan il-proċess jissejjaħ 'tlugħ' tas-sezzjoni fuq is-slide.

e. It-tliet sezzjonijiet jitħejjew għal sett ħut. It-tieni u t-tielet sezzjonijiet jittieħdu f'intervalli ta' 50 mikron wara l-ewwel sezzjoni. Jekk il-ħut ma jiġix inkorporat bil-gonadi tiegħu fl-istess livell ta' sezzjonar, iridu jsiru iktar sezzjonijiet sabiex jiġi żgurat li jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet inklużi l-gonadi minn kull ħuta.

f. B'pinna li timmarka s-slides, fuq is-slide jitħażżeż in-numru tal-blokka li minnu ġiet prodotta s-slide.

g. Is-slide titqiegħed f'reċipjent tat-tilwin.

h. Il-blokka titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel għall-ħżin.

Tilwin, Vetrina għatu, u Tikkettar tas-Slides

Objettivi:

— Ċappas is-sezzjonijiet għal eżaminazzjoni istopatoloġika

— Issiġilla b'mod permanenti t-tessuti mtellgħin u mlewna.

— Identifika b'mod permanenti s-sezzjonijiet imlewnin b'mod li jippermetti traċċabbiltà sħiħa.

Proċeduri:

1. Tilwin

a. Is-slides jitnixxfu bl-arja tul il-lejl qabel jitlewnu.

b. Is-sezzjonijiet jiċċappsu b'Ematossilina-Eosina.

2. Vetrina għatu

a. Il-vetrini għatu jistgħu jiġu applikati b'mod manwali jew awtomatiku.

b. Slide titgħaddas fil-ksilen jew TissueClear, u l-ksilen/TissueClear żejjed jitneħħa b'taptip ħafif mill-ġenb.

c. Jiġi applikat madwar 0,1 ml tal-midjum tat-tlugħ qrib tmiem is-slide faċċata t-tarf finali kiesaħ jew fuq il-vetrina għatu.

d. Il-vetrina għatu tiddawwar f'angolu baxx u tiġi applikata fuq is-slide.

3. Tikkettar

e. Kull tikketta tas-slide għandu jkun fiha l-informazzjoni li ġejja.

i. Isem il-laboratorju

ii. L-ispeċijiet

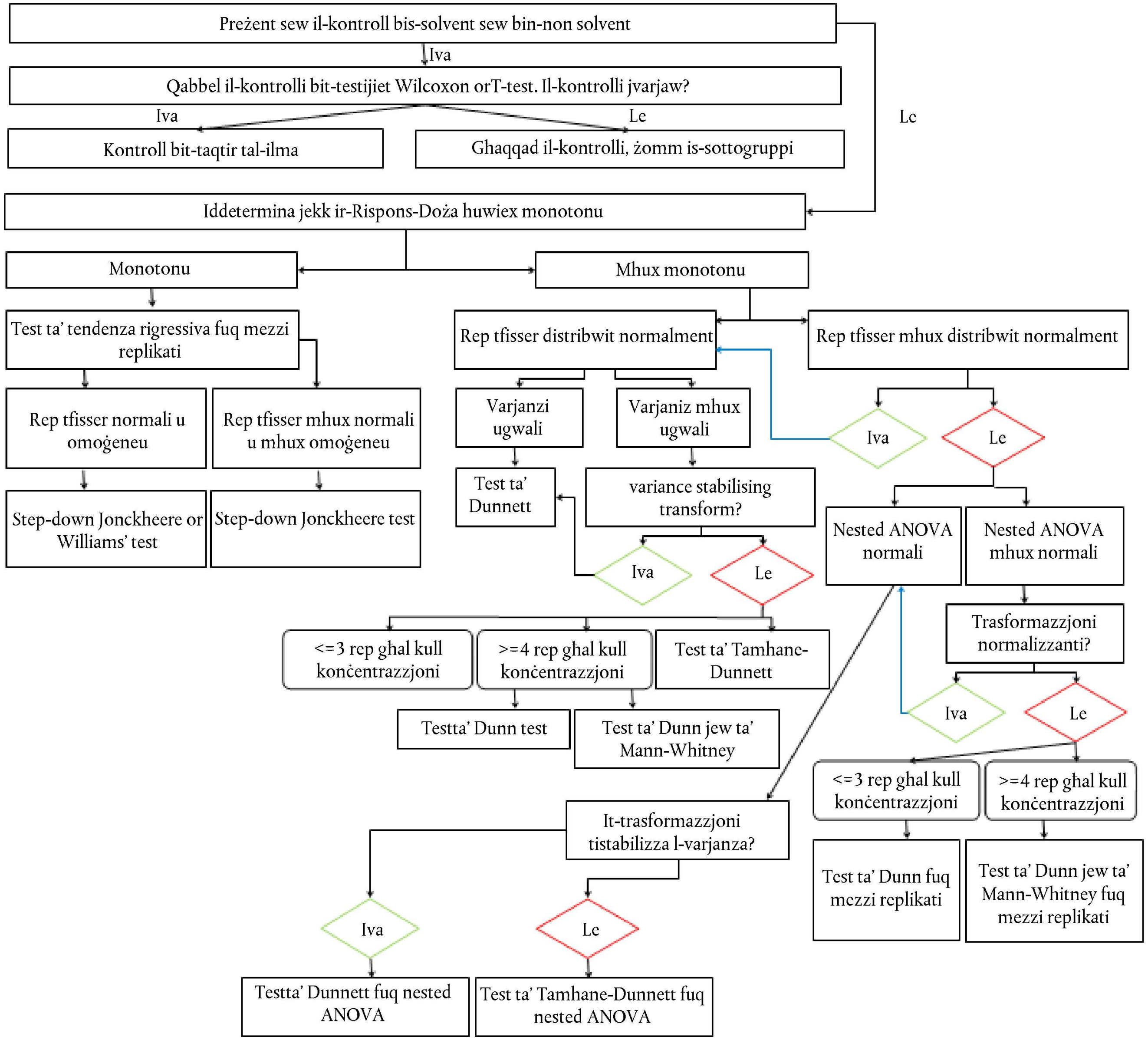
iii. Nru tal-Kampjun / Nru tas-Slide

iv. Grupp tat-trattament / Sustanza Kimika

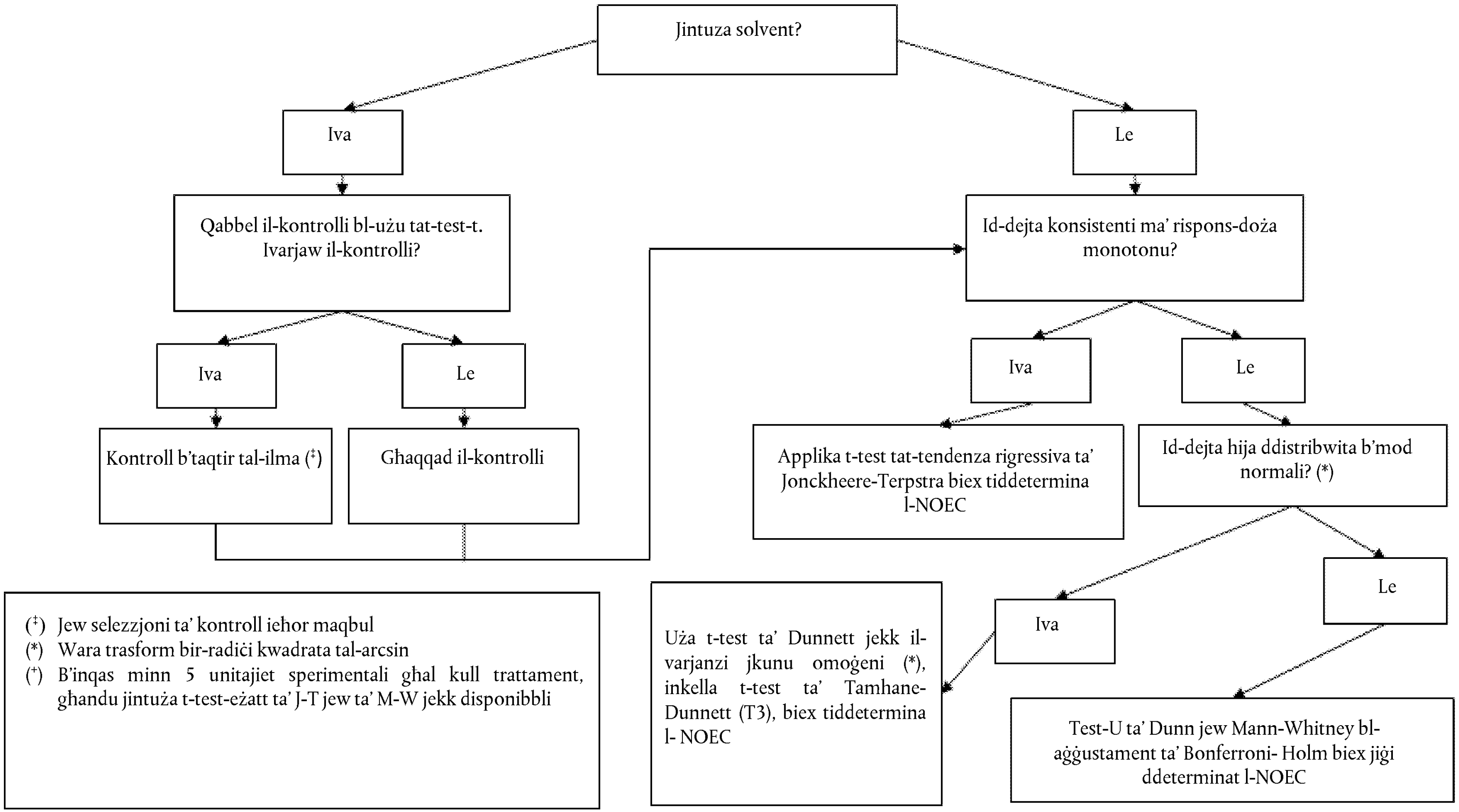
v. Data

Appendiċi 8

Flow Chart Statistika għal analiżi tal-vitelloġenina



Flow Chart Statistika għal analiżi tal-proporzjon tas-sessi



Appendiċi 9

Gwida għall-kampjunar tat-tessuti għal determinazzjoni tas-sess ġenetiku u għad-determinazzjoni tas-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR

Il-kampjunar, it-tħejjija u l-ħżin tat-tessuti qabel ma jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu PCR fil-medaka (Imħejji mil-Laboratorju għall-Organiżmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG)

1. B'imqass jaqta' sew ser tinqata' l-pinna anali jew dorsali f'kull ħuta individwali u titqiegħed f'tubu mimli b'100 µl bafer ta' estrazzjoni 1 (ara iktar 'il quddiem dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer). L-imqass jitnaddaf wara kull ħuta f'bekk mimli H_2O distillat u mnixxef b'biċċa tal-karti.

2. Imbagħad it-tessuti tal-pinna ser jiġu omoġenizzati b'pistil tat-teflon tal-mikrotubu għal-liżi taċ-ċelloli. Għal kull tubu ser jintuża pistil ġdid biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni. Il-pistils ser jitqiegħdu f'0,5 M NaOH għal lejl sħiħ, jitlaħilhu f'H_2O distillat għal ħames minuti u jinħażnu f'etanol jew jiġu sterilizzati wara l-awtoklava sakemm jintużaw.

3. Huwa possibbli wkoll li t-tessut tal-pinna jinħażen mingħajr ebda bafer ta' estrazzjoni 1 f'silġ xott u mbagħad fi friġġ ta' – 80 °C sabiex tiġi evitata kwalunkwe degradazzjoni tad-DNA. Iżda l-estrazzjoni tmur aħjar, jekk testratta d-DNA fl-istess ħin (ara iktar 'il fuq dwar it-tqandil; il-kampjuni għandhom jitħallew joqogħdu fuq is-silġ wara li jinħażnu f'– 80 °C qabel ma l-bafer jinħażen fit-tubi).

4. Wara l-omoġenizzazzjoni, it-tubi kollha jitqiegħdu f'banjumarija u jitgħallew għal 15-il minuta f'100 °C.

5. Imbagħad bil-pipetta ser jiddaħħlu 100 µl bafer ta' estrazzjoni 2 (ara iktar 'il quddiem għal dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer) f'kull tubu. Il-kampjuni jinħażnu f'temperatura tal-kamra għal 15-il minuta u fl-istess ħin kultant ser jitheżżu bl-id sabiex jitħalltu bil-galbu.

6. Wara, it-tubi kollha jitqiegħdu fil-banju tal-ilma mill-ġdid u jitgħallew għal 15-il minuta oħra f'100 °C.

7. Sakemm issir analiżi ulterjuri, it-tubi ser jiġu ffriżati f'– 20 °C.

Preparazzjoni tal-bafer

PCR-bafer 1:

500 mg N-Lauroilsarkożina (eż. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H_2O

→ awtoklava

PCR-bafer 2:

20 g Chelex (eż. Biorad, Munich, GE)

Biex jintefaħ f'100 ml dest. H_2O

→ awtoklava

Stabbiliment tas-sess ġenetiku (bil-metodu PCR) fil-medaka (Imħejji mil-Laboratorju għall-Organiżmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG u Universität Würzburg Biozentrum)

It-tubi mħejjin u ffriżati (deskritti fis-sezzjoni ta' hawn fuq) ser jitħallew joqogħdu fuq is-silġ. Wara, ser jiġu ċċentrifugati bl-użu ta' ċentrifugu Eppendorf (30sek b'veloċità massima f'temperatura tal-kamra). Għall-PCR, jintuża s-supernatant ċar isseparat mill-preċipitat. Irid jiġi evitat b'mod assolut milli xi traċċa ta' Chelex (li jinsab fil-preċipitat) tiġi ttrasferita fir-reazzjoni PCR, għaliex din tinterferixxi mal-attività polimerażi-'Taq'. Is-supernatant ser jintuża direttament jew jista' jinħażen iffriżat (f'– 20 °C) u jerġa' jitħalla joqgħod f'bosta ċikli mingħajr impatt negattiv fuq id-DNA għal analiżijiet iktar tard.

1. *Tħejjija tat-'Taħlita tar-Reazzjoni' (25 µl għal kull kampjun):*

	Volum	Konċentrazzjoni Finali
DNA Mudell	0,5 µl-2 µl	
10xPCR-bafer b'MgCl2	2,5 µl	1x
Nukleotidi (kull wieħed ta' dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Primer 'il Quddiem (10 µM) (ara taħt 3-5)	0,5 µl	200 nM
Primer b'Lura (10 µM) (ara taħt 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Ilma (grad tal-PCR)	sa 25 µl	
Taq E- Polimerażi	0,3 µl	1,5U
10xPCR-bafer b'$MgCl_2$: 670mM Tris/HCl (pH8,8 at 25°C), 160mM $(NH_4)_2SO_4$, 25mM MgCl2, 0,1 %Tween 20		

Għal kull PCR (ara taħt 3-5), hemm bżonn tal-primer speċjali bħala taħlita ġdida ta' 'Taħlita tar-Reazzjoni' u l-ammont adegwat meħtieġ tad-DNA mudell għal kull kampjun (ara iktar 'il fuq). Il-volumi rispettivi jiġu ttrasferiti f'tubi ġodda bl-użu tal-pipetti. Wara jingħalqu t-tubi kollha, jitħalltu (madwar 0 sek) u jiġu ċċentri-fugati (10 sek f'temperatura tal-kamra). Imbagħad ikunu jistgħu jibdew il-programmi-PCR rispettivi. Barra minn hekk, kontroll pożittiv (kampjun ta' DNA eżemplari b'attività magħrufa u riżultati ċari) u kontroll negattiv (1 µl dest. H_2O) ser jintuża f'kull programm PCR.

2. *Tħejjija tal-ġel tal-agarożju (1 %) – Meta jkunu qed isiru l-programmi-PCR:*

— Ħoll 3 g agarożju fi 300 ml × TAE-bafer (1 % ġel tal-agarożju)

— Din is-soluzzjoni għandha titgħalla b'microwave (madwar 2-3 min)

— Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq f'kaxxa speċjali għall-funditura, li tkun fuq is-silġ

— Wara madwar 20 min, il-ġel tal-agarożju jkun lest sabiex jintuża

— Il-ħżin tal-ġel tal-agarożju f'1 × TAE-bafer sa tmiem il-programmi-PCR

3. *Programm-Aċtina-PCR:*

Din ir-reazzjoni tal-PCR għandha l-għan li turi li d-DNA fil-kampjun ma ġarrabx ħsara.

— Primer speċjali:

'Mact1(superjuri/'il quddiem)' → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

'Mact2(inferjuri/b'lura)' → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (35 darba):

Denaturazzjoni → 45 sek f'95 °C

Rikottura → 45 sek f'56 °C

Ġebbid → 1 min fi 68 °C

15 min 68 °C

4. *Programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Il-kampjuni bid-DNA sħiħ jintużaw f'dan il-programm-PCR biex jiġu identifikati l-Ġeni X u Y. Id-DNA tal-irġiel għandu juri faxxa doppja u d-DNA tan-nisa għandu juri faxxa waħda (wara tilwin u elettroforeżi bil-ġel). Għal dan il-programm għandu jkun inkluż kontroll pożittiv għall-irġiel (kampjun-XY) u ieħor għan-nisa (kampjun-XX).

— Primer speċjali:

'PG 17.5' (superjuri/'il quddiem) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

'PG 17.6' (inferjuri/b'lura) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni	→ 45 sek f'95 °C
Rikottura	→ 45 sek f'55 °C
Ġebbid	→ 1 min 30 sek fi 68 °C

15 min 68 °C

5. *Il-programm-PCR tal-Ġene Y bħala 'kontroll' għall-programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Dan il-program-PCR jivverifika r-riżultati tal-'programm-PCR tal-Ġeni X u Y'. Il-'kampjuni tal-irġiel' għandhom juru faxxa waħda u l-'kampjuni tan-nisa' ma għandhom juru ebda faxxa (wara t-tilwin u l-elettroforeżi bil-ġel).

— Primer speċjali:

'DMTYa (superjuri/'il quddiem)' → GGC CGG GTC CCC GGG TG

'DMTYd (inferjuri/b'lura)' → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programm

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni	→ 45 sek f'95 °C
Rikottura	→ 45 sek f'56 °C
Ġebbid	→ 1 min fi 68 °C

15 min 68 °C

6. *Tilwin tal-kampjuni tal-PCR:*

Soluzzjoni tat-tilwin:

50 % Gliċerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Bromfenolblu

0,25 % Ksilenksianol

Bil-pipetta daħħal 1 µl soluzzjoni tat-tilwin f'kull tubu

7. *Bidu tal-Elettroforeżi bil-Ġel:*

— Il-ġel tal-agarożju ta' 1 % jiġi ttrasferit f'kompartiment ta' elettroforeżi bil-ġel mimli b'1 × TAE-Bafer

— 10 — 15 µl minn kull kampjun tal-PCR imlewwen ser jiddaħħlu f'taqsima tal-ġel tal-agarożju

— Anki 5 — 15 µl tal-1kb-'Ladder' (Invitroġen) ser jiddaħħlu bil-pipetta f'taqsima separata

— Ibda l-elettroforeżi b'200 V

— Waqqafha wara 30-45 min

8. *Stabbiliment tal-faxex:*

— Naddaf il-ġel tal-agarożju f'H_2O distillat

— Imbagħad ittrasferixxi l-ġel tal-agarożju fi bromid tal-Etidju għal 15 — 30 min

— Wara għandu jittieħed ritratt tal-ġel tal-agrożju f'kaxxa tad-dawl UV.

— Fl-aħħar, il-kampjuni jiġu analizzati f'paragun mal-faxxa (jew faxex) ta' kontroll pożittiv u l-ladder.

Appendiċi 10

Gwida dwar il-kampjunar tat-tessuti sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR fl-ispinarell

Kampjunar tat-tessut u estrazzjoni tad-DNA

Id-DNA jista' jiġi estratt bl-użu ta' firxa ta' reaġenti kummerċjalment disponibbli u sistemi ta' estrazzjoni manwali kif ukoll awtomatizzati. Il-protokoll użat fil-laboratorju Cefas f'Weymouth huwa spjegat hawn taħt, u żdiedu l-approċċi alternattivi fejn kienu xierqa.

1. B'imqass li jaqta' sew, titneħħa biċċa tessut żgħira (10-20 mg) miż-żona dorsolaterali (wara t-tneħħija tar-ras u d-denb għal analiżi tal-VTG) minn kull ħuta individwali. It-tessut jiddaħħal f'tubu u jew jitqiegħed direttament f'nitroġenu likwidu (għall-ħżin fi – 80 °C) jew inkella jimtela b'70 % etanol (għat-trasport u l-ħżin sussegwenti f'4 °C). L-imqass jitnaddaf wara kull ħuta f'70 % etanol u mbagħad f'ilma ddistillat u jitnixxef b'biċċa tal-karti.

2. L-etanol (jekk preżenti) jitneħħa b'aspirazzjoni u t-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bi proteinażi K f'400 μl bafer ATL (Qiagen). Alikwota (200 μl) tad-diġest tiġi ttrasferita fi blokka-S b'96 toqba (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt f'format ta' 96 toqba bl-żu tal-Qiagen Universal BioRobot u l-QIamp Investigator BioRobot kit. Id-DNA jiġi elwit f'50 μl ilma ħieles DNase u RNase. Jekk jintużaw tessuti ibsin biex jiġi estratt id-DNA (bħal spina jew pinna pettorali) jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omoġenizzat fil-bafer tal-liżi bl-użu ta' FastPrep® tissue lyser jew sistema ekwivalenti ta' interferent tat-tessuti.

   Inkella,

   (a) it-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bil-proteinażi K f'400 μl G2 bafer tal-liżi (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt minn 200 μl tad-diġest bl-użu tal-EZ-1 DNA easy tissue mini kit u l-EZ-1 biorobot jew inkella bid-DNA easy mini tissue kit. Id-DNA jiġi elwit f'volum ta' 50 μl.

   (b) It-tessuti jiġu pproċessati bl-użu tar-reaġent DNAzol. Għal ftit żmien, il-kampjuni tat-tessut jiġu liżati f'1ml DNAzol għal 10 minuti f'mikrotubu ċentrifugu ta' 1,5 ml u mbagħad jiġu ċċentrifugati fi 13 000 rmp għal 5 minuti biex titneħħa kwalunkwe materja partikolata. Imbagħad, il-kampjun liżat jiġi ttrasferit f'mikrotubu ċentrifugu ġdid ta' 1,5 ml li fih 500 μl 100 % etanol ta' grad molekolari u mbagħad jiġi ċċentrifugat fi 13 000 rmp għal 10 minuti sabiex jiġi ppreċipitat id-DNA. L-etanol jitneħħa u jiġi sostitwit ma' 400 μl 70 % etanol ta' grad molekolari, iċċentrifugat fi 13 000 rpm għal 5 minuti u l-gerbuba tad-DNA tiġi dissolta f'50 μl ilma ħieles DNase u RNase molekolari. Mill-ġdid, meta jintużaw tessuti ibsin (pinna pettorali), jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omoġenizzat fil-bafer tal-liżi bl-użu ta' liżatur tat-tessut FastPrep® jew sistema ta' interferent tat-tessut ekwivalenti qabel ma jiġi estratt id-DNA.

3. Id-DNA jinħażen f'– 20 °C sa kemm hemm bżonn.

Nota importanti: iridu jintlibsu l-ingwanti matul il-proċeduri.

Analiżi tar-reazzjoni katina tal-polimerażi (PCR)

Saru amplifikazzjonijiet bl-użu ta' 2,5 μl mill-estratt tad-DNA f' volum ta' reazzjoni ta' 50 μl bl-użu tal-Idh locus primers (kif deskritt minn Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Primer 'il quddiem	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Primer b'lura	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Hemm bosta fornituri ta' reaġenti xierqa tal-PCR. Il-metodu spjegat hawn taħt huwa dak li bħalissa jintuża fil-laboratorju Cefas f'Weymouth.

1. *Tħejjija tat-'Taħlita ta' Reazzjoni' (50 µl għal kull kampjun):*

Titħejja supertaħlita kif ġej. Din tista' titħejja minn qabel u tinħażen iffriżata f'– 20 °C sakemm hemm bżonn. Agħmel supertaħlita suffiċjenti għal kontroll negattiv (ilma ta' grad tal-bijoloġija molekolari biss).

	Volum (konċ. tal-istokk)/ kampjun	Konċentrazzjoni Finali
5xGoTaq® Bafer ta' Reazzjoni	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM kull wieħed)	250 µM kull wieħed
Primer 'il Quddiem	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Primer b'Lura	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Ilma ta' grad tal-bijoloġija molekolari	30,75 µl	
GoTaq polimerażi	0,25 µl	1,25 U

— Iddistribwixxi 47,5 µl f'tubu tal-PCR ittikkettat b'ħajt irqiq ta' 0,5 ml.

— Żid 2,5 µl tad-DNA ippurifikat fit-tubu ttikkettat kif xieraq. Irrepeti għall-kampjuni kollha u l-kontroll negattiv.

— Fuqhom itfa' 2 taqtiriet żejt minerali. Inkella, uża ċiklatur termali b'għatu msaħħan.

— Agħlaq l-għotjien.

— Il-kampjuni ġew denaturati f'ċiklatur termali Peltier PTC-225 f'94 ± 2 °C għal 5 minuti segwiti minn 39 ċiklu ta' 94 ± 2 °C għal minuta, 55 ± 2 °C għal minuta, 72 ± 2 °C għal minuta, u estensjoni finali ta' 72 ± 2 °C għal 10 minuti.

2. *Tħejjija tal-ġel tal-agarożju (2 %):*

Tradizzjonalment, il-prodotti tal-PCR jiġu riżolti fuq 20 % ġel tal-agarożju li fih etidju tal-bromur.

Jistgħu jintużaw ukoll sistemi ta' elettroforeżi bbażati fuq il-kapillari.

— Iżen 2 g agarożju f'100 ml 1 × TAE-bafer

— Saħħan f'microwave (madwar 2-3 min) biex tħoll l-agarożju.

— Żid 2 taqtiriet tal-konċentrazzjoni finali tal-bromur tal-etidju 0,5 µg/ml

— Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq fit-tagħmir ta' funditura tal-ġel.

— Ħalli l-ġel jibbies

3. *Elettroforeżi bil-ġel:*

— Ittrasferixxi l-ġel tal-agrożju fit-tagħmir tal-elettroforeżi u għaddsu f'1 × TAE-bafer

— Tella' 20 µl minn kull kampjun f'toqba separata, billi żżid markatur tal-piż molekolari (100 bp DNA ladder, Promega) f'toqba vojta.

— L-elettroforeżi ssir f'120 V għal 30-45 minuta.

4. *Viżwalizzazzjoni tal-prodotti ta' amplifikazzjoni*

Jekk il-bromur tal-etidju ġie inkorporat fil-ġel tal-agarożju kif spjegat iktar 'il fuq, il-prodotti tad-DNA jiġu vviżwalizzati taħt sors tal-UV. Inkella, il-ġel tal-agarożju jingħata lewn billi l-ġel jinkesa b' soluzzjoni dilwita ta' bromur tal-etidju (0,5 µg/ml fl-ilma) għal 30 minuta qabel il-viżwalizzazzjoni.

Appendiċi 11

Gwida għall-proċedura ta' fertilizzazzjoni artifiċjali għall-ispinarell

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri sabiex jinkiseb bajd iffertilizzat mill-ispinarell sabiex jintuża fl-FSDT.

Proċeduri

Kisba ta' sperma mill-irġiel

1. Jiġi ewtanizzat raġel b'kulur xieraq mill-popolazzjoni mixtieqa.

2. It-testikoli jiġu dissezzjonati minn kull naħa tal-ħuta. *It-testikoli ġeneralment ikunu strutturi b'pigmentazzjoni skura u f'forma ta' lasta li mill-ewwel jidhru fil-linja tan-nofs laterali tal-ġisem.* Uża wieħed mill-metodi li ġejjin:

3. Billi tuża par imqass jaqta' sew, ibda fil-kloaka u agħmel inċiżjoni ta' 1,5 cm b'qatgħa waħda f'angolu ta' madwar 45 grad.

4. Uża sikkina kirurġika biex tagħmel inċiżjoni żgħira fil-ġenb tal-ħuta ftit wara l-pelvi u ventrali mis-saffi laterali.

5. It-testikoli jitneħħew bl-użu ta' forċipi tajbin u jitqiegħdu f'dixx petri.

6. Kull testikola tinksa b'100 µl **soluzzjoni finali ta' Hank** (*) magħmula friska.

7. It-testikoli jinqasmu bir-reqqa bl-użu ta' xafra jew sikkina kirurġika. Dan ser jeħles l-isperma u jagħti dehra mċajpra lis-soluzzjoni ta' Hank.

8. Il-fluwidu li fih l-isperma tiddaħħal f'tubu, filwaqt li jiġi evitat milli tiddaħħal xi biċċa mit-testikoli meta tintuża l-pipetta.

9. 800 µl mis-soluzzjoni finali ta' Hank jiddaħħlu fit-tubu u jitħawdu sew.

10. Jekk ikun hemm bżonn, ir-raġel jista' jiġi ppreservat billi jiġi ffissat f'100 % etanol jew fissattiv mixtieq ieħor. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk l-istudju jkun qiegħed jassenja l-oriġini mill-ġenituri tal-ħut żgħir.

(*) Is-Soluzzjoni Mmellħa Bbaferjata ta' Hank (HBSS):

L-HBSS hija meħtieġa sabiex tiġi ppreservata l-isperma filwaqt li titħejja l-fertilizzazzjoni.

Nota importanti: *Għad li ħafna mis-soluzzjonijiet ewlenin meħtieġa jistgħu jsiru minn qabel,* ***l-istokk 5*** *u mbagħad* ***is-soluzzjoni finali*** *għandhom isiru* ***friski*** *dakinhar tal-użu.*

Stokk 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Ilma distillat (DW)	100 ml

Stokk 2

Na_2HPO_4 (anidruż)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DW	100 ml

Stokk 3

$CaCl_2$	0,72 g
DW	50 ml

Stokk 4

$MgSO_4$ $7H_2O$	1,23 g
DW	50 ml

Stokk 5 (ippreparat frisk)

$NaHCO_3$	0,35 g
DW	10 ml

Nota: Jekk diġà għandek uħud mill-melħiet ta' hawn fuq iżda b'kontenut ta' ilma differenti (jiġifieri $2H_2O$ minflok anidru) xorta tista' tużahom iżda l-ewwel trid taġġusta l-piż fuq il-bażi tal-piż molekolari).

Għas-soluzzjoni finali ta' Hank, għaqqad fl-ordni li ġejja:

stokk 1	1,0 ml
stokk 2	0,1 ml
stokk 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
stokk 4	0,1 ml
stokk 5	0,1 ml

Ħawdu sew qabel l-użu.

Fertilizzazzjoni

1. Mill-popolazzjoni mixtieqa jiġu identifikati n-nisa kbar u tqal; in-nisa jkunu lesti għat-tagħfis biss meta tkun tisa' tara l-bajd ħiereġ mill-kloaka. In-nisa lesti għandhom il-karatteristika tal-qagħda 'b'rashom mgħollija'.

2. Mexxi sebgħek jew sebgħek il-kbir bil-mod fuq il-ġenb tal-ħuta lejn denbha biex tħeġġeġ il-ħruġ ta' borża tal-bajd f'dixx petri ġdid. Irrepeti fuq in-naħa l-oħra u qiegħed il-ħuta lura fit-tank tagħha.

3. Il-bajd jista' jitferrex (biex jifforma monosaff) bl-użu ta' pinzell fin. Importanti li tipprova tesponi kemm-il bajda possibbli għall-isperma u b'hekk jgħin li tiġi massimizzata ż-żona tal-wiċċ tal-uċuħ. Nota importanti: Żomm il-bajd umdu billi tqiegħed biċċa karta niedja madwarhom (importanti li l-bajd ma jmissx mal-ilma direttament peress li dan jista' jwebbes il-korjon b'mod prematur u jipprevjeni l-fertilizzazzjoni). Hemm varjazzjoni kbira fin-numru ta' bajd li kull mara tista' tipproduċi iżda, bħala medja, faċilment għandhom jinkisbu madwar 150 bajda minn mara tqila.

4. 25µl sperma fit-taħlita ta' Hank titferrex b'mod indaqs fuq il-wiċċ sħiħ tal-bajd bl-użu tal-pinzell. Il-bajd malajr jibbies u jibdel il-kulur (fi żmien minuta) ladarba tibda l-fertilizzazzjoni. Jekk in-numru stmat ta' bajd ikun ta' iktar minn 150, irrepeti l-proċedura. B'mod simili, jekk il-bajd ma jibbiesx fi żmien minuta, żid ftit iktar sperma. Nota importanti: Iż-żieda ta' iktar sperma mhux bilfors itejjeb ir-rata ta' fertilizzazzjoni.

5. Il-bajd u s-soluzzjoni tal-isperma għandhom jitħallew 'jinteraġixxu' għal tal-inqas 15-il minuta u l-bajd iffertilizzat għandu jitqiegħed fl-akkwarji ta' espożizzjoni fi żmien siegħa u nofs wara l-fertilizzazzjoni.

6. Il-proċedura tiġi ripetuta bl-użu ta' mara oħra sakemm jinġabar in-numru mixtieq ta' bajd.

7. Ħalli ftit bajd mill-aħħar lott u ffissahom f'10 % aċidu aċetiku.

L-għadd u d-distribuzzjoni tal-bajd fl-akkwarji tat-test

1. Il-bajd għandu jitqassam b'mod indaqs bejn kull livell tat-trattament sabiex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku. Kull lott ta' bajd iffertilizzat għandu jiġi sseparat fi gruppi ndaqs (daqs il-livelli tat-trattament) bl-użu ta' strument bil-ponta (jiġifieri forċipi tal-entomoloġija b'xafra wiesgħa jew l-użu ta' loop ta' inokulazzjoni). Jekk għandek mira ta' 4 irreplikati għal kull trattament, b'20 bajda kull wieħed, f'dak il-każ trid tiddistribwixxi 80 bajda għal kull akkwarju ta' espożizzjoni. Nota importanti: Huwa rakkomandat li jiżdiedu 20 % oħra (jiġifieri 96 bajda għal kull livell tat-trattament) sakemm ma tkunx żgur li ser tikseb rati ta' fertilizzazzjoni ta' 100 %.

2. Il-bajd tal-ispinarell malajr jista' jieħu infezzjoni fungali barra l-bejta mħarsa mill-missier. F'dan ir-rigward, it-trattament tal-bajd kollu bil-metilen blu matul l-ewwel ħamest ijiem tat-test huwa ta' importanza assoluta. Soluzzjoni ewlenija tal-metilen blu titħejja f'1 mg/ml u tiddaħħal fl-akkwarji ta' espożizzjoni sabiex tingħata konċentrazzjoni finali massima ta' 2,125 mg/l. Nota importanti: L-ispinarelli ma għandhomx ikunu esposti għal metilen blu ladarba jfaqqsu u b'hekk is-sistema għandha tkun ħielsa minn metilen blu sal-jum 6.

3. Il-bajd jiġi spezzjonat kuljum u kwalunkwe bajd mejjet jew mhux iffertilizzat irid jiġi rreġistrat bħalatali. Nota importanti: Il-bajd qatt ma għandu jkun barra l-ilma sakemm ifaqqas, lanqas għal perjodi qosra ħafna.

C.42 **BIJODEGRADABILITÀ FL-ILMA BAĦAR**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 306 tal-OECD (1992). Meta ġew żviluppati l-metodi ta' ttestjar oriġinali, ma kienx magħruf kemm ir-riżultati mit-testijiet ta' tgħarbil għal bijodegradabilità lesta bl-użu ta' ilma ħelu, u effluwent tad-drenaġġ jew ħama attivat bħala inokulu, jistgħu jiġu applikati għall-ambjent marittimu. Fuq dan il-punt ġew irrapportati riżultati li jvarjaw (eż. (1)).

2. Ħafna ilmijiet industrijali mormijin, li fihom firxa ta' sustanzi kimiċi, jilħqu l-baħar jew permezz ta' skariku dirett jew permezz ta' estwarji u xmajjar li fihom iż-żminijiet ta' residenza huma baxxi meta mqabblin mal-perjodu meħtieġ għal bijodegradazzjoni shiħa ta' ħafna mis-sustanzi kimiċi preżenti. Minħabba l-għarfien dejjem ikbar tal-bżonn li jiġi protett l-ambjent marittimu kontra volumi dejjem ikbar ta' sustanzi kimiċi u l-ħtieġa li tiġi stmata l-konċentrazzjoni probabbli tas-sustanzi kimiċi fil-baħar, ġew żviluppati metodi ta' ttestjar għall-bijodegradabilità fl-ilma baħar.

3. Il-metodi deskritti hawnhekk jużaw ilma bħala naturali kemm bħala l-fażi milwiema kif ukoll bħala s-sors tal-mikroorganiżmi. Sabiex tinżamm konformità mal-metodi għal bijodegradabilità lesta fl-ilma ħelu, ġie investigat l-użu ta' ilma baħar ultraffiltrat u ċċentrifugat, u hekk ukoll ġie investigat l-użu ta' naqal marittimu bħala inokulu. Dawn l-investigazzjonijiet ma rnexxewx. Għaldaqstant, il-midjum tat-test huwa ilma baħar naturali ttrattat minn qabel sabiex jitneħħew partikoli mhux maħdumin.

4. Sabiex tiġi vvalutata l-bijodegradabilità finali bil-Metodu Flask Mheżżeż, iridu jintużaw konċentrazzjonijiet relattivament għoljin tas-sustanza tat-test minħabba s-sensittività baxxa tal-metodu analitiku tal-karbonju organiku dissolt (DOC). Min-naħa tiegħu, dan jeħtieġ li mal-ilma baħar jiżdiedu nutrijenti minerali (N u P), li l-konċentrazzjonijiet baxxi tagħhom ikunu qed jillimitaw it-tneħħija tad-DOC. Jista' jkun hemm bżonn li jiżdiedu wkoll in-nutrijenti fil-Metodu Flixkun Magħluq minħabba l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test miżjuda.

5. B'hekk, il-metodi mhumiex ittestjati għal bijodegradabilità lesta peress li ma jiżdied ebda inokulu mal-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. It-testijiet lanqas ma jissimulaw l-ambjent marittimu peress li jiżdiedu n-nutrijenti u l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test hija ferm ogħla minn dik li tkun preżenti fil-baħar. Għal dawn ir-raġunijiet, il-metodi huma proposti taħt subsezzjoni ġdida 'Bijodegradabilità fl-Ilma Baħar'.

APPLIKAZZJONI

6. Ir-riżultati tat-testijiet, li jiġu applikati għaliex il-mudell ta' użu u rimi tas-sustanza inkwistjoni indika rotta lejn il-baħar, taw l-ewwel impressjoni ta' bijodegradabilità fl-ilma baħar. Jekk ir-riżultat ikun pożittiv (tneħħija ta' > 70 % DOC; > 60 % ThOD — domanda teorika ta' ossiġenu), jista' jiġi konkluż li hemm potenzjal għal bijodegradazzjoni fl-ambjent marittimu. Madankollu, riżultat negattiv ma jipprekludix potenzjal bħal dan iżda jindika li hemm bżonn isiru iktar studji, pereżempju, bl-użu tal-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test possibbli.

7. Fi kwalunkwe każ, jekk hemm bżonn ta' valur iktar definittiv għar-rata jew il-grad ta' bijodegradazzjoni fl-ilma baħar f'sit partikolari, ikollhom jiġu applikati metodi oħrajn li huma iktar kumplessi u sofistikati, u b'hekk li jiswew iktar flus. Pereżempju, test ta' simulazzjoni jista' jiġi applikat bl-użu ta' konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li tkun eqreb il-konċentrazzjoni ambjentali probabbli. Barra minn hekk, jista' jintuża ilma baħar mhux iffortifikat u mhux ittrattat minn qabel meħud mill-post ta' interess u l-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi segwita b'analiżi kimika speċifika. Għall-bijodegradabilità finali, ikunu meħtieġa sustanzi ttikkettati-^{14}C sabiex ikunu jistgħu jitkejlu r-rati tal-għibien tal-^{14}C organiċi solubbli u l-produzzjoni tal-$^{14}CO_2$ f'konċentrazzjonijiet ambjentalment realistiċi.

GĦAŻLA TAL-METODI

8. L-għażla ta' liema metodu għandu jintuża tiddependi minn għadd ta' fatturi; tingħata t-Tabella li ġejja biex tgħin fl-għażla. Filwaqt li s-sustanzi tas-solubilità tal-ilma inqas mill-ekwivalenti ta' madwar 5 mg C/l ma jistgħux jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flask Mheżżeż, tal-inqas, fil-prinċipju, sustanzi ftit li xejn solubbli jistgħu jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flixkun Magħluq.

Tabella

Vantaġġi u żvantaġġi tat-test tal-flask mheżżeż u l-flixkun magħluq

METODU	VANTAĠĠI	ŻVANTAĠĠI
FLASK MHEŻŻEŻ	— apparat sempliċi ħlief analizzatur tal-K — durata ta' 60 jum mhix problema — ebda xkiel min-nitrifikazzjoni — jista' jiġi adattat għal sustanzi volatili	— jeħtieġ analizzatur tal-K — juża 5-40 mg DOC/1, jista' jkun ta' xkiel — stabbiliment tad-DOC diffiċli f'konċentrazzjonijiet baxxi f'ilma baħar (effett tal-klorur) — kultant DOC għoli f'ilma baħar
FLIXKUN MAGĦLUQ	— apparat sempliċi — stabbiliment bi tmiem sempliċi — juża konċentrazzjoni baxxa tas-sustanza tat-test (2 mg/l) u b'hekk hemm inqas possibbiltà ta' varjazzjoni — faċilment adattat għal sustanzi volatili	— jaf ikun diffiċli biex tinżamm l-għeluq tal-arja tal-fliexken — it-tkabbir mal-ħitan ta' batterji jista' jwassal għal valuri foloz — il-valuri inbjank ta' teħid tal-O_2 jistgħu jkunu għoljin speċjalment wara 28 jum; jista' jiġi evitat aktar ma jiqdiem l-ilma baħar — xkiel possibbli mit-teħid ta' O_2 bin-nitrifikazzjoni

METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test ta' Tgħarbil Immodifikat tal-OECD deskritt fil-Kapitolu C.4B ta' dan l-Anness (2). Ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut tad-Danimarka għall-Kwalità tal-Ilma (3).

2. Bl-istess mod bħall-Metodu marittimu tal-Flixkun Magħluq li jakkumpanjah, ir-riżultati minn dan it-test ma għandhomx jittieħdu bħala indikaturi ta' bijodegradabilità lesta, iżda jridu jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test huwa dissolt fil-midjum tat-test biex tinħareġ konċentrazzjoni ta' 5-40 mg karbonju organiku dissolt (DOC)/l. Jekk il-limiti tas-sensittività tal-analiżijiet tal-karbonju organiku jitjiebu, l-użu ta' konċentrazzjonijiet inqas tas-sustanza tat-test jista' jkun ta' vantaġġ, b'mod partikolari għal sustanzi inibitorji. Is-soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tat-test tiġi inkubata waqt tħawwid fid-dlam jew f'dawl bati f'kundizzjonijiet aerobiċi b'temperatura fissa (ikkontrollata għal ± 2°C) li normalment tkun fi ħdan il-medda ta' 15-20°C. F'każijiet li fihom l-objettiv tal-istudju jkun li jiġu ssimulati sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jsiru testijiet lil hinn minn din il-medda normali tat-temperatura. Id-durata massima rrakkomandata hija ta' madwar 60 jum. Id-degradazzjoni hija segwita minn kejliet tad-DOC (degradazzjoni finali) u, f'xi każijiet, minn analiżi speċifika (degradazzjoni primarja).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

4. Sabiex isir magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uħud mill-karatteristiċi tiegħu. Il-kontenut ta' karbonju organiku tas-sustanza jrid jiġi stabbilit, il-volatilità tagħha trid tkun tali li ma jseħħx telf sinifikanti matul it-test u s-solubilità tagħha fl-ilma trid tkun ikbar mill-ekwivalenti ta' 25-40 mg C/l. Barra minn hekk, il-materjal tat-test ma għandux jaqbad b'mod sinifikanti ma' uċuħ tal-ħġieġ. Hemm bżonn ta' informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relevanti ta' komponenti kbar tal-materjal tat-test sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati, speċjalment meta r-riżultat ikun qrib il-livell ta' 'suċċess'.

5. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għall-batterji, pereżempju kif imkejla fit-testijiet tar-rata ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4), tista' tkun siewja meta jingħażlu l-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri ta' bijodegradazzjoni baxxi. Madankollu, it-tali informazzjoni mhux dejjem tkun biżżejjed sabiex jiġu interpretati riżultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 18 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

6. Iridu jintużaw sustanzi xierqa ta' referenza sabiex tiġi kkontrollata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Benżoat tas-sodju, aċetat tas-sodju u anilina huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw għal dan il-għan. Is-sustanzi ta' referenza jridu jiġu degradati fi ħdan perjodu ta' żmien raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jiġi ripetut bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.

7. Fir-ringtest tal-KE li fih ittieħdu kampjuni ta' ilma baħar f'postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena (3), il-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), ħlief il-fażi ta' dewmien, kienu ta' bejn jum u 4 ijiem u bejn jum u 7 rispettivament għall-benżoat tas-sodju. Għal anilina, t_L varjat bejn 0 sa 10 ijiem, filwaqt li t_{50} varjat bejn jum u 10.

RIPRODUĊIBILITÀ U SENSITTIVITÀ TAL-METODU

8. Ir-riproduċibilità tal-metodu ġiet stabbilita fir-ringtest (3). L-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, li għaliha dan il-metodu jista' jintuża b'analiżi tad-DOC, hija fil-parti l-kbira ddeterminata mil-limitu ta' identifikazzjoni tal-analiżi tal-karbonju organiku (madwar 0,5 mg C/l bħalissa) u l-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku dissolt fl-ilma baħar użat (normalment fl-ordni ta' 3-5 mg/l għal ilma mill-baħar internazzjonali). Il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC ma għandhiex taqbeż madwar 20 % tal-konċentrazzjoni totali tad-DOC wara li tiddaħħal is-sustanza tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC kultant tkun tista' titnaqqas iktar ma jiqdiem l-ilma baħar qabel l-ittestjar. Jekk il-metodu jintuża b'analiżi kimika speċifika biss (li biha titkejjel id-degradazzjoni primarja), l-investigatur irid jiddokumenta, billi jforni informazzjoni addizzjonali, jekk tistax tkun mistennija degradabilità finali. Din l-informazzjoni addizzjonali tista' tikkonsisti fir-riżultati minn testijiet oħrajn għal bijodegradabilità lesta jew inerenti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

9. Apparat normali tal-laboratorju u

a. Magna xejker li tiflaħ flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri, jew b'kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata f'kambra b'temperatura kostanti ta' 15-20 °C ikkontrollata għal ± 2 °C;

b. Flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri b'għonq irqiq

c. Apparat għall-filtrazzjoni tal-membrana, jew ċentrifugu;

d. Filtri tal-membrana, 0,2-0,45µm;

e. Analizzatur tal-karbonju;

f. Tagħmir għal analiżi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

10. Ħu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur imnaddaf sew u ħudu fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew jumejn mit-teħid. Matul it-trasport, tħallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li għandha tintuża fit-test. Identifika l-post tal-kampjunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tniġġis u n-nutrijenti tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi l-għadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.

11. Ipprovdi l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:

— id-data tat-teħid;

— il-fond tat-teħid;

— id-dehra tal-kampjun — imċajpar, eċċ.;

— it-temperatura f'ħin it-teħid;

— is-salinità;

— id-DOC;

— id-dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test.

12. Jekk il-kontenut tad-DOC tal-kampjun ta' ilma baħar jinstab li huwa għoli (paragrafu 8), huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jithalla jiqdiem b'ġimgħa qabel jintuża. Ħallih jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperaturi tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, żomm il-kundizzjonijiet aerobiċi permezz ta' għoti tal-arja ħafifa. Meta jkun qed jiqdiem, jonqos il-kontenut tal-materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabet ebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjuni ta' ilma baħar li qdiemu u dawk miġburin friski. Qabel jintuża, ittratta l-ilma baħar minn qabel biex tneħħi partikoli mhux maħdumin, eż. b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tan-najlon jew karta filtru ħarxa (mhux membrana jew filtri GF-C), jew b'sedimentazzjoni u dikantar. Trid tiġi rrapportata l-proċedura użata. Il-pretrattament agħmlu wara li jiqdiem, jekk jintuża.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

13. Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin, billi tuża reaġenti ta' grad analitiku:

(a)	Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Klorid tal-ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(b)	Klorur tal-kalċju, $CaCl_2$	27,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(c)	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(d)	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	

Preċipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkonċentrat jew 0,4 g etilenedjami-netetra-aċidu aċetiku (EDTA, melħ disodju) għal kull litru. Jekk jifforma preċipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula ġdida.

Preparazzjoni tal-midjum tat-test

14. Żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq għal kull litru ilma baħar pretrattat.

Inokulu

15. Iżżidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Sib (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jifformaw kolonji fil-midjum tat-test tal-ilma baħar (u idealment anki fil-kampjuni oriġinali tal-ilma baħar) eż. bl-għadd tal-platti, bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun partikolarment utli għal kampjuni minn siti kostali jew imniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofika fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

Preparazzjoni tal-flasks

16. Ara li l-oġġetti kollha tal-ħġieġ huma nodfa tazza, mhux bilfors sterelizzati, (eż. bl-użu ta' aċidu idrokloriku alkoħoliku), imlaħalħin u mnixxfin qabel tużahom sabiex tevita kontaminazzjoni mar-residwi minn testijiet li saru qabel. Il-flasks iridu jitnaddfu anki qabel jintużaw għall-ewwel darba.

17. Evalwa s-sustanzi tat-test fi flasks tad-duplikati fl-istess ħin, flimkien ma' flask wieħed għas-sustanza ta' referenza. Agħmel test inbjank, f'duplikat, mingħajr sustanza tat-test u lanqas dik ta' referenza sabiex tistabbilixxi l-inbjanki analitiċi. Dissolvi s-sustanzi tat-test fil-midjum tat-test — jistgħu jiddaħħlu b'mod konvenjenti permezz ta' soluzzjoni ewlenija kkonċentrata — biex jingħataw il-konċentrazzjonijiet ta' bidu mixtieqa li normalment ikunu ta' 5-40 mg DOC/l. Ittestja s-sustanza ta' referenza b'mod normali f'konċentrazzjoni tal-bidu li tikkorrispondi għal 20 mg DOC/l. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanza tat-test u/jew sustanza ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.

18. Jekk jistgħu jkunu mistennijin effetti tossiċi jew jekk dawn ma jkunux jistgħu jiġu eliminati b'ċertezza, jista' jkun aħjar li fid-disinn tat-test jiġi inkluż esperiment ta' inibizzjoni f'duplikat ukoll. Daħħal is-sustanzi tat-test u ta' referenza fl-istess reċipjent, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' referenza li normalment tkun daqs fit-test tal-kontroll (jiġifieri 20 mg DOC/l) sabiex tkun tista' tagħmel paragun.

19. Qassam ammonti adegwati tas-soluzzjonijiet tat-test fil-flasks Erlenmeyer (sa madwar nofs il-volum tal-flask huwa ammont konvenjenti) u mbagħad għatti kull flask b'għatu laxk (eż. fojl tal-aluminju) li jippermetti li jiġi skambjat gass bejn il-flask u l-arja tal-madwar. (Tappijiet magħmulin mit-tajjar mhumiex tajbin jekk tintuża analiżi tad-DOC). Qiegħed ir-reċipjenti fuq ix-xejker u heżżeż kontinwament bil-galbu (eż. 100 rpm) tul it-test kollu. Ikkontrolla t-temperatura (15-20°C u fi ħdan ± 2°C), u ipproteġi r-reċipjenti mid-dawl sabiex tevita milli jikbru algi. Ara li l-arja hija ħielsa minn materjali tossiċi.

Test fiżikokimiku tal-kontroll (mhux obbligatorju)

20. Jekk hemm suspett ta' degradazzjoni abijotika jew mekkaniżmi ta' telf, bħal idroliżi (problema b'analiżi speċifika biss), volatilizzazzjoni jew assorbiment, huwa rakkomandat li tagħmel esperiment fiżikokimiku tal-kontroll. Dan jista' jsir billi jiddaħħal klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) [1] (50-100 mg/l) f'reċipjenti bis-sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis kbir fid-DOC jew konċentrazzjoni speċifika tas-substrat fit-test tal-kontroll fiżikokimiku jindika mekkaniżmi ta' tneħħija abijotiċi. (Jekk jintuża klorur tal-merkurju, għandha tingħata attenzjoni għal interferenzi jew pożizzjonar katalistiku fl-analiżi tad-DOC.)

Numru ta' flasks

21. F'sensiela tipika ta' testijiet, jintużaw il-flasks li ġejjin:

Flasks 1 u 2	li fihom is-sustanza tat-test (sospensjoni tat-test);
Flasks 3 u 4	li fihom ilma baħar biss (inkbjank);
Flask 5	li fihom is-sustanza ta' referenza (kontroll tal-proċedura);
Flask 6	li fih is-sustanza tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità) — mhux obbligatorju;
Flask 7	li fih is-sustanza tat-test u l-aġent sterelizzanti (kontroll sterili abijotiku)-mhux obbligatorju.

Analiżi tad-DOC

22. Matul it-test, ħu kampjuni kull ċertu perjodu xieraq għal analiżi tad-DOC (Appendiċi 1). Dejjem għandek tieħu kampjuni fil-bidu tat-test (jum 0) u fil-jum 60. Tal-inqas hemm bżonn ta' ħames kampjuni b'kollox sabiex jiddeskrivu l-medda ta' żmien tad-degradazzjoni. Ma tista' tiġi stabbilita ebda skeda ta' żmien fissa peress li r-rata ta' bijodegradazzjoni tvarja. Iddetermina d-DOC f'duplikat f'kull kampjun.

[1] Klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawzjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema fis-sistema tal-ilma mormi.

Kampjunar

23. Il-volum meħtieġ tal-kampjuni jiddependi mill-metodu analitiku (analiżi speċifika), mill-analizzatur tal-karbonju użat, u mill-proċedura (filtrazzjoni tal-membrana jew ċentrifugazzjoni) magħżulin għat-trattament tal-kampjun qabel ma jiġi stabbilit il-karbonju (paragrafi 25 u 26). Qabel il-kampjunar, ara li l-midjum tat-test ikun imħallat sew u li kwalunkwe materjal imqabbad ma' ġewwa tal-flask jinħall jew jiġi sospiż.

24. Iffiltra bil-membrana jew iċċentrifuga minnufih wara l-kampjunar. Jekk ikun hemm bżonn, aħżen il-kampjuni ffiltrati jew iċċentrifugati f'2-4 °C sa 48 siegħa jew inqas -18 °C għal perjodi itwal (jekk ikun magħruf li s-sustanza mhux ser tiġi affettwata, aċidifikaha sa pH 2 qabel taħżinha).

25. Il-filtri tal-membrana (0,2-0,45 μm) huma xierqa jekk ikun żgurat li la jeħilsu karbonju u lanqas ma jassorbu s-sustanza fl-istadju tal-filtrazzjoni, eż. filtri tal-membrana tal-polikarbonat. Ċerti filtri tal-membrana huma mxappin b'aġenti tensjoattivi għal idrofilizzazzjoni u jistgħu jeħilsu kwantitajiet konsiderevoli ta' karbonju dissolt. Ħejji t-tali filtri billi tgħallihom f'ilma dejonizzat għal tliet perjodi ta' siegħa konsekuttivi. Wara li tgħallihom, aħżen il-filtri f'ilma dejonizzat. Armi l-ewwel 20 ml tal-filtrat.

26. Minflok filtrazzjoni tal-membrana tista' tingħażel ċentrifugazzjoni tal-kampjuni. Iċċentrifuga f'40 000 m.s^{-2} (~ 4 000 g) għal 15-il minuta, idealment f'ċentrifigu mkessaħ.

Nota: Donnha ma taħdimx id-differenzazzjoni tal-Karbonju Organiku Totali (TOC) mid-DOC (TOC/DOC) b'ċentrifugrazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxi ħafna, peress li jew jitneħħewx il-batterji kollha, jew jerġa' jiġi dissolt il-karbonju bħala parti mill-plażma batterjali. F'konċentrazzjonijiet ogħla ((> 10 mg C għal kull litri), l-iżball ta' ċentrifugrazzjoni donnu paragunabbilment żgħir.

Frekwenza tal-kampjunar

27. Jekk isiru analiżijiet eżatt wara l-kampjunar, ivvaluta ż-żmien biex isir il-kampjunar li jmiss billi tqis ir-riżultat tad-determinazzjoni analitika.

28. Jekk il-kampjuni jinżammu (paragrafu 24) sabiex jiġu analizzati iktar tard, ħu iktar kampjuni min-numru minimu meħtieġ ta' ħamsa. L-ewwel analizza l-aħħar kampjuni, u permezz ta' għażla 'b'lura' skont l-istadji tal-kampjuni xierqa għal analiżi, huwa possibbli li tikseb deskrizzjoni tajba tal-kurva ta' bijodegradazzjoni b'numru relattivament żgħir ta' determinazzjonijiet analitiċi. Jekk ma tkun seħħet ebda degradazzjoni sa tmiem it-test, ma jkun hemm bżonn li jiġi analizzat ebda kampjun ieħor, u f'din is-sitwazzjoni, l-istrateġija 'b'lura' tista' tiffranka spejjeż konsiderevoli tal-analiżi.

29. Jekk jiġi osservat plateau fuq il-kurva ta' degradazzjoni qabel il-jum 60, temm it-test. Jekk ovvjament id-degradazzjoni bdiet sal-jum 60, iżda għadha ma laħqitx plateau, tawwal l-esperiment għal perjodu itwal.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

30. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskeda tad-dejta mehmuża (Appendiċi 2), u kkalkola l-valuri tad-degradazzjoni kemm għas-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza mill-ekwazzjoni:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

fejn:

D_t degradazzjoni f'DOC perċentwali jew tneħħija tas-sustanza speċifika fiż-żmien t,

C_o bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test,

C_t konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test fiż-żmien t,

$C_{bl(0)}$ bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank,

$C_{bl(t)}$ konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank fiż-żmien t.

31. Iddikjara d-degradazzjoni bħala t-tneħħija tad-DOC perċentwal (degradazzjoni finali) jew tneħħija tas-sustanza speċifika (degradazzjoni primarja) fiż-żmien t. Ikkalkola l-konċentrazzjonijiet tad-DOC sal-eqreb 0,1 mg għal kull litru, u qarreb il-medji tal-valuri D_t sal-eqreb perċentwal sħiħ.

32. Uri kif mexiet id-degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma kif muri fil-figura f'‘Validità u interpretazzjoni tar-riżultati’. Jekk hemm dejta suffiċjenti, ikkalkola mill-kurva l-fażi tad-dewmien (t_L) u ż-żmien sabiex tintlaħaq tneħħija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-fażi ta' dewmien (t_{50}).

Rapport tat-test

33. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-post u d-deskrizzjoni tas-sit ta' kampjunar; status ta' tniġġis u tan-nutrijenti (għadd tal-kolonja, nitrat, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);

— il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), id-dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test;

— il-metodu użat (jekk jintuża wieħed) sabiex jiqdiem il-baħar;

— il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC;

— il-metodu użat għall-analiżi speċifika (mhux obbligatorju);

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tan-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu tal-għadd tal-pjastrini jew proċedura oħra) (mhux obbligatorju);

— metodi oħrajn (mhux obbligatorji) użati biex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejliet tal-ATP, eċċ.).

Riżultati:

— dejta analitika rrapportata fuq skeda tad-dejta (Appendiċi 2);

— kif mexa t-test tad-degradazzjoni huwa rrappreżentat fuq grafika f'dijagramma li turi l-fażi ta' dewmien (t_L), inklinazzjoni grafika, u żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura fis-sezzjoni ‘Validità u interpretazzjoni tar-riżultati’ jew għal konvenjenza jista' jintuża ż-żmien meħtieġ għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;

— id-degradazzjoni f'perċentwali mkejla wara 60 jum, jew fi tmiem it-test.

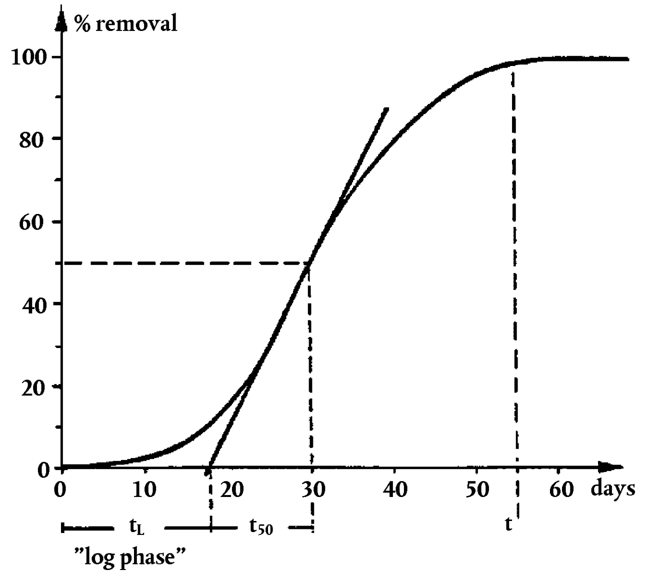
Diskussjoni tar-riżultati.

Validità u interpretazzjoni tar-riżultati

34. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza eż. benżoat tas-sodju, aċetat tas-sodju jew anilina, għandhom ikunu paragunabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (irreferi għas-sezzjoni dwar is-‘Sustanzi ta' referenza’, paragrafu 7). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza ma jkunux tipiċi, it-test għandu jerġa' jsir bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar. Għad li r-riżultati tat-testijiet ta' inibizzjoni mhux dejjem ikun faċli tinterpretahom minħabba l-kontribuzzjoni tad-DOC mis-sustanza tat-test, tnaqqis kbir fir-rata ta' tneħħija tad-DOC totali, meta mqabbla ma' dik tal-kontroll, huwa sinjal pożittiv ta' effetti tossiċi.

35. Minħabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin użati meta mqabblin ma' ħafna sistemi naturali (u konsegwentement proporzjon mhux favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u sorsi oħrajn tal-karbonju), il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża biex jindika jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment ta' degradazzjoni teoriku li juri mod fattibbli ta' kif jistgħu jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-'fażi ta' dewmien') u t_{50} (intervall taż-żmien, li jibda f't_L), meħtieġ sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija, huwa mogħti fil-figura ta' hawn taħt.



METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test tal-Flixkun Magħluq (5) u ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut Daniż għall-Kwalità tal-Ilma (3).

2. B'mod simili għall-Metodu tal-Flask Mheżżeż, ir-riżultati ta' dan it-test ma għandhomx jitqiesu bħala indikazzjonijiet ta' bijodegradabilità pronta, iżda għandhom jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test jiġi dissolt fil-midjum tat-test f'konċentrazzjoni ta', normalment, 2-10 mg tas-sustanza tat-test għal kull litru (tista' tintuża konċentrazzjoni waħda jew iktar). Is-soluzzjoni tinżamm fi flixkin magħluq fid-dlam f'banju ta' temperatura kostanti jew f'post magħluq ikkontrollat sa ± 1 °C fi ħdan medda ta' 15-20 °C. F'dawk il-każijiet li fihom l-objettiv tal-istudju huwa li jissimula sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jitwettqu testijiet lil hinn minn din il-medda ta' temperatura normali diment li jsiru aġġustamenti xierqa għall-kontroll tat-temperatura. Id-degradazzjoni hija segwita minn analiżijiet tal-ossiġenu tul perjodu ta' 28 jum.

4. Ir-ringtest wera li jekk it-test ġie estiż lil hinn minn 28 jum, ma tista' tinġabar ebda informazzjoni siewja f'ħafna każijiet, minħabba xkiel serju. Il-valuri inbjank tad-domanda bijoloġika ta' ossiġenu (BOD) kienu għoljin wisq, aktarx minħabba tkabbir man-naħa ta' ġewwa tal-flask, ikkaġunat minn nuqqas ta' tħawwid, u nitrifikazzjoni. B'hekk, id-durata rrakkomandata hija ta' 28 jum, iżda jekk il-valur inbjank tal-BOD jibqa' fi ħdan il-limitu ta' 30 fil-mija (paragrafi 15 u 40), it-test jista' jittawwal.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

5. Sabiex ikun magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uħud mill-karatteristiċi tagħha. Il-formula empirika hija meħtieġa sabiex tkun tista' tiġi kkalkolata d-domanda teorika ta' ossiġenu (ThOD) (ara l-Appendiċi 3); inkella, tkun trid tiġi stabbilita d-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) tas-sustanza sabiex isservi bħala l-valur referenzjarju. L-użu tas-COD huwa inqas sodisfaċenti peress li ċerti sustanzi mhumiex kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

6. Is-solubilità tas-sustanza għandha tkun tal-inqas ta' 2 mg/l, għad li fil-prinċipju jistgħu jiġu ttestjati sustanzi inqas solubbli (eż. bl-użu ta' ultrasonifikazzjoni) u hekk ukoll sustanzi volatili. Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi tal-komponenti l-kbar tas-sustanza tat-test hija meħtieġa sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati miksubin, speċjalment meta r-riżultat ikun qrib il-livell ta' 'suċċess'.

7. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza għall-batterji, eż. kif imkejla fit-testijiet ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4) tista' tkun ferm siewja meta jingħażlu konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni. Madankollu, it-tali informazzjoni mhijiex dejjem biżżejjed sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 27 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

8. Iridu jintużaw sustanzi ta' referenza adattati sabiex tiġi vverifikata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Għal dan il-għan jistgħu jintużaw anilina, aċetat tas-sodju jew benżoat tas-sodju (pereżempju). Trid isseħħ degradazzjoni ta' dawn is-sustanzi ta' tal-inqas 60 fil-mija (tat-ThOD tagħhom) fi ħdan perjodu raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jerġa' jsir billi jintuża kampjun ieħor tal-ilma baħar.

9. Fir-ringtest tal-KE, li fih il-kampjuni ta' ilma baħar ittieħdu minn postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena, il-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), eskluża l-fażi tad-dewmien, kienu ta' 0 sa jumejn u jum sa 4 rispettivament għall-benżoat tas-sodju. Għall-anilina, il-valuri ta' t_L u t_{50} kienu ta' 0 sa 7 u jumejn sa 12-il jum rispettivament.

RIPRODUĊIBILITÀ

10. Ir-riproduċibilità tal-metodi ġiet stabbilita fir-ringtest tal-KE (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u:

(a) jistgħu jintużaw fliexken tal-BOD tal-250-300 ml b'tappijiet tal-ħġieġ jew flixkun b'għonq dejjaq tal-250 ml b'tappijiet tal-ħġieġ;

(b) Bosta fliexken taż-2, it-3 u l-4 litri b'marki tal-litri għat-tħejjija tal-esperiment u għall-mili tal-fliexken tal-BOD;

(c) Banjumarija jew kamra b'temperatura kostanti għaż-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 °C) bl-esklużjoni tad-dawl.

(d) Tagħmir għall-analiżi tal-ossiġenu dissolt;

(e) Filtri tal-membrana, 0,2-0,45 μm (mhux obbligatorji);

(f) Tagħmir għal analiżi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

12. Ħu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur maħsul sew u ħudu fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew tnejn mit-teħid. Matul it-trasportar, thallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li ser tintuża fit-test.

13. Identifika l-post tal-kampunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tniġġis u nutrizzjonali tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta jew imniġġsin, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi għadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.

14. Ipprovdi l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:

— id-data tat-teħid;

— il-fond tat-teħid;

— id-dehra tal-kampjun — imċajpar eċċ.;

— it-temperatura fil-ħin tat-teħid;

— is-salinità;

— il-karbonju organiku dissolt (DOC);

— id-dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test.

15. Jekk jinstab li l-kontenut tad-DOC tal-kampjun huwa għoli jew jekk huwa maħsub li l-BOD inbjank wara 28 jum għandha tkun iktar minn 30 fil-mija ta' dik tas-sustanzi ta' referenza, huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jitħalla jiqdiem għal madwar ġimgħa qabel jintuża.

16. Ħalli l-kampjun jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperatura tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, żomm il-kundizzjonijiet aerobiċi billi tagħtih ftit arja. Meta jkun qed jiqdiem, jonqos il-kontenut ta' materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabet ebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjun ta' ilma baħar li tħalla jiqdiem u dak ta' ilma baħar miġbur frisk.

17. Qabel tużah, ittratta l-ilma baħar minn qabel sabiex tneħħi l-partikoli ħorox, eż. permezz ta' filtrazzjoni minn filtru tan-najlon jew karta filtru ħarxa (mhux filtri tal-GF-C jew membrana), jew permezz ta' sedimentazzjoni u dekantar. Irrapporta l-proċedura użata. Ittrattah minn qabel wara li jiqdiem, jekk jintuża.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

18. Ħejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin bl-użu ta' reaġenti tal-grad analitiku:

(a)	Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Klorid tal-ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	
(b)	Klorur tal-kalċju, $CaCl_2$	27,50 g
	Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.	

(c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

(d) Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Ħoll u tella' sa litru b'ilma distillat.

Preċipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkonċentrat jew 0,4 g etilenedjaminetetra-aċidu aċetiku (EDTA, melħ disodju) għal kull litru. Jekk jifforma preċipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula ġdida.

Tħejjija tal-midjum tat-test

19. Għal kull litru ilma baħar pretrattat, żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq. Issatura l-midjum tat-test b'arja fit-temperatura tat-test billi tagħtih l-arja b'arja kkompressata nadifa għal madwar 20 minuta. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għal skopijiet ta' kontroll. Il-konċentrazzjoni saturata ta' ossiġenu dissolt bħala funzjoni tas-salinità u t-temperatura tista' tinqara min-nomogramma inkorporata ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 4).

Inokulu

20. Iżżidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganiżmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Iddetermina (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jifformaw kolonja fil-midjum tat-test ta' ilma baħar (u idealment anki fil-kampjun ta' ilma baħar oriġinali), eż. bl-għadd tal-pjastrini bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun ideali b'mod partikolari għal kampjuni minn siti kostali jew imniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofika fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

Tħejjija tal-fliexken tat-test

21. Agħmel il-manipolazzjonijiet meħtieġa kollha inkluż li tħalli l-ilma baħar jiqdiem u tittrattah minn qabel fit-temperatura magħżula tat-test ta' bejn 15 u 20 °C, filwaqt li tiżgura li jkun hemm indafa, iżda mhux sterilità tal-oġġetti kollha tal-ħġieġ.

22. Ħejji l-gruppi ta' fliexken tal-BOD sabiex issib il-BOD tat-test u s-sustanzi ta' referenza f'sensiela sperimentali simultanja. Agħmel l-analiżijiet kollha fuq fliexken ta' duplikati (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), jiġifieri ħejji żewġ fliexken għal kull determinazzjoni. Agħmel analiżijiet tal-inqas fil-jiem 0, 5, 15 u 28 (erba' determinazzjonijiet). Għal analiżijiet tal-ossiġenu, erba' determinazzjonijiet jeħtieġu total ta' 3 x 2 x 4 = 24 flixkun (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), u b'hekk madwar 8 litri tal-midjum tat-test (għal konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test).

23. Ħejji soluzzjonijiet separati tas-sustanzi tat-test u ta' referenza fi fliexken kbar ta' volum suffiċjenti (paragrafu 11) billi l-ewwel iżżid is-sustanzi tat-test u ta' referenza jew direttament jew billi tuża soluzzjoni ewlenija kkonċentrata fil-fliexken il-kbar mimlijin f'parti minnhom. Żid midjum tat-test ieħor sabiex tagħti l-konċentrazzjonijiet finali mixtieqa. Jekk jintużaw is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanzi tat-test u/jew ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.

24. Agħżel konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u ta' referenza billi tieħu f'kunsiderazzjoni:

(a) is-solubilità tal-ossiġenu dissolt fl-ilma baħar fit-temperatura u s-salinità prevalenti tat-test (ara n-nomogramma inkorporata — Appendiċi 4);

(b) il-BOD inbjank tal-ilma baħar; u

(c) il-bijodegradabilità mistennija tas-sustanza tat-test.

25. Fi 15 °C u 20 °C u salinità ta' 32 parti għal kull elf (ilma tal-oċean), is-solubilità tal-ossiġenu dissolt hija ta' madwar 8,1 u 7,4 mg/l rispettivament. Il-konsum tal-ossiġenu tal-ilma baħar stess (respirazzjoni inbjank) jista' jkun ta' 2 mg O_2/l jew iktar, jekk l-ilma baħar ma jitħalliex jiqdiem. Għaldaqstant, sabiex tiżgura li jkun fadal konċentrazzjoni sinifikanti ta' ossiġenu wara l-ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, uża konċentrazzjoni tal-bidu tas-sustanza tat-test ta' madwar 2-3 mg/l (skont it-ThOD) għas-sustanzi li huma mistennijin jiġu degradati bis-sħiħ fil-kundizzjonijiet tat-test (bħal sustanzi ta' referenza). Ittestja sustanzi inqas degradabbli f'konċentrazzjonijiet ogħla, sa madwar 10 mg/l, diment li ma jseħħux effetti tossiċi. Jista' jkun ta' vantaġġ li jsiru testijiet paralleli b'konċentrazzjoni baxxa (madwar 2 mg/l) u għolja (madwar 10 mg/l) tas-sustanza tat-test.

26. Irid jiġi stabbilit inbjank tal-ossiġenu b'mod parallel fi fliexken li la fih sustanza tat-test u lanqas ta' referenza.

27. Jekk iridu jiġu stabbiliti effetti inibitorji, ħejji s-sensiela li ġejja ta' soluzzjonijiet fi fliexken kbar separati (paragrafu 13):

(a) 2 mg għal kull litru ta' sustanza faċilment degradabbli, eż. kwalunkwe waħda mis-sustanzi ta' referenza msemmijin;

(b) x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test (normalment x huwa 2);

(c) 2 mg għal kull litru tas-sustanza faċilment degradabbli flimkien ma' x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test.

Test tal-kontroll fiżikokimiku (mhux obbligatorju)

28. Jekk tintuża l-possibbiltà li jintużaw analiżijiet speċifiċi, jista' jsir esperiment fiżikokimiku sabiex jiġi vverifikat jekk is-sustanza tat-test titneħħa permezz ta' mekkaniżmi abijotiċi, bħal idroliżi jew assorbiment. Test tal-kontroll fiżikokimiku jista' jsir billi jiżdied klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) fi flasks ta' duplikati b'sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis sinifikanti fil-konċentrazzjoni tas-sustanza speċifika matul it-test jindika mekkaniżmi ta' tneħħija abijotiċi.

Numru ta' fliexken tal-BOD f'testijiet tipiċi

29. F'testijiet tipiċi jintużaw il-fliexken li ġejjin:

— tal-inqas 8 li fihom is-sustanza tat-test;

— tal-inqas 8 li fihom ilma baħar miżjud bin-nutrijenti biss;

— tal-inqas 8 li fihom is-sustanza ta' referenza, u meta jkun hemm bżonn

— 6 fliexken li fihom is-sustanzia tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità).

PROĊEDURA

30. Wara t-tħejjija, battal kull soluzzjoni minnufih, mill-kompartiment inferjuri (mhux mill-qiegħ) tal-flixkun il-kbir xieraq, biex timla l-grupp rispettiv tal-fliexken tal-BOD. Minnufih għandek tanalizza l-kontrolli żero (żmien żero) għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33) jew żommhom għal analiżi kimika iktar tard permezz ta' preċipi-tazzjoni b'$MnCl_2$ (klroru tal-manjeżju (II)) u NaOH (idrossidu tas-sodju).

31. Inkuba l-fliexken paralleli tal-BOD li jifdal fit-temperatura tat-test (15-20 °C), żommhom fid-dlam, u neħħihom miż-żona ta' inkubazzjoni f'intervalli xierqa ta' ħin (eż. tal-inqas wara 5, 15 u 28 jum) u analizzahom għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33).

32. Filtru tal-membrana (0,2-0,45 μm) jew iċċentrifuga, għal 15-il minuta, il-kampjuni għal analiżijiet speċifċi (mhux obbligatorji). Aħżinhom għal 48 siegħa f'2-4 °C, jew għal perjodi itwal fi -18 °C, jekk mhux analizzati minnufih (jekk mhuwiex magħruf li s-sustanza tat-test mhix ser tkun affettwata, aċidifika għal pH 2 qabel ma taħżinhom).

Determinazzjoni tal-ossiġenu dissolt

33. Iddetermina l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt billi tuża metodu kimiku jew elettrokimiku li huwa rikonoxxut f'livell nazzjonali jew internazzjonali.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-Riżultati

34. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskedi ta' dejta mehmużin (Appendiċi 5).

([1]) Klorur tal-merkurju (II) ($HgCl_2$) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawzjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema direttament fis-sistema ta' ilma mormi.

35. Ikkalkola l-BOD bħala d-differenza tat-tnaqqis tal-ossiġenu bejn inbjank u soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet tat-test. Aqsam it-tnaqqis tal-ossiġenu nett bil-konċentrazzjoni (w/v) tas-sustanza sabiex tesprimi l-BOD bħala mg BOD/mg sustanza tat-test. Id-degradazzjoni hija ddefinita bħala l-proporzjon tad-domanda bijokimika ta' ossiġenu, idealment, meta mqabbla mad-domanda teorika ta' ossiġenu (ThOD) jew id-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) u mogħtija bħala perċentwal (ara l-paragrafu 36).

36. Ikkalkola l-valuri ta' bijodegradazzjoni għal kull żmien ta' kampjunar kemm għas-sustanza tat-test u ta' referenza billi tuża waħda mill-ekwazzjonijiet:

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg\ \ tested\ substance}{mg\ ThOD/mg\ \ tested\ substance} \times 100$$

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg\ \ tested\ substance}{mg\ COD/mg\ \ tested\ substance} \times 100$$

fejn:

ThOD = domanda teorika ta' ossiġenu (kalkolu, Appendiċi 3)

COD = domanda kimika ta' ossiġenu, iddeterminata b'mod sperimentali.

Nota: Kultant, iż-żewġ modi ta' kalkolu (perċentwal tat-ThOD jew perċentwal tas-COD) ma jagħtux l-istess riżultati; huwa ppreferut l-użu tat-ThOD, peress li wħud mis-sustanzi mhumiex kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

37. Uri kif mexa t-test ta' degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma (ara l-eżempju fis-sezzjoni dwar 'Validità u interpretazzjoni tar-riżultati'. Jekk hemm biżżejjed dejta, ikkalkola l-fażi ta' dewmien (t_l) u ż-żmien (t_{50}) sabiex tintlaħaq tneħħija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-fażi ta' dewmien mill-kurva ta' bijodegradazzjoni.

38. Jekk tintuża analiżi speċifika (mhux bilfors), iddikjara l-perċentwal tad-degradazzjoni primarja bħala l-perċentwal tat-tneħħija ta' sustanza speċifika fi ħdan il-perjodu tat-test (ikkoreġi għal inbjanki analitiċi).

Rapport tat-Test

39. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-post u d-deskrizzjoni tas-sit tal-kampjunar: status ta' tniġġis u nutrizzjonali (għadd tal-kolonja, nitrat, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);

— il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), dewmien bejn it-teħid u l-użu fit-test);

— il-metodu użat (jekk intuża wieħed) sabiex jiqdiem l-ilma baħar;

— il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tas-COD (jekk issir);

— il-metodu użat għall-kejliet tal-ossiġenu;

— il-proċedura ta' dispersjoni għas-sustanzi li ftit li xejn huma solubbli fil-kundizzjonijiet tat-test;

— il-metodu użat sabiex jiġi stabbilit in-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu ta' għadd tal-pjastrini jew proċedura oħra);

— il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC fl-ilma baħar (mhux bilfors);

— il-metodu użat għal analiżi speċifika (mhux bilfors);

— metodi mhux obbligatorji oħrajn użati sabiex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejliet tal-ATP, eċċ.).

Riżultati:

— dejta analitika rrapportata fuq skeda ta' dejta (kif mehmuża, Appendiċi 5);

— matul it-test ta' degradazzjoni rrappreżentat fuq grafika f'dijagramma li turi l-fażi ta' dewmien, (t_L), l-inklinazzjoni grafika u ż-żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sakemm jintlaħaq teħid ta' 50 fil-mija tat-teħid ta' ossiġenu finali b'ossidazzjoni tas-sustanza tat-test (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura mehmuża, jew għal konvenjenza tittieħed bħala ż-żmien meħtieġ għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;

— id-degradazzjoni perċentwali mkejla wara 28 jum.

Diskussjoni tar-riżultati

Validità u interpretazzjoni tar-riżultati

40. Ir-respirazzjoni inbjank ma għandhiex taqbeż it-30 fil-mija tal-ossiġenu fil-flixkun tat-test. Jekk ma jkunx possibbli li jiġi ssodisfat dan il-kriterju bl-użu ta' ilma baħar meħud frisk, l-ilma baħar irid jitħalla jiqdiem (jistabbilizza) qabel jintuża.

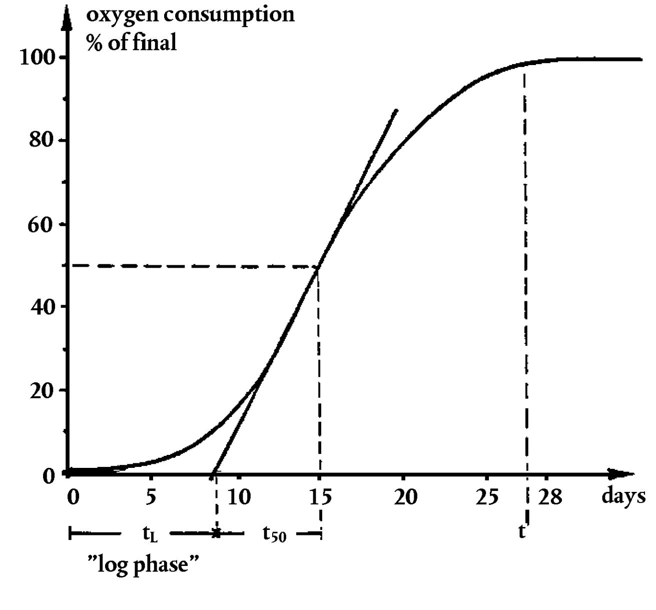
41. Trid tiġi kkunsidrata l-possibbiltà li sustanzi li fihom nitroġenu jaffettwaw ir-riżultati.

42. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza benżoat tas-sodju u anilina għandhom ikunu paragunabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (paragrafu 9). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza jkunu atipiċi, it-test għandu jerġa' jsir bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.

43. Is-sustanza tat-test tista' titqies li hija inibitorja għall-batterji (fil-konċentrazzjoni użata) jekk il-BOD tat-taħlita tas-sustanza ta' referenza u dik tat-test tkun inqas mis-somma tal-BOD tas-soluzzjonijiet separati taż-żewġ soluzzjonijiet.

44. Minħabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin meta mqabblin ma' ħafna mis-sistemi naturali, u konsegwentement minħabba proporzjon favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u sorsi tal-karbonju oħrajn, il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża sabiex jiġi indikat jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli jew le. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment teoriku ta' degradazzjoni li juri mod fattibbli kif jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-'fażi ta' dewmien') u t_{50}, l-intervall taż-żmien (b'bidu minn tL), meħtieġ sabiex jintlaħaq teħid finali ta' 50 % tal-ossiġenu kkaġunat minn ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, jingħata hawn taħt:



LETTERATURA

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Il-Kapitolu C.4-B ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità 'Lesta' Parti III Test ta' Tgħarbil tal-OECD Immodifikat

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Bijodegradazzjoni — Ħama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tat-Teħid tan-Nifs.

(5) Il-Kapitolu C.4-D ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità 'Lesta' Parti VI. Test tal-Flixkun Magħluq.

Appendiċi 1

Determinazzjoni tal-karbonju organiku fl-ilma baħar

METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ

Għad-determinazzjoni tal-karbonju organiku ta' kampjun ta' ilma, il-komposti organiċi fil-kampjun huma ossidizzati għal dijossidu tal-karbonju, ġeneralment bl-użu ta' waħda mit-tliet tekniki li ġejjin:

— ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/irradjazzjoni tal-UV;

— ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/temperatura għolja (116-130 °C);

— kombustjoni.

CO_2 evolut huwa kkwantifikat billi titħaddem titrimetrija jew spettrometrija infraħamra. Inkella, CO_2 jitnaqqas għal metan, li huwa kkwantifikat fuq detettur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma (FID).

Il-persulfat/metodu tal-UV jintuża spiss għall-analiżi tal-ilma 'nadif' b'kontenut baxx ta' materja partikolata. L-aħħar żewġ metodi jistgħu jiġu applikati għal ħafna mit-tipi ta' kampjuni ta' ilma, il-persulfat/l-ossidizzazzjoni tat-temperatura għolja li huma l-iktar xierqa għal kampjuni b'livell baxx, u t-teknika ta' kombustjoni li tapplika għal kampjuni b'kontenut ta' karbonju organiku mhux volatili (NVOC) ferm ogħla minn 1 mg C/l.

Interferenzi

It-tliet metodi kollha kemm huma jiddependu mill-eliminazzjoni jew il-kumpens għal karbonju inorganiku (IC) preżenti fil-kampjun. It-tneħħija tas-CO_2 mill-kampjun aċidifikat huwa l-iktar metodu użat spiss biex jiġi eliminat l-IC, għad li dan jirriżulta wkoll f'telf ta' komposti oraniċi volatili (1). It-tneħħija sħiħa jew il-kumpens tal-IC iridu jiġu żgurati għal kull matriċi tal-kampjun, u karbonju organiku volatili (VOC) irid jiġi stabbilit minbarra l-NVOC li jiddependi mit-tip ta' kampjun.

Konċentrazzjonijiet għoljun ta' klorur jirriżultaw f'effiċjenza mnaqqsa ta' ossidizzazzjoni bl-użu ta' persulfat/metodu tal-UV (2). Madankollu, l-applikazzjoni ta' reaġent ta' ossidizzazzjoni mmodifikat biż-żieda tan-nitrat tal-merkurju (II) tista' tneħħi din l-interferenza. Huwa rrakkomandat li l-volum massimu tollerabbli tal-kampjun jintuża sabiex jiġi evalwat kull tip ta' kampjun li fih il-klorur. Konċentrazzjonijiet għoljin ta' melħ fil-kampjun analizzati bl-użu tal-metodu ta' kombustjoni jistgħu jikkaġunaw kisi bil-melħ tal-katalist u korrożjoni eċċessiva tat-tubu ta' kombustjoni. Għandhom jittieħdu prekawzjonijiet skont il-manwal tal-manifattur.

Kampjuni ferm imċajprin kif ukoll kampjuni li fihom materja partikolata jistgħu jiġu ossidizzati mhux b'mod totali meta jitħaddem il-persulfat/metodu tal-UV.

Eżempju ta' metodu xieraq

Karbonju organiku mhux volatili huwa stabbilit permezz ta' ossidizzazzjoni b'persulfat/irradjazzjoni tal-uv u kwantifikazzjoni sussegwenti tas-CO_2 evolut bl-użu ta' spettrometrija infraħamra mhux dispersiva.

Ir-reaġent ta' ossidizzazzjoni huwa mmodifikat skont is-suġġerimenti mogħtijin f'(2) kif deskritt fil-manwal tal-manifattur:

a) 8,2 g $HgCl_2$ u 9,6 g $Hg(NO_3)_2$ H_2O huma dissolti f'diversi mijiet ta' millilitri ta' ilma reaġent b'konċentrazzjoni baxxa tal-karbonju.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ huma dissolti fis-soluzzjoni ta' melħ merkuriku.

c) 5 ml HNO_3 (konċ.) jiżdiedu mat-taħlita.

d) ir-reaġent jiġi dilwit għal 1 000 ml.

L-interferenza mill-klorur jitneħħa bl-użu ta' volum tal-kampjun ta' 40 µl għal 10 fil-mija klorur u volum tal-kampjun ta' 200 µl għal 1,9 fil-mija klorur. Kampjuni ta' konċentrazzjonijiet għoljin ta' klorur u/jew volumi ikbar tal-kampjun jistgħu jiġu analizzati skont dan il-metodu diment li tiġi evitata akkumulazzjoni tal-klorur fir-reċipjent ta' ossidazzjoni. Imbagħad jista' jiġi stabbilit il-karbonju organiku volatili, jekk relevanti, għat-tip ta' kampjun inkwistjoni.

LETTERATURA

(1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Ta' interess ukoll (jiddeskrivi sistema ta' awtoanaliżi):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

Appendiċi 2

Bijodegradazzjoni fl-ilma baħar

METODU TA' FLASK MHEŻŻEŻ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**

2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**

3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija: mg/l bħala sustanza

Konċentrazzjoni inizjali fil-midjum, t_o: mg/l bħala sustanza

: mg DOC/l

4. **ILMA BAĦAR:**

Is-sors:

Id-data tat-teħid:

Il-fond tat-teħid:

Id-dehra f'ħin it-teħid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-teħid: ‰

It-temperatura fit-teħid: °C

Id-DOC 'x' sigħat wara t-teħid: mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, żmien kemm tħalla jiqdiem, eċċ.):

L-għadd tal-kolonja mikrobjali — kampjun oriġinali: kolonji/ml

— fil-bidu tat-test: kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **DETERMINAZZJONIJIET TAL-KARBONJU:**

Analizzatur tal-karbonju:

	Nru tal-flask		DOC wara n jiem (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: ilma baħar miżjud bin-nutrijenti bis-sustanza tat-test	1	a_1					
		a_2					
		medja, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		medja, $C_{b(t)}$					
Inbjank: ilma baħar miżjud bin-nutrijenti mingħajr is-sustanza tat-test	1	c_1					
		c_2					
		medja, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		medja, $C_{d(t)}$					
	medja, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DEJTA MHUX IPPROĊESSATA:**

Nru tal-Flask	Kalkolu tar-riżultati	% Degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Medja (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Ma għandhiex tingħata l-medja ta' D_1 u D_2 jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: Jistgħu jintużaw formats simili meta d-degradazzjoni tkun segwita minn analiżi speċifika u għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **DEGRADAZZJONI ABIJOTIKA (mhux obbligatorja)**

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. tad-DOC (mg/l) fil-kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \, abiotic \, degradation = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Appendiċi 3

Kalkolu tad-domanda teorika bijokimika ta' ossiġenu

METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

It-ThOD tas-sustanza $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ tal-piż molekolari MW hija kkalkolata skont:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Dan il-kalkolu jimplika li C huwa mineralizzat għal CO_2, H sa H_2O, P sa P_2O_5 u Na to Na_2O. L-aloġenu huwa eliminat bħala aloġenur tal-idroġenu u nitroġenu bħala ammobijaka.

Eżempju:

Glukożju $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ \ glucose$$

Il-piżijiet molekolari tal-melħiet għajr dawk tal-metalli alkali huma kkalkolati fuq is-suppożizzjoni li l-melħiet ġew idrolizzati.

Il-kubrit huwa supponut li huwa ossidizzat għall-istat ta' + 6.

Eżempju:

Sodium n-dodecylbenzenesulphonate $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ \ substance$$

Fil-każ ta' sustanzi li fihom nitroġenu, in-nitroġenu jista' jiġi eliminat bħala ammonijaka, nitrit, jew nitrat li jikkorrispondi għal domandi bijokimiċi teoriċi differenti ta' ossiġenu.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

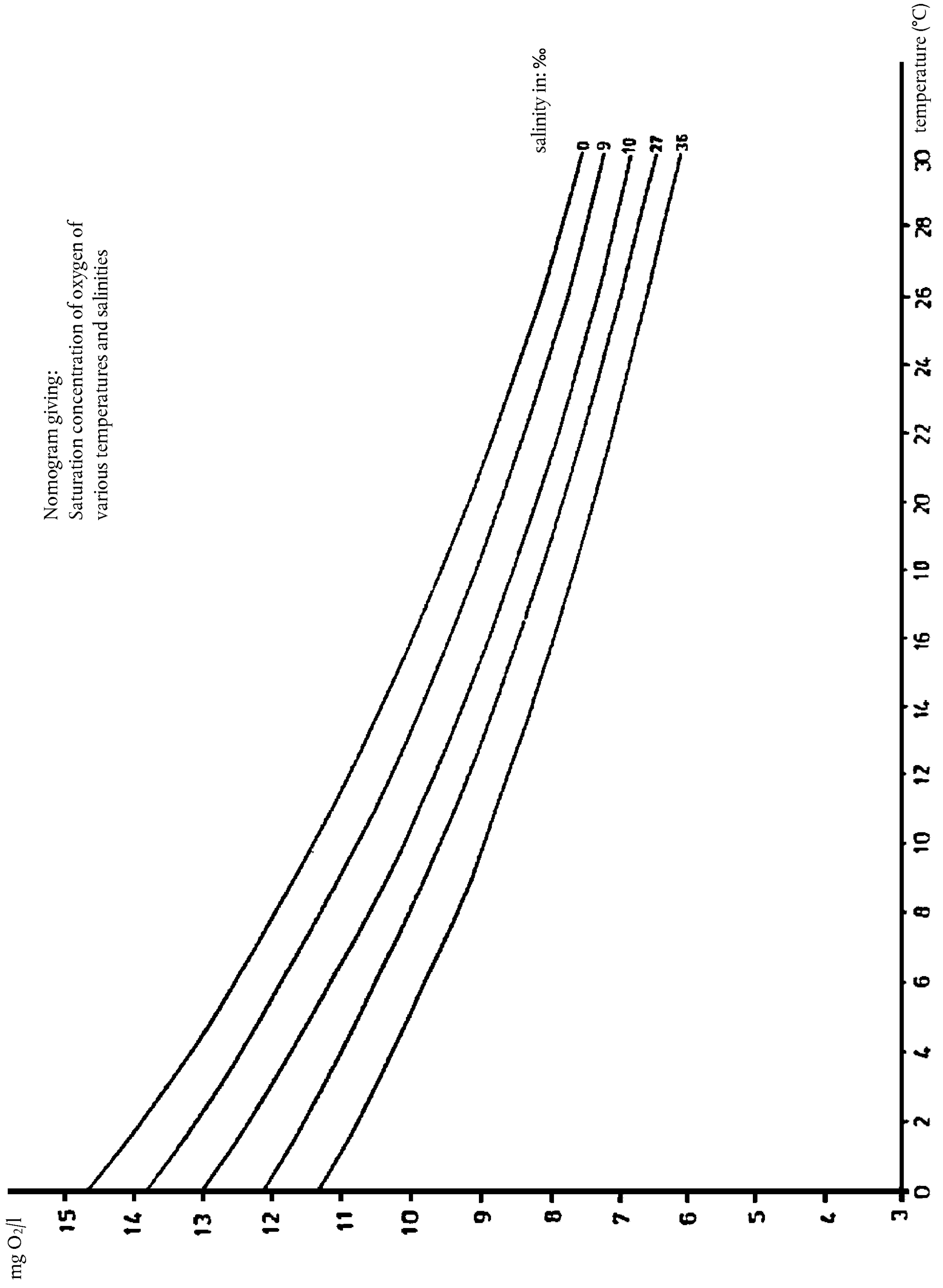
$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Jekk tiġi osservata formazzjoni ta' nitrat sħiħ permezz ta' analiżi fil-każ tat-tieni amina:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ \ substance$$

Appendiċi 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
temperature (°C)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
mg O2/l
15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3

Appendiċi 5

Bijodegradazzjoni fl-ilma baħar

METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**

2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**

3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija: mg/l

Konċ. inizjali fil-midjum ta' ilma baħar: mg/l

ThOD jew COD: mg O_2/mg sustanza tat-test

4. **LMA BAĦAR:**

Is-sors:

Id-data tat-teħid:

Il-fond tat-teħid:

Id-dehra f'ħin it-teħid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-teħid: ‰

It-temperatura fit-teħid: °C

Id-DOC 'x' sigħat wara t-teħid: mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, żmien kemm tħalla jiqdiem, eċċ.):

L-għadd tal-kolonja mikrobjali — kampjun oriġinali: kolonji/ml

— fil-bidu tat-test: kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **MIDJUM TAT-TEST:**

It-temperatura wara l-għoti tal-arja: °C

Il-konċentrazzjoni tal-O_2 wara l-għoti tal-arja u l-qagħda qabel jibda t-test: mg O_2/l

6. **DETERMINAZZJONI TAD-DO:**

Metodu: Winkler/elettrodu

	Nru tal-flask		mg O_2/l wara n jiem			
			0	5	15	28
Test: nutrijent — ilma baħar miżjud bis-sustanza tat-test	1	a_1				
	2	a_2				
	Test medju	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Nru tal-flask		mg O_2/l wara n jiem			
			0	5	15	28
Inbjank: nutrijent — ilma baħar miżjud, iżda mingħajr is-sustanza tat-test	1	c_1				
	2	c_2				
	Inbjank medju	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Nota: Jista' jintuża format simili għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **TNAQQIS TAD-DO: % DEGRADAZZJONI (%D):**

	It-tnaqqis tad-DO wara n jiem		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)\ (^1)}{test\ substance\ (mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Dan jissuponi li $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, fejn

$m_{b(o)}$ = il-valur inbjank fil-jum 0,

$m_{t(o)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum 0.

Jekk $m_{b(o)}$ mhuwiex daqs $m_{t(o)}$, uża $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, fejn

$m_{b(x)}$ = il-valur inbjank fil-jum x,

$m_{t(x)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum x.

C.43. **IL-BIJODEGRADABILITÀ ANEJROBIKA TAS-SUSTANZI ORGANIĊI FIL-ĦAMA DIĠESTITA: BIL-KEJL TAL-PRODUZZJONI TAL-GASS**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwiavlenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 311 tal-OECD (2006). Hemm għadd ta' testijiet ta' tgħarbil għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità aerobika tas-sustanzi organiċi (Metodi ta' ttestjar C.4, C.9, C.10, u C.11 (1) u t-TG 302C tal-OECD (2)) u r-riżultati tal-applikazzjoni tagħhom intużaw b'suċċess sabiex jitbassar l-eżitu tas-sustanzi fl-ambjent aerobiku, b'mod partikolari fl-istadji aerobiċi tat-trattament tal-ilma mormi. Bosta proporzjonijiet ta' sustanzi li solubbli fl-ilma, kif ukoll ta' dawk li jassorbu mas-solidi tal-iskart, huma indirizzati b'mod aerobiku wkoll, peress li huma preżenti fi drenaġġ dikantat. Madankollu, il-partijiet il-kbar ta' dawn is-sustanzi huma mqabbdin mal-ħama dikantata primarja, li hija separata mid-drenaġġ mhux ipproċessat f'vaski ta' dikantazzjoni qabel ma d-drenaġġ dikantat, jew supernatant, jiġi ttrattat b'mod aerobiku. Imbagħad, il-ħama, li fiha wħud mis-sustanzi solubbli fil-likwidu interstizjali, titgħadda f'diġestituri msaħħnin għat-trattament anaerobiku. Għalissa għad ma hemm ebda test f'din is-serje għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika f'diġestituri anaerobiċi u dan it-test għandu l-għan li jneħħi din id-diskrepanza; mhux bilfors ikun applikabbli għal kompartimenti ambjentali anossiċi oħrajn.

2. Tekniki respirometriċi li jkejlu l-ammonti ta' gass prodott, b'mod partikolari l-metan (CH_4) u d-diossidu tal-karbonju (CO_2) intużaw b'suċċess f'kundizzjonijiet anaerobiċi sabiex tiġi vvalutata l-bijodegradabilità anaerobika. Birch et al (3) irrevedew dawn il-proċeduri u kkonkludew li l-ħidma ta' Shelton u Tiedje (4), fuq il-bażi tal-istudji preċedenti tagħhom (5)(6)(7), kienet l-iktar waħda komprensiva. Il-metodu (4), li kompla jiġi żviluppat minn oħrajn (8) u li sar l-istandards Amerikani (9)(10), ma solviex il-problemi marbutin mas-solubilitajiet differenti tas-CO_2 u CH_4 fil-midjum tat-test u mal-kalkolu tal-produzzjoni teorika tal-gass ta' sustanza tat-test. Ir-rapport tal-ECETOC (3) irrakkomanda l-kejl addizzjonali tal-kontenut ta' karbonju inorganiku dissolt (DIC) tal-likwidu supernatant, li għamel it-teknika ferm iktar ġeneralment applikabbli. Il-metodu tal-ECETOC kien soġġett għal eżerċizzju internazzjonali ta' kalibraġġ (jew ringtest) u sar l-Istandard tal-ISO, ISO 11734 (11).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar, li kien ibbażat fuq l-ISO 11734 (11), jiddeskrivi metodu ta' tgħarbil għall-evalwazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika potenzjali ta' sustanzi organiċi f'kundizzjoni speċifika (jiġifieri f'diġestitur anaerobiku fi żmien partikolari u medda ta' konċentrazzjoni ta' mikroorganiżmi). Peress li ħama dilwita tintuża b'konċentrazzjoni relattivament għolja tas-sustanza tat-test u d-durata tat-test tipikament tkun itwal mill-ħin ta' żamma fid-diġestituri anaerobiċi, il-kundizzjonijiet tat-test mhux bilfors ikunu jikkorrispondu għall-kundizzjonijiet f'diġestituri anaerobiċi, u din lanqas ma hija applikabbli għall-valutazzjoni tal-bijodegradabilità anaerobika tas-sustanzi organiċi f'kundizzjonijiet ambjentali differenti. Il-ħama tiġi esposta għas-sustanza tat-test sa 60 jum, perjodu itwal miż-żmien normali ta' żamma tal-ħama (25 sa 30 jum) f'diġestituri anaerobiċi, għad li f'żoni industrijali ż-żminijiet ta' żamma jistgħu jkunu ferm itwal. Il-previżjonijiet mir-riżultati ta' dan it-test ma jistgħux ikunu daqstantieħor konvinċenti bħal fil-każ ta' bijodegradazzjoni aerobika, peress li l-evidenza miġbura dwar l-imġiba tas-sustanzi tat-test f'testijiet aerobiċi 'lesti' u f'testijiet ta' simulazzjoni u l-ambjent aerobiku huwa biżżejjed biex ikun hemm fiduċja li hemm rabta; ftit li xejn teżisti evidenza simili għall-ambjent anaerobiku. Huwa supponut li l-bijodegradazzjoni anaerobika sħiħa sseħħ jekk tintlaħaq 75 %-80 % tal-produzzjoni teorika tal-gass. Il-proporzjonijiet għoljin tas-sustanza għall-bijomassa użata f'dawn it-testijiet ifissru li sustanza li tgħaddi għandha probabilità ikbar li tiġi degradata f'diġestitur anaerobiku. Barra minn hekk, sustanzi li ma jirnexxilhomx jiġu kkonvertiti f'gass fit-test mhux bilfors jippersistu fi proporzjonijiet ta' sustanza għall-bijomassa iktar ambjentalment realistiċi. Barra minn hekk, iseħħu reazzjonijiet anaerobiċi oħrajn li fihom is-sustanzi jistgħu jkunu tal-inqas parzjalment degradati, eż. b'deklorinazzjoni, iżda dan it-test ma jidentifikax it-tali reazzjonijiet. Madankollu, bl-applikazzjoni tal-metodi analitiċi speċifiċi għad-determinazzjoni tas-sustanza tat-test, l-għibien tagħha tista' tiġi ssorveljata (ara l-paragrafi 6, 30, 44 u 53).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Ħama diġestita maħsula ([1]), li fiha konċentrazzjonijiet baxxi (< 10 mg/l) ta' karbonju inorganiku (IC), tiġi dilwita għaxar darbiet għal konċentrazzjoni ta' solidi totali ta' 1 g/l sa 3 g/l u inkubata f'35 °C ± 2 °C

([1]) Il-ħama diġestita hija taħlita tal-fażijiet dikantati tad-drenaġġ u l-ħama attivata, li ġew inkubati f'diġestitur anaerobiku f'madwar 35 °C sabiex jonqsu l-bijomassa u l-problemi tal-irwejjaħ u sabiex titjieb il-ħila tal-ħama li tneħħi l-ilma. Tikkonsisti f'ġemgħa ta' batterji metanoġeniċi u fermentattivi anaerobiċi li jipproduċu diossidu tal-karbonju u metan (11).

f'reċipjenti ssiġillati bis-sustanza tat-test f'20 sa 100 mg C/l sa 60 jum. Jiġi pprovdut għall-kejl tal-attività tal-ħama billi jsiru kontrolli inbjank paralleli b'inokulu tal-ħama fil-midjum iżda mingħajr is-sustanza tat-test.

5. Titkejjel iż-żieda fil-pressjoni tal-ispazju vojt fuqani fir-reċipjenti li tirriżulta mill-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju u l-metan. Ħafna mis-CO_2 prodott ser jiġi dissolt fil-fażi likwida jew jiġi ttrasformat f'karbonat jew karbonat tal-idroġenu fil-kundizzjonijiet tat-test. Il-karbonju inorganiku jitkejjel fi tmiem it-test.

6. L-ammont ta' karbonju (inorganiku flimkien mal-metan) li jirriżulta mill-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test jiġi kkalkolat mill-produzzjoni netta ta' gass u l-formazzjoni netta ta' IC fil-fażi likwida oltre l-valuri tal-kontroll inbjank. Il-firxa tal-bijodegradazzjoni tiġi kkalkolata mill-IC totali u l-metan-C prodott bħala perċentwal tal-ammont imkejjel u kkalkolat ta' karbonju miżjud bħala sustanza tat-test. Kif qed tipproċedi l-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi jittieħdu kejliet intermedji tal-produzzjoni tal-gass biss. Barra minn hekk, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi stabbilita b'analiżijiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Il-karatteristiċi tal-purità, is-solubilità tal-ilma, il-volatilità u l-assorbiment tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufin sabiex tkun tista' ssir interpretazzjoni tajba tar-riżultati. Il-kontenut tal-karbonju organiku (% w/w) tas-sustanza tat-test irid ikun magħruf jew mill-istruttura kimika tiegħu jew b'kejl. Għal sustanzi tat-test volatili, kostanti tal-liġi ta' Henry imkejjel jew ikkalkolat jgħin fid-deċiżjoni ta' jekk test huwiex applikabbli. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal batterji anaerobiċi hija siewja meta tingħażel konċentrazzjoni xierqa tat-test, u sabiex jiġu interpretati riżultati li juru bijodegradabilità dgħajfa. Huwa rrakkomandat li jiġi inkluż il-kontroll tal-inibizzjoni sakemm ma jkunx magħruf li s-sustanza tat-test mhijiex inibitorja għal attivitajiet mikrobjali anaerobiċi (ara l-paragrafu 21 u l-ISO 13641-1 (12)).

APPLIKABILITÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi li jinħallu fl-ilma; jista' jiġi applikat ukoll għal sustanzi ftit li xejn solubbli u insolubbli, diment li jintuża metodu ta' dożaġġ eżatt. eż. ara l-ISO 10634 (13). B'mod ġenerali, għal sustanzi volatili hemm bżonn ta' deċiżjoni każ, każ. Jista' jkun hemm bżonn li jittieħdu passi speċjali, pereżempju, sabiex ma jinħelisx gass matul it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Biex tivverifika l-proċedura, tiġi ttestjata sustanza ta' referenza billi jiġu stabbiliti reċipjenti xierqa b'mod parallel bħala parti mit-testijiet normali. Fenol, benżoat tas-sodju u polietilen glikol 400 huma eżempji u jkunu mistennijin li jiġu degradati bi produzzjoni teorika ta' gass ogħla minn 60 % (jiġifieri metan u karbonju inorganiku) fi żmien 60 jum (3)(14).

RIPRODUĊIBILITÀ TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

10. F'ringtest internazzjonali (14) kien hemm riproduċibilità tajba f'kejliet tal-pressjoni tal-gass bejn reċipjenti ta' triplikati. Id-devjazzjoni standard relattiva (koeffiċjent ta' varjazzjoni, COV) kienet fil-parti l-kbira inqas minn 20 %, għad li dan il-valur spiss żdied għal > 20 % fil-preżenza ta' sustanzi tossiċi jew lejn tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum. Instabu devjazzjonijiet ogħla f'reċipjenti b'volum ta' < 150 ml ukoll. Il-valuri finali tal-pH tal-midjums tat-test kienu fil-medda 6,5-7,0.

11. Fir-ringtest inkisbu r-riżultati li ġejjin.

Sustanza tat-test	Dejta totali n_1	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta valida n_2	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta > 60 % degradazzjoni f'testijiet validi n_3
Aċidu palmitiku	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporzjon ta' n_2

12. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni tal-medja għall-valuri kollha miksubin bl-aċidu palmitiku u l-polietilen glikol 400 telgħu sa 45 % (n = 36) u 35 % (n = 38) rispettivament. Meta tneħħew il-valuri < 40 % u > 100 % (b'dawk imsemmijin l-ewwel li ġew supponuti li kienu dovuti għal kundizzjonijiet mhux ottimali, u tal-aħħar għal raġunijiet mhux magħrufin), is-COVs tnaqqsu għal 26 % u 23 %, rispettivament. Il-proporzjonijiet tal-valuri 'validi' li kisbu degradazzjoni minima ta' 60 % kienu 70 % għal aċidu palmitiku u 83 % għal polietilen glikol 400. Il-proporzjonijiet tal-bijodegradazzjoni perċentwali derivata mill-kejliet tad-DIC kienu relattivament baxxi iżda varjabbli. Għall-aċidu palmitiku, il-medda kienet ta' 0-35 %, il-medja 12 %, b'COV ta' 92 % u għal polietilenglikol 400 0-40 %, medja 24 %, b'COV ta' 54 %.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

13. Huma meħtieġa t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:

(a) Inkubatur — li jilqa' għall-isparks u kkontrollata f'35 °C ± 2 °C;

(b) Reċipjenti tat-test tal-ħġieġ reżistenti għall-pressjoni ta' daqs nominali xieraq [1], b'kull wieħed mgħammar b'septum issiġillat għall-gass, li jiflaħ madwar 2 bar. Il-volum tal-ispazju vojt fuqani għandu jkun ta' madwar 10 % sa 30 % mill-volum totali. Jekk il-bijogass jinħeles b'mod regolari, madwar 10 % tal-volum tal-ispazju vojt fuqani huwa xieraq, iżda jekk il-ħelsien tal-gass iseħħ biss fi tmiem it-test, 30 % huwa xieraq. Fliexken tas-serum tal-ħġieġ, b'volum nominali ta' 125 ml u volum totali ta' 160 ml, issiġillat b'septa tas-serum. [2] u ċrieki tal-aluminju bil-pressa huma rrakkomandati meta tinħeles il-pressjoni f'kull ħin ta' teħid tal-kampjuni;

(c) Apparat għall-kejl tal-pressjoni [3] adattat sabiex ikun jista' jitkejjel u jiġi vventjat il-gass prodott, pereżempju, apparat portabbli li jkellel il-pressjoni bi preċiżjoni mqabbad ma' labra ta' siringa xierqa; valv issiġillat għall-gass tridirezzjonali jħaffef il-ħlus ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Hemm bżonn li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, sabiex l-iżbalji dovuti għat-twarrib tal-volum tat-tagħmir ma jkunux sinifikanti.

[1] Id-daqs rakkomandat huwa ta' 0,1 litru sa litru.

[2] Huwa rrakkomandat li jintużaw septa tas-silikon issiġillati għall-gass. Huwa rrakkomandat ukoll li s-siġill għall-gass tat-tappijiet, speċjalment septa tal-butil lasktu, jiġi ttestjat għaliex ħafna septa disponibbli fis-suq ma jissiġillawx biżżejjed għall-gass kontra l-metan u ċerti septa ma jibqgħux issikkati meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.

[3] L-apparat għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija meħtieġa ebda kalibrazzjoni fil-laboratorju. Il-preċiżjoni tal-kalibrazzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari f'1 × 10^5 Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati oħrajn għall-kejl (mingħajr kalibraġġ iċċertifikat mill-manifattur), huwa rrakkomandat kalibraġġ fuq il-medda totali f'intervalli regolari.

Nota — Il-qari tal-pressjoni jintuża direttament sabiex jiġi kkalkolat l-ammont ta' karbonju prodott fl-ispazju vojt fuqani (paragrafi 42 sa 44). Inkella, il-qari tal-pressjoni jista' jiġi kkonvertit f'volumi (f'35 °C, pressjoni atmosferika) ta' gass prodott bl-użu ta' graff tal-konverżjoni. Dan il-graff jinbena minn dejta miksuba bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' gass tan-nitroġenu f'serje ta' reċipjenti tat-test (eż. fliexken tas-serum) f'35 ° +/– 2 °C u r-reġistrazzjoni tal-qari tal-pressjoni stabbilizzata li jirriżulta (Ara l-Appendiċi 2). Il-kalkolu jintwera fin-Nota fil-paragrafu 44.

Attenzjoni — Ara li tevita korrimenti bil-labra meta tuża mikrosiringi.

(d) Analizzatur tal-karbonju, xieraq għad-determinazzjoni diretta ta' karbonju inorganiku fil-medda ta' 1 mg/l sa 200 mg/l;

(e) Siringi bi preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;

(f) Segwituri u ħawwada manjetiċi (mhux bilfors);

(g) Kompartiment tal-ingwanti (rakkomandat);

Reaġenti

14. Uża reaġenti ta' grad analitiku l-ħin kollu.

Ilma

15. Ilma distillat jew dejonizzat (deossiġenat bir-raxx bil-gass tan-nitroġenu li fih inqas minn 5 μl/l ossiġenu), li fih inqas minn 2 mg/l karbonju organiku dissolt (DOC).

Midjum tat-test

16. Ħejji l-midjum ta' dilwizzjoni biex dan ikun fih il-kostitwenti li ġejjin bl-ammonti ddikjarati;

Anidru potassju diidroġenu fosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Disodju idroġenu fosfat dodecahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Klorid tal-ammonium, (NH_4Cl)	0,53 g
Kloru tal-kalċju diidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Tetraidrat tal-klorur tal-ħadid (II) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resażurina (indikatur tal-ossiġenu)	0,001g
Nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors, paragrafu 18)	10 ml
Żid ilma deossiġenat (paragrafu 15)	sa litru

Nota: Għandu jintuża sulfur tas-sodju fornit ġdid jew inkella għandu jinħasel u jitnixxef qabel jintuża, sabiex tiġi żgurata kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. It-test jista' jsir bla ma jintuża kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26). F'dan il-każ, il-konċentrazzjoni finali tas-sulfur tas-sodju fil-midjum għandha tiżdied għal 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ għal kull litru. Sulfur tas-sodju jista' jiżdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija anaerobika xierqa permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Is-sulfur tas-sodju jista' jiġi sostitwit miċ-ċitrat tat-titanju (III) li jiżdied permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Iċ-ċitrat tat-titanju

(III) huwa aġent reduċenti ferm effettiv u b'tossiċità baxxa, li jitħejja kif ġej: Ħoll 2,94 g ta' diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma deossiġenat (biex tikseb soluzzjoni ta' 200 mmol/l) użid 5 ml ta' 15 % (w/v) soluzzjoni tal-klorur tat-titanju (III) Innewtralizza għal pH 7 ± 0,2 b'alkali minerali u ixħet f'reċipjent xieraq taħt fluss ta' nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l.

17. Ħallat il-komponenti tal-midjum tat-test ħlief l-aġent reduċenti (ċitrat tat-titanju tas-sulfur tas-sodju) u ixħet raxx ta' gass tan-nitroġenu fuq is-soluzzjoni għal madwar 20 min eżatt qabel l-użu sabiex tneħħi l-ossiġenu. Imbagħad żid il-volum xieraq tas-soluzzjoni mħejjija ġdida tal-aġent reduċenti (ħejji f'ilma deossiġenat) eżatt qabel ma tuża l-midjum Aġġusta l-pH tal-midjum, jekk ikun hemm bżonn, b'alkali jew aċidu minerali dilwit għal 7 ± 0,2.

Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors)

18. Huwa rrakkomandat li l-midjum tat-test għandu jkun fih l-elementi traċċa li ġejjin sabiex jitjiebu l-proċessi ta' degradazzjoni anaerobika, speċjalment jekk jintużaw konċentrazzjonijiet baxxi (eż. 1g/l) ta' innokulu (11).

Manganese chloride tetrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Aċidu boriku (H_3BO_3)	5 mg
Klorur taż-żingu ($ZnCl_2$)	5 mg
Klorur tar-ram (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Disodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Essaidrat tal-klorur tal-nikil ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Disodium selenite (Na_2SeO_3)	5 mg
Żid l-ilma deossiġenat (paragrafu 15)	sa litru

Sustanza tat-test

19. Żid is-sustanza tat-test bħala soluzzjoni ewlenija, sospensjoni, emulsjoni jew direttament bħala solida jew likwida, jew assorbita ma' filtru tal-fibra tal-ħġieġ biex tikseb konċentrazzjoni ta' xejn iktar minn 100 mg/l karbonju organiku. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin, ħejji soluzzjoni xierqa bl-ilma (paragrafu 15) (deossiġenata minn qabel permezz ta' raxx ta' gass tan-nitroġenu) ta' saħħa tali li l-volum miżjud ikun inqas minn 5 % tal-volum totali tat-taħlita tar-reazzjoni. Aġġusta l-pH tas-soluzzjoni ewlenija għal pH 7 ± 0,2 jekk ikun hemm bżonn. Għas-sustanzi tat-test li ma jkunux solubbli biżżejjed fl-ilma, ikkonsulta l-ISO 10634 (13). Jekk jintuża solvent, ħejji kontroll addizzjonali, bis-solvent biss miżjud mal-midjum inokulat. Għandhom jiġu evitati solventi organiċi li huma magħrufin li jinibixxu l-produzzjoni tal-metan, bħall-kloroform u t-tetraklorur tal-karbonju.

Attenzjoni — Qandel sustanzi tat-test tossiċi u dawk bi karatteristiċi mhux magħrufin bil-galbu.

Sustanzi ta' referenza

20. Is-sustanzi ta' referenza bħall-benżoat tas-sodju, il-fenol u l-polietilen glikol 400 intużaw b'suċċess sabiex tiġi vverifikata l-proċedura, u ġew bijodegradati b'iktar minn 60 % fi żmien 60 jum. Ħejji soluzzjoni ewlenija (f'ilma deossiġenat) tas-sustanza ta' referenza magħżula bl-istess mod bħas-sustanza tat-test u aġġusta għal pH 7 ± 0,2 jekk ikun hemm bżonn.

Kontroll tal-inibizzjoni (kundizzjonali)

21. Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal mikroorganiżmi anaerobiċi biex issib l-iktar konċentrazzjoni tat-test xierqa, żid is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza f'reċipjent li fih il-midjum tat-test (ara l-paragrafu 16), b'kull waħda bl-istess konċentrazzjonijiet kif miżjudin, rispettivament (ara l-paragrafi 19 u 20 u ara wkoll l-ISO 13641 — 1 (12)).

Ħama diġestita

22. Iġbor il-ħama diġestita minn diġestitur f'impjant għat-trattament tal-ilma mormi li jittratta fil-parti l-kbira drenaġġ domestiku. Il-ħama għandha tiġi kkaratterizzata bis-sħiħ u l-informazzjoni ta' sfond dwarha għandha tiġi rrapportata (ara l-paragrafu 54). Jekk huwa maħsub li ser isir użu mill-inokulu adattat, tista' tiġi kkunsidrata ħama diġestita minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ industrijali. Uża fliexken b'għonq wiesa' mibnijin minn polieetilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-ġbir tal-ħama diġestita. Żid il-ħama sa madwar 1cm mill-quċċata tal-fliexken u ssiġillahom sew, idealment b'valv tas-sikurezza. Wara li tittrasportaha fil-laboratorju, il-ħama miġbura tista' tituża direttament jew titqiegħed f'diġestitur ta' skala tal-laboratorju. Eħles il-bijogass żejjed billi tiftaħ il-fliexken tal-ħama bil-galbu. Inkella, tista' tintuża ħama anaerobika mkabbra fil-laboratorju bħala sors ta' inokulu iżda jista' jkun li l-ispettru ta' attività tagħha ġie indebolit.

Attenzjoni — Il-ħama diġestita tipproduċi gassijiet li jaqbdu u li jippreżentaw riskji ta' nirien u splużjoni: potenzjalment fiha wkoll organiżmi patoġeniċi, u għalhekk għandek tieħu l-prekawzjonijiet xierqa meta tqandel il-ħama. Għal raġunijiet ta' sikurezza, tużax reċipjenti tal-ħġieġ biex tiġbor il-ħama.

23. Sabiex tonqos il-produzzjoni tal-gass ta' sfond u tonqos l-influwenza tal-kontrolli inbjank, tista' tiġi kkunsidrata prediġestjoni tal-ħama. Jekk ikun hemm bżonn ta' prediġestjoni, il-ħama għandha titħalla tiddiġesti mingħajr ma jiżdied ebda nutrijent jew subtstrat f'35 °C ± 2 °C għal mhux iktar minn 7 ijiem. Instab li l-prediġestjoni għal madwar 5 ijiem normalment tipprovdi tnaqqis ottimali fil-produzzjoni tal-gass tal-inbjank mingħajr żidiet mhux aċċettabbli fil-perjodi ta' dewmien jew ta' inkubazzjoni matul il-fażi tat-test jew telf ta' attività f'numru żgħir tas-sustanzi ttestjati.

24. Għas-sustanzi tat-test li ftit li xejn huma bijodegradabbli, jew li huma mistennijin li jkunu hekk, ikkunsidra l-preespożizzjoni tal-ħama għas-sustanza tat-test biex tikseb inokulu iktar adattat. F'każ bħal dan, żid is-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni tal-karbonju organiku ta' 5 mg/l għal 20 mg/l mal-ħama diġestita u inkubata sa massimu ta' ġimgħatejn. Aħsel il-ħama preesposta bil-galbu qabel tużaha (ara l-paragrafu 25) u indika fir-rapport tat-test il-kundizzjonijiet tal-preespożizzjoni.

Inokulu

25. Aħsel il-ħama (ara l-paragrafi 22 sa 24) eżatt qabel tużaha, biex tnaqqas il-konċentrazzjoni tal-IC għal inqas minn 10 mg/l fis-sospensjoni tat-test finali. Iċċentrifuga l-ħama f'tubi ssiġillati (eż. 3 000 g matul 5 min) u armi s-supernatant. Issospendi l-pelit li jirriżulta f'midjum deossiġenat (paragrafi 16 u 17), erġa' ċċentrifuga s-sospensjoni u armi l-likwidu supernatanti. Jekk l-IC ma naqsitx biżżejjed, il-proċedura ta' ħasil tal-ħama tista' tiġi ripetuta għal massimu ta' darbtejn. Dan ma jidhirx li jaffettwa l-mikroorganiżmi b'mod avvers. Fl-aħħar nett, issospendi l-pelit fil-volum meħtieġ tal-midjum tat-test u stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-solidi totali [eż. ISO 11923 (15)]. Il-konċentrazzjoni finali tas-solidi totali fir-reċipjenti tat-test għandha tkun fil-medda ta' 1 g/l sa 3 g/l (jew madwar 10 % ta' dik fil-ħama diġestita mhux dilwita). Agħmel l-operazzjonijiet ta' hawn fuq b'tali mod li l-ħama ftit li xejn tidħol f'kuntatt mal-ossiġenu (eż. uża atmosfera tan-nitroġenu).

PROĊEDURA TAT-TEST

26. Agħmel il-proċeduri inizjali li ġejjin billi tuża tekniki biex iżżomm il-kuntatt bejn il-ħama diġestita u l-ossiġenu baxx kemm jista' jkun, pereżempju, jista' jkun hemm bżonn li jsir xogħol ġewwa kompartiment tal-ingwanti f'atmosfera ta' nitroġenu u/jew tagħmel porga tal-fliexken bin-nitroġenu (4).

Tħejjija tal-assaġġi tat-test u tal-kontroll

27. Ħejji tal-inqas reċipjenti tat-test triplikati (ara l-paragrafu 13-b) għas-sustanza tat-test, kontrolli inbjank, sustanza ta' referenza, kontrolli ta' inibizzjoni (kundizzjonali) u kompartimenti ta' kontroll tal-pressjoni (proċedura mhux obbligatorja) (ara l-paragrafi 7, 19 sa 21). Jistgħu jitħejjew ukoll reċipjenti addizzjonali sabiex tiġi evalwata l-bijodegradazzjoni primarja bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi għas-sustanza tat-test. L-istess sett ta' kontrolli inbjank jista' jintuża għal bosta sustanzi tat-test fl-istess test diment li l-volumi tal-ispazju vojt fuqani jkunu konsistenti.

28. Ħejji l-inokulu dilwit qabel ma żżidu fir-reċipjenti eż. permezz ta' pipetta b'toqba wiesgħa. Żid l-alikwoti ta' inokulu mħawwad sew (paragrafu 25) sabiex il-konċentrazzjoni tas-solidi totali tkun l-istess fir-reċipjenti kollha (bejn 1 g/l u 3 g/l). Żid is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u ta' referenza wara li taġġustahom għal pH 7 ± 0,2, jekk ikun hemm bżonn. Is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għandhom jiżdiedu bl-użu tal-iktar rotta tal-aministrazzjoni xierqa (paragrafu 19).

29. Is-soltu, il-konċentrazzjoni tat-test tal-karbonju organiku għandha tkun bejn 20 u 100 mg/l (paragrafu 4). Jekk is-sustanza tat-test tkun tossika, il-konċentrazzjoni tat-test għandha titnaqqas għal 20 mg C/l, jew saħansitra inqas jekk trid titkejjel biss il-bijodegradazzjoni primarja b'analiżijiet speċifiċi. Ta' min jinnota li l-varjabbiltà tar-riżultati tat-test tiżdied f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test.

30. Għal reċipjenti inbjank, żid ammont ekwivalenti tat-trasportatur użat biex tiddoża s-sustanza tat-test minflok soluzzjoni ewlenija, sospensjoni jew emulsjoni. Jekk is-sustanza tat-test ingħatat bl-użu ta' filtri tal-fibra tal-gass jew solventi organiċi, żid mal-inbjanki filtru jew solvent b'volum ekwivalenti li ġie evaporat. Ħejji rreplikat żejjed b'sustanza tat-test għall-kejl tal-valur tal-pH. Aġġusta l-pH għal 7 ± 0,2, jekk ikun hemm bżonn, b'ammonti żgħar ta' alkali jew aċidu minerali dilwit. L-istess ammonti ta' aġenti newtralizzanti għandhom jiżdiedu fir-reċipenti kollha tat-test. Dawn iż-żidiet ma għandhomx ikunu saru peress li l-valur tal-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza diġà jkun aġġustat (ara l-paragrafi 19 u 20). Sabiex titkejjel il-bijodegradazzjoni primarja, għandu jittieħed kampjun xieraq mir-reċipjent ta' kontroll tal-pH, jew minn reċipjent tat-test addizjonali, u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha titkejjel bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi. Fir-reċipjenti kollha jistgħu jiżdiedu kalamiti mgħottijin jekk iridu jitħawdu t-taħlitiet ta' reazzjoni (mhux bilfors).

31. Ara li l-volum totali tal-likwidu V_1 u l-volum tal-ispazju vojt fuqani V_h huma l-istess fir-reċipjenti kollha; ħu nota u rreġistra l-valuri ta' V_1 u V_h. Kull reċipjent għandu jiġi ssiġillat b'septum tal-gass u jiġi ttrasferit mill-kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26) fl-inkubatur (ara l-paragrafu 13-a).

Sustanzi tat-test insolubbli

32. Żid l-ammonti mwieżna tas-sustanzi, li ftit li xejn huma solubbli fl-ilma, direttament fir-reċipjenti mħejjin. Meta jkun hemm bżonn li jsir użu minn solvent (ara l-paragrafu 19) ittrasferixxi s-soluzzjoni tas-sustanza tat-test jew is-sospensjoni fir-reċipjenti vojta. Meta dan ikun possibbli, evapora s-solvent billi tgħaddi gass tan-nitroġenu mir-reċipjenti u mbagħad żid l-ingredjenti l-oħrajn, jiġifeiri l-ħama dilwita (paragrafu 25) u l-ilma deossiġenat kif meħtieġ. Għandu jithejja kontroll bis-solvent addizzjonali (ara l-paragrafu 19). Għal metodi oħrajn ta' kif jiżdiedu sustanzi insolubbli, jista' jiġi kkonsultat l-ISO 10634 (13). Is-sustanzi tat-test likwidi jistgħu jiġu dożati b'siringa fir-reċipjenti ssiġillati kompletament ippreparati, jekk ikun mistenni li l-pH inizjali mhijiex ser taqbeż is-7 ± 1, inkella doża kif spjegat iktar 'il fuq (ara l-paragrafu 19).

Inkubazzjoni u kejliet tal-pressjoni tal-gass

33. Inkuba r-reċipjenti mħejjin f'35 °C ± 2 °C għal madwar siegħa biex ikunu jistgħu jekwilibraw u eħles il-gass żejjed fl-atmosfera, pereżempju, billi tħeżżeż kull reċipjent għalih, billi ddaħħal il-labra tal-apparat li jkejjel il-pressjoni (paragrafu 13-c) mis-siġill u tiftaħ il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra żero. Jekk f'dan l-istadju, jew meta jsiru kejliet intermedji, il-pressjoni tal-ispazju vojt fuqani tkun inqas minn dik atmosferika, għandu jiddaħħal gass tan-nitroġenu sabiex terġa' tiġi stabbilita l-pressjoni atmosferika. Agħlaq il-valv (ara l-paragrafu 13-c) u kompli inkuba fid-dlam, billi tiżgura li l-partijiet kollha tar-reċipjenti jinżammu fit-temperatura ta' diġestjoni. Żomm ir-reċipjenti taħt osservazzjoni wara l-inkubazzjoni għal 24 sa 48 siegħa. Irrifjuta r-reċipjenti jekk il-kontenuti tar-reċipjenti juru tilwin roża distint fil-likwidu supernatanti, jiġifieri jekk ir-Resażurina (ara l-paragrafu 16) tkun bidliet il-kulur, peress li dan jindika l-preżenza ta' ossiġenu (ara l-paragrafu 50). Filwaqt li s-sistema tista' tittollera ammonti żgħar ta' ossiġenu, konċentrazzjonijiet ogħla jistgħu jxekklu serjament il-bijodegradazzjoni anaerobika. Ir-rifjut ta' reċipjent wieħed kultant minn sett ta' triplikati jista' jiġi aċċettat, iżda l-inċidenza ta' ħafna iktar rifjuti trid iġġib magħha investigazzjoni fil-proċeduri sperimentali kif ukoll ir-ripetizzjoni tat-test.

34. Ħallat il-kontenuti ta' kull reċipjent bil-galbu billi tħawwadhom u theżżiżhom għal ftit minuti tal-inqas darbtejn jew tlieta fil-ġimgħa u ftit qabel kull kejl tal-pressjoni. It-theżżiż jerġa' jissospendi l-inokulu u jiżgura ekwilibriju gassuż. Il-kejliet tal-pressjoni kollha għandhom jittieħdu malajr, peress li r-reċipjenti tat-test jistgħu jkunu soġġetti għal tnaqqis tat-temperatura, li jwassal għal qari ħażin. Matul il-kejl, il-pressjoni tar-reċipjent tat-test kollu, inkluż l-ispazju vojt fuqani, għandu jinżamm fit-temperatura ta' diġestjoni. Kejjel il-pressjoni tal-gass, pereżempju, billi ddaħħal mis-septum il-labra tas-siringa (paragrafu 13-c) imqabbda mal-apparat li jissorvelja l-pressjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat milli jidħol l-ilma fil-labra tas-siringa; jekk dan iseħħ, il-partijiet imxarrbin għandhom jiġu xxottati u titwaħħal labra ġdida. Il-pressjoni għandha titkejjel f'millibars (ara l-paragrafu 42). Il-pressjoni tal-gass fir-reċipjenti tista' titkejjel kull ċertu żmien, eż. darba fil-ġimgħa, u l-gass żejjed jista' jinħeles fl-atmosfera, iżda dan mhuwiex obbligatorju. Inkella, il-pressjoni titkejjel biss fi tmiem it-test sabiex jiġi stabbilit l-ammont ta' bijogass prodott.

35. Huwa rrakkomandat li jsir il-qari intermedju tal-pressjoni tal-gass, peress li żieda fil-pressjoni tipprovdi gwida dwar meta jista' jiġi tterminat it-test u tippermetti li tiġi segwita l-kinetika (ara l-paragrafu 6).

36. Normalment, għandek ittemm it-test wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum sakemm il-kurva ta' bijodegradazzjoni miksuba mill-kejliet tal-pressjoni ma tkunx laħqet il-fażi plateau qabel dak iż-żmien; dik hija l-fażi li fiha tkun intlaħqet id-degradazzjoni massima u l-kurva ta' bijodegradazzjoni tibqa' f'livell kostanti. Jekk il-valur tal-plateau jkun inqas minn 60 %, l-interpretazzjoni tkun diffiċli għaliex dan jindika li parti biss mill-molekola ġiet mineralizzata jew li seħħ żball. Jekk fi tmiem il-perjodu normali ta' inkubazzjoni jkun qed jiġi prodott gass iżda jkun ċar li ma ntlaħqitx fażi plateau, f'dak il-każ għandu jiġi kkunsidrat jekk jittawwalx it-test sabiex jiġi vverifikat jekk huwiex ser jintlaħaq il-plateau (> 60 %).

Kejl tal-karbonju inorganiku

37. Fi tmiem it-test wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, ħalli l-ħama toqgħod. Iftaħ kull reċipjent għalih u mill-ewwel għandek tieħu kampjun biex issib il-konċentrazzjoni (mg/l) tal-karbonju inorganiku (IC) fil-likur supernatanti. La għandha tiġi applikata ċentrifugazzjoni u lanqas filtrazzjoni għal-likur supernatanti, peress li jkun hemm telf inaċċettabbli ta' diossidu tal-karbonju dissolt. Jekk il-likur ma jkunx jista' jiġi analizzat malli jittieħed il-kampjun, aħżnu f'kunjett issiġillat, mingħajr spazju vojt fuqani u mkessaħ għal madwar 4 °C għal massimu ta' jumejn. Wara l-kejl tal-IC, kejjel u rreġistra l-valur tal-pH.

38. Inkella, l-IC fis-supernatant jista' jiġi stabbilit indirettament bil-ħlus tal-IC dissolt bħala diossidu tal-karbonju li jista' jitkejjel fl-ispazju vojt fuqani. Wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, aġġusta l-pressjoni f'kull wieħed mir-reċipjenti tat-test għall-pressjoni atmosferika. Aċidifika l-kontenut ta' kull reċipjent għal madwar pH 1 billi żżid l-aċidu minerali kkonċentrat (eż. H_2SO_4) permezz tas-septum tar-reċipjenti ssiġillati). Inkuba r-reċipjenti mheżżin f'35 °C ± 2 °C għal madwar 24 siegħa u kejjel il-pressjoni tal-gass li tirriżulta mid-diossidu tal-karbonju evolut billi tuża l-apparat li jkejjel il-pressjoni.

39. Agħmel qari simili għas-sustanza inbjank ta' referenza korrispondenti u, jekk inklużi, ir-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni (ara l-paragrafu 21).

40. F'ċerti każijiet, speċjalment jekk jintużaw l-istess reċipjenti tal-kontroll għal bosta sustanzi tat-test, il-kejliet tal-konċentrazzjonijiet intermedji tal-IC fir-reċipjenti tat-test u tal-kontroll għandhom jiġu kkunsidrati, kif ikun xieraq. F'dan il-każ, għandu jitħejja numru suffiċjenti ta' reċipjenti għall-kejliet intermedji kollha. Dan il-proċediment huwa ppreferut milli meta jittieħdu l-kampjuni kollha minn reċipjent wieħed biss. Dan tal-aħħar jista' jsir biss jekk il-volum meħtieġ għall-analiżi tad-DIC ma jitqiesx li jkun għoli wisq. Il-kejl tad-DIC għandu jsir wara li titkejjel il-pressjoni tal-gass mingħajr ma jinħeles il-gass eċċessiv kif deskritt hawn taħt:

— ħu l-iżgħar volum possibbli ta' kampjuni ta' supernatant b'siringa mis-septum bla ma tiftaħ ir-reċipjenti sabiex jiġi stabbilit l-IC fil-kampjun;

— wara li tieħu l-kampjun jinħeles jew ma jinħelisx il-gass eċċessiv;

— għandu jitqies li anki tnaqqis żgħir fil-volum tas-supernatant (eż. madwar 1 %) jista' jikkaġuna żieda sinifikanti fil-volum tal-gass tal-ispazju vojt fuqani (V_h);

— l-ekwazzjonijiet (ara l-paragrafu 44) huma kkoreġuti billi jiżdied V_h fl-ekwazzjoni 3, skont kif ikun meħtieġ.

Analiżijiet speċifiċi

41. Jekk trid tiġi stabbilita degradazzjoni anaerobika primarja (ara l-paragrafu 30), ħu volum xieraq tal-kampjun għal analiżijiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test mir-reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test. Jekk isir hekk, kun af li l-volumi tal-ispazju vojt fuqani (V_h) u tal-likwidu (V_l) ser jinbidlu u dan għandek tikkunsidrah meta tikkalkola r-riżultati tal-produzzjoni tal-gass. Inkella, jistgħu jittieħdu kampjuni għal analiżijiet speċifiċi mit-taħlitiet addizzjonali li qabel ġew stabbiliti għal dan il-għan (paragrafu 30).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

42. Għal raġunijiet prattiċi, il-pressjoni tal-gass titkejjel f'millibars (1 mbar = 1h Pa = 102 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), il-volum f'litri u t-temperatura fi gradi Celsius.

Karbonju fl-ispazju vojt fuqani

43. Peress li 1 mol tal-metan u 1 mol tad-diossidu tal-karbonju fihom 12-il g karbonju, il-massa tal-karbonju f'volum partikolari ta' gass evolut tista' tingħata bħala:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

fejn:

m = il-massa ta' karbonju (mg) f'volum partikolari ta' gass evolut;

12 = il-massa atomika relattiva ta' karbonju;

n = in-numru ta' moli ta' gass fil-volum partikolari.

Jekk gass li mhuwiex metan jew diossidu tal-karbonju (eż. N_2O) jiġi ġġenerat f'ammonti konsiderevoli, il-formula [1] għandha tiġi emendata sabiex tiġi deskritta l-possibbiltà ta' effetti mill-gassijiet iġġenerati.

44. Mil-liġijiet tal-gass *n* jista' jingħata bħala:

$$n = \frac{pV}{RT} \qquad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

p = il-pressjoni tal-gass (Pascals);

V = il-volum tal-gass (m^3);

R = il-kostanti tal-gass molari [8,314J/(mol K)];

T = it-temperatura ta' inkubazzjoni (Kelvins).

Bit-tagħqid tal-ekwazzjonijiet [1] u [2] u r-razzjonalizzazzjoni sabiex tkun tista' ssir produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \qquad \text{Ekwazzjoni [3]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojt fuqani (mg);

D*p* = il-medja tad-differenza bejn il-pressjonijiet inizjali u finali fir-reċipjenti tat-test neqes il-medja korrispondenti fir-reċipjenti inbjank (millibars);

V_h = il-volum tal-ispazju vojt fuqani fir-reċipjent (l);

0,1 = il-konverżjoni kemm minn newtons/m^2 għal millibars kif ukoll minn m^3 għal litri.

L-ekwazzjoni [4] għandha tintuża għat-temperatura normali ta' inkubazzjoni ta' 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Ekwazzjoni [4]}$$

Nota: Kalkolu tal-volum alternattiv. Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jiġi kkonvertit f'ml ta' gass prodott bl-użu tal-kurva standard iġġenerata permezz tal-plot tal-volum (ml) injettat kontra l-qari tal-apparat li jkejjel (Appendiċi 2). In-numru ta' moli (n) ta' gass fl-ispazju vojt fuqani ta' kull reċipjent huwa kkalkolat billi tiġi diviża l-produzzjoni ta' gass kumulattiva (ml) b'25 286 ml/mol, li huwa l-volum okkupat minn mol wieħed ta' gass f'35 °C u pressjoni atmosferika standard. Peress li mol 1 ta' CH_4 u mol 1 ta' CO_2 fihom 12 g karbonju, l-ammont ta' karbonju (mg) fl-ispazju vojt fuqani (m_h) jinkiseb bl-ekwazzjoni [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Ekwazzjoni [5]}$$

Razzjonalizzazzjoni li tipprovdi għall-produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Ekwazzjoni [6]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojt fuqani (mg);

DV = il-medja tad-differenza bejn il-volum ta' gass prodott fl-ispazju vojt fuqani fir-reċipjenti tat-test u r-reċipjenti tal-kontroll inbjank;

25 286 = il-volum okkupat minn gass tal-mol 1 35 °C, atmosfera 1.

45. Kif mexiet il-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi tiġi pplottjata ż-żieda kumulata tal-pressjoni D*p* (millibars) kontra ż-żmien, jekk xieraq. Minn din il-kurva, identifika u rreġistra l-fażi ta' dewmien (jiem). Il-fażi ta' dewmien hija ż-żmien mill-bidu tat-test sakemm tibda degradazzjoni sinifikanti (pereżempju ara l-Appendiċi 3). Jekk il-kampjuni intermedji tas-supernatant ittieħdu u ġew analizzati (ara l-paragrafi 40, 46 u 47), f'dak il-każ jista' jiġi pplottjat is-C totali prodott (f'gass flimkien ma' dak f'likwidu) minflok il-pressjoni kumulattiva biss.

Karbonju fil-likwidu

46. L-ammont ta' metan fil-likwidu huwa injorat peress li huwa magħruf li s-solubilità tiegħu fl-ilma hija baxxa ħafna. Ikkalkola l-massa ta' karbonju organiku fil-likwidu tar-reċipjenti tat-test billi tuża l-ekwazzjoni [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Ekwazzjoni [7]}$$

fejn:

m_l = il-massa ta' karbonju inorganiku fil-likwidu (mg);

C_{net} = il-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku fir-reċipjenti tat-test neqes dik fir-reċipjenti tal-kontroll fi tmiem it-test (mg/l);

V_l = il-volum ta' likwidu fir-reċipjenti tat-test (l).

Karbonju gassifikat totali

47. Ikkalkola l-massa totali ta' karbonju gassifikat fir-reċipjent bl-użu tal-ekwazzjoni [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Ekwazzjoni [8]}$$

fejn:

m_t = il-massa totali ta' karbonju gassifikat (mg);

m_h u m_l huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Karbonju tas-sustanza tat-test

48. Ikkalkola l-massa ta' karbonju fir-reċipjenti tat-test derivata mis-sustanza tat-test miżjuda bl-użu tal-ekwazzjoni [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Ekwazzjoni [9]}$$

fejn:

m_v = il-massa ta' karbonju tas-sustanza tat-test (mg);

C_c = il-konċentrazzjoni tal-karbonju tas-sustanza tat-test fir-reċipjent tat-test (mg/l)

V_l = il-volum ta' likwidu fir-reċipjenti tat-test (l).

Firxa tal-bijodegradazzjoni

49. Ikkalkola l-bijodegradazzjoni perċentwali mill-gass tal-ispazju vojt fuqani billi tuża l-ekwazzjoni [10] u l-bijodegradazzjoni perċentwali totali billi tuża l-ekwazzjoni [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [11]}$$

fejn:

D_h = il-bijodegradazzjoni mill-gass tal-ispazju vojt fuqani (%);

D_t = il-bijodegradazzjoni totali (%);

m_h, m_v u m_t huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Il-grad ta' bijodegradazzjoni primarja huwa kkalkolat mill-kejliet (mhux obbligatorji) tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem l-inkubazzjoni, bl-użu tal-ekwazzjoni [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [12]}$$

fejn:

D_p = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_i = il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test (mg/l);

S_e = il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fi tmiem (mg/l).

Jekk il-metodu ta' analiżi jindika konċentrazzjonijiet sinifikanti tas-sustanza tat-test fl-inokulu tal-ħama anaerobika mhux emendat, uża l-ekwazzjoni [13]:

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

fejn:

D_p^{1} = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_{ib} = il-konċentrazzjoni inizjali 'apparenti' tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank (mg/l);

S_{eb} = il-konċentrazzjoni 'apparenti' tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank fi tmiem (mg/l).

Validità tar-riżultati

50. Il-qari tal-pressjoni għandu jintuża biss minn reċipjenti li ma jurux tilwin roża (ara l-paragrafu 33). Il-kontaminazzjoni bl-ossiġenu tiġi minimizzata bl-użu ta' tekniki xierqa ta' tqandil anaerobiku.

51. Għandu jiġi kkunsidrat li t-test huwa validu jekk is-sustanza ta' referenza tilħaq plateau li tirrappreżenta bijodegradazzjoni ta' iktar minn 60 % ([1]).

52. Jekk il-pH fi tmiem it-test tkun qabżet il-medda ta' 7 ± 1 u tkun seħħet bijodegradazzjoni insuffiċjenti, irrepeti t-test b'kapaċità ikbar ta' bafer tal-midjum.

([1]) Dan għandu jerġa' jiġi evalwat jekk ikunu inklużi sustanzi kimiċi ta' referenza assobenti u insolubbli.

Inibizzjoni tad-degradazzjoni

53. Il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom kemm is-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza għandha tkun tal-inqas daqs dik fir-reċipjenti li fihom biss sustanza ta' referenza; inkella tiġi indikata l-inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass. F'ċerti każijiet, il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test mingħajr is-sustanza ta' referenza tkun inqas minn dik fil-kontrolli inbjank, u dan jindika li s-sustanza tat-test hija inibitorja.

Rapport tat-test

54. Ir-rapport tat-test irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, in-numru tas-CAS, il-formula strutturali u l-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti;

— il-purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-volumi ta' likur diġestitur dilwit (V_l) u tal-ispazju vojt fuqani (V_h) fir-reċipjent;

— deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test, il-karatteristiċi ewlenin tal-kejl tal-bijogass (eż. it-tip ta' apparat li jkejjel il-pressjoni) u tal-analizzatur tal-IC;

— l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għas-sistema tat-test: il-konċentrazzjoni tat-test użata u kwalunkwe użu ta' solventi;

— dettalji dwar l-inokulu użat: l-isem tal-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. it-temperatura operazzjonali, il-ħin ta' żamma tal-ħama, predominanza domestika, eċċ.), il-konċentrazzjoni, kwalunkwe informazzjoni meħtieġa biex tiġi sostanzjata u informazzjoni dwar kwalunkwe pretrattament tal-inokulu (eż. prediġestjoni, preespożizzjoni);

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— in-numru ta' rreplikati.

Riżultati:

— il-pH u l-valuri tal-IC fi tmiem it-test;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test, jekk ikun sar kejl speċifiku.

— id-dejta kollha mkejla miġbura fis-sustanza tat-test, inbjank u ta' referenza u r-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni, kif xieraq (eż. il-pressjoni f'millibars, il-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku (mg/l)) f'forma tabulari (dejta mkejla għall-ispazju vojt fuqani u l-likwidu għandha tiġi rrapportata b'mod separat);

— it-trattament statistiku tad-dejta, id-durata tat-test u dijagramma tal-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-kontroll tal-inibizzjoni;

— il-bijodegradazzjoni perċentwali tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza;

— ir-raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

(1) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:

C.4, Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità Lesta;

C.9, Bijodegradazzjoni — Test ta' Zahn-Wellens;

C.10, Test ta' Simulazzjoni — Trattament tad-Drenaġġ Aerobiku:

A: Unitajiet tal-Ħama Attivata, B: Bijofilms

C.11, Bijodegradazzjoni — Inibizzjoni tar-respirazzjoni tal-ħama attivata

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

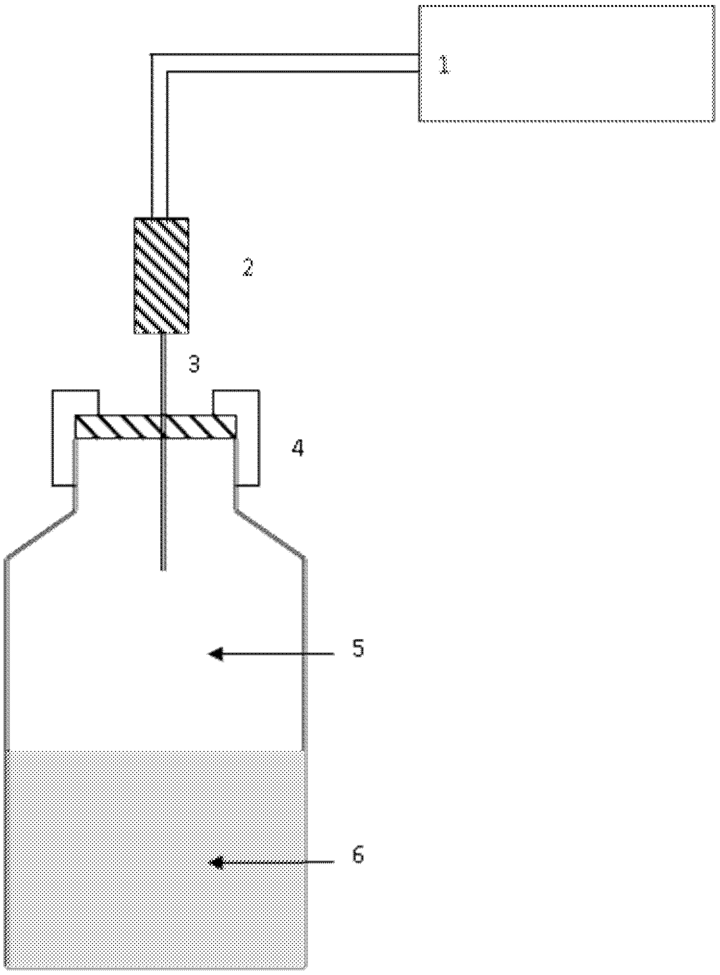
(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

Appendiċi 1

Eżempju ta' apparat li jkejjel il-produzzjoni tal-bijogass bil-pressjoni tal-gass



Leġġenda:

1 — Apparat li jkejjel il-pressjoni

2 — Valv issiġillat għall-gass tridirezzjonali

3 — Labra tas-siringa

4 — Siġill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)

5 — Spazju fil-wiċċ (V_h)

6 — Inokulu ta' ħama diġerita (V_l)

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' 35 °C ± 2 °C

Appendiċi 2

Konverżjoni tal-apparat li jkejjel il-pressjoni

Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jkun marbut mal-volumi tal-gass peremzz ta' kurva standard prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' arja ta' 35 °C ± 2 °C fil-fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma daqs dak tat-taħlita tar-reazzjoni, V_R:

— Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f'35 °C ± 2 °C f'ħames fliexken tas-serum. Issiġilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C sabiex jekwilibraw;

— Ixgħel il-miter tal-pressjoni, ħallih jistabbilizza, u aġġusta għal żero;

— Daħħal il-labra tas-siringa minn ġos-siġill ta' wieħed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra żero u agħlaq il-valv;

— Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;

— Injetta 1 ml arja f'35 °C ± 2 °C f'kull flixkun. Daħħal il-labra (fuq il-miter) mis-siġill ta' wieħed mill-fliexken u ħalli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni tinqara żero u mbagħad agħlaq il-valv;

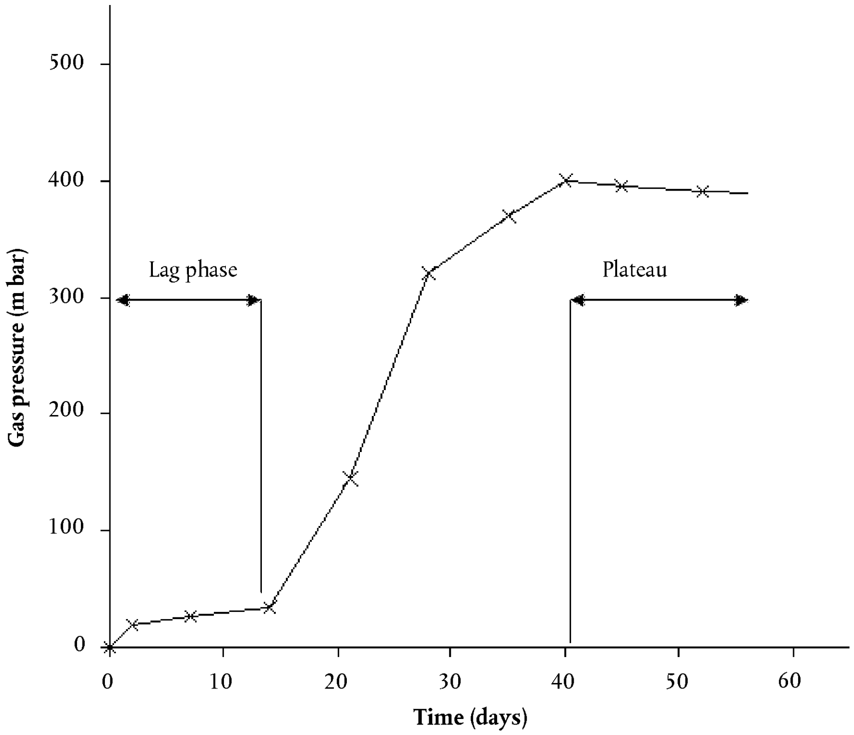
— Irrepeti l-proċedura għall-fliexken li jfidal;

— Irrepeti l-proċedura sħiħa ta' hawn fuq billi tuża 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml u 50 ml arja;

— Ipplottja kurva tal-konverżjoni tal-pressjoni (Pa) kontra l-volum ta' gass injettat Vb (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari tul il-medda bejn 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml tal-produzzjoni tal-gass.

Appendiċi 3

Eżempju ta' kurva ta' degradazzjoni (żieda fil-pressjoni netta kumulattiva)



Appendiċi 4

Eżempju ta' skedi ta' dejta għat-test ta' bijodegradazzjoni anaerobika — skeda ta' dejta għas-sustanza tat-test

Laboratorju: .... Sustanza tat-test: .... Nru tat-Test: ....

Temperatura tat-test: (°C): .... Volum tal-ispazju vojt fuqani (V_h): .... (l) Volum ta' likwidu (V_l): .... (l)

Karbonju fis-sustanza tal-ittestjar $C_{c,v}$: .... (mg/l) m_v (1): .... (mg)

Jum	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) medja (mbar)	p_4 (inbjank) (mbar)	p_5 (inbjank) (mbar)	p_6 (inbjank) (mbar)	p (inbjank) medja (mbar)	p (nett) test — in-bjank medja (mbar)	Δp (nett) Kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojt fuqani (2) (mg)	D_h Bijodegra-dazzjoni (3) (%)
	$C_{IC, 1}$ test (mg)	$C_{IC, 2}$ test (mg)	$C_{IC, 3}$ test (mg)	C_{IC} medja tat-test (mg)	$C_{IC, 4}$ inbjank (mg)	$C_{IC, 5}$ inbjank (mg)	$C_{IC, 6}$ inbjank (mg)	C_{IC} medja in-bjank (mg)	$C_{IC, net}$ test -in-bjank medja (mg)	m_l C fil-lik-widu (4) (mg)	m_t C totali (5) (mg)	D_t Bijodegra-dazzjoni (6) (%)
IC (tmiem)												
pH (tmiem)												

(1) Karbonju fir-reċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

(2) Karbonju fl-ispazju vojt fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

(3) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojt fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

(4) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

(5) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t + m_l$

(6) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $Dt = (m_t \times 100)/m_v$

Laboratorju: .... Sustanza ta' referenza: .... Nru tat-test: ....

Temperatura tat-test: (°C): .... Volum tal-ispazju vojt fuqani (V_h): .... (l) Volum ta' likwidu (V_l) (litri): ....

Karbonju fis-sustanza ta' referenza $C_{c,v}$ (mg/l): .... m_v (1) (mg): ....

Jum	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) medja (mbar)	p_4 (inib.) (mbar)	p_5 (inib.) (mbar)	p_6 (inib.) (mbar)	p (inib.) medja (mbar)	p (ref.) ref. — in-bjank (mbar)	Δp (ref.) kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojt fuqani (2) (mg)	D_h Bijodegradazzjoni (3) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} medja tar-ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inib. (mg)	C_{IC} medja ta' inib. (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. — inib. (mg)	m_l C fil-likwidu (4) (mg)	m_t C totali (5) (mg)	D_t Bijodegradazzjoni (6) (%)
IC (tmiem)												
pH (tmiem)												

(1) Karbonju fir-reċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

(2) Karbonju fl-ispazju vojt fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0,468\ \Delta p \times V_h$

(3) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojt fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(4) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

(5) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t + m_l$

(6) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

C.44. **LISSIJA F'KOLONNI TAL-ĦAMRIJA**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 312 tal-OECD (2004). Is-sustanzi kimiċi magħmulin mill-bniedem jistgħu jaslu fil-ħamrija direttament permezz ta' applikazzjoni deliberata (eż. agrikimiki) jew permezz ta' rotot indiretti (eż. permezz ta' ilma mormi → ħama tad-drenaġġ → ħamrija jew arja → depożitu mxarrab/xott). Għal valutazzjoni tar-riskju ta' dawn is-sustanzi kimiċi, importanti li jiġi stmat il-potenzjal tagħhom li jittrasformaw f'ħamrija u għal ċaqliq (lissija) f'saffi iktar fondi tal-ħamrija u eventwalment f'ilma ta' taħt l-art.

2. Hemm bosta metodi għad-dispożizzjoni sabiex jitkejjel il-potenzjal ta' lissija tas-sustanzi kimiċi fil-ħamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati, jiġifieri kromatografija b'saff baxx tal-ħamrija, kromatografija b'saff għoli tal-ħamrija, kromatografija tal-kolonna tal-ħamrija, u kejliet tal-assorbiment — disorbiment (1) (2). Għal sustanzi kimiċi mhux jonizzati, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-n-ottanol-ilma (P_{ow}) jippermetti li tinħareġ stima bikrija tal-potenzjal ta' assorbiment u lissija tagħhom (3)(4)(5).

3. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq kromatografija tal-kolonna tal-ħamrija fil-ħamrija disturbata (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni). Isiru żewġ tipi ta' esperimenti sabiex jiġu stabbiliti (i) il-potenzjal ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test, u (ii) il-potenzjal ta' lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni (studju b'residwi li tħallew jiqdiemu) f'ħamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati ([1]). Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq metodi eżistenti (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. F'sessjoni ta' ħidma tal-OECD dwar l-għażla tal-ħamrija/in-naqal, li saret f'Belgirate, l-Italja, fl-1995 (12) intlaħaq qbil fuq in-numru u t-tipi ta' ħamrija li għandhom jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar. Saru wkoll rakkomandazzjonijiet dwar it-teħid, it-tqandil u l-ħżin tal-kampjuni tal-ħamrija għall-esperimenti tal-lissija.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Kolonni magħmulin minn materjal inerti xieraq (eż. ħġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) huma ppakkjati bil-ħamrija u wara jiġu saturati u ekwilibrati b'soluzzjoni ta' 'xita artifiċjali' (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) u titħalla titbattal. Imbagħad, il-wiċċ ta' kull kolonna jiġi ttrattat bis-sustanza kimika tat-test u/jew b'residwi li jitħallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad tiġi applikata xita artifiċjali għall-kolonni tal-ħamrija u tinġabar il-lissija. Wara l-proċess ta' lissija, il-ħamrija titneħħa mill-kolonni u titqassam f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju. Imbagħad, kull segment tal-ħamrija u l-lissija jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti ta' trasformazzjoni jew sustanzi kimiċi oħrajn ta' interess.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi tat-test (mhux ittikketti jew radjutikkettati: eż.^{14}C) li għalihom hemm disponibbli metodu analitiku bi preċiżjoni u sensittività suffiċjenti. Il-metodu ta' ttestjar għandu jiġi applikat għas-sustanzi kimiċi li huma volatili mill-ħamrija u l-ilma u b'hekk ma jibqgux fil-ħamrija u/jew lissija fil-kundizzjonijiet sperimentali ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Sustanzi kimiċi tat-test mhux ittikketti jew radjutikkettati jistgħu jintużaw sabiex titkejjel l-imġiba tal-lissija fil-kolonni tal-ħamrija. Materjal radjutikkettat huwa meħtieġ sabiex tiġi studjata l-lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni (residwi li jitħallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test) u għad-determinazzjonijiet tal-bilanċ tal-massa.^{14}C-tikkettar huwa rrakkomandat iżda isotopi oħrajn, bħal ^{13}C,^{15}N,^{3}H,^{32}P, jistgħu jkunu siewja. Kemm jista' jkun, it-tikketta għandha titqiegħed fl-iktar parti(jiet) stabbli tal-molekola. Il-purità tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun tal-inqas 95 %.

8. Ħafna mis-sustanzi kimiċi għandhom jiġu applikati bħala sustanza waħda. Madankollu, għal sustanzi attivi fil-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, jistgħu jintużaw prodotti fformulati sabiex tiġi studjata l-lissija tas-sustanza tat-test prinċipali iżda l-ittestjar tagħhom huwa meħtieġ b'mod partikolari meta t-taħlita jkollha probabbiltà li taffettwa r-rata ta' ħlus (eż. formulazzjonijiet bi ħlus ikkontrollat jew granulari). Rigward rekwiżiti speċifiċi għat-taħlita għad-disinn tat-test, jista' jkun siewi li tiġi kkonsultata l-awtorità regolatorja qabel ma jsir it-test. Għal studji dwar il-lissija tar-residwu li jitħalla jiqdiem, għandha tintuża s-sustanza tat-test prinċipali pura.

([1]) L-istudji ta' lixxivjazzjoni tal-kolonna bi prodotti għall-protezzjoni tal-għelejjel jistgħu jipprovdu informazzjoni dwar il-mobilità dwar sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha u jistgħu jissuplimentaw studji dwar is-sorbiment tal-lott.

9. Qabel ma jsiru testijiet tal-lissija fil-kolonni tal-ħamrija, idealment għandu jkun hemm disponibbli l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:

(1) [il-metodu ta' ttestjar A.6] tas-solubilità fl-ilma (13);

(2) is-solubilità f'solventi organiċi;

(3) [il-metodu ta' ttestjar A.4] tal-pressjoni tal-fwar (13) u l-kostanti tal-Liġi ta' Henry;

(4) [il-metodi ta' ttestjar A.8 u A.24] tal-koeffiċjent ta' partizzjoni n-ottanol/ilma (13);

(5) il-metodi ta' ttestjar C.18 u/jew C.19 tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_d, K_f or K_{OC}) (13);

(6) idroliżi [metodu ta' ttestjar C.7] (13);

(7) kostanti ta' dissoċjazzjoni (pK_a) [OECD TG 112] (25);

(8) trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija [metodu ta' ttestjar C.23] (13)

Nota: It-temperatura li fiha saru dawn il-kejliet għandha tiġi rrapportata fir-rapporti tat-test rispettivi.

10. L-ammont tas-sustanza kimika applikata għall-kolonni tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed biex tal-inqas tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi kimiċi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, l-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikat jista' jikkorrispondi għar-rata massima rakkomandata ta' użu (applikazzjoni waħda).

11. Irid ikun hemm disponibbli metodu analitiku xieraq b'reqqa, preċiżjoni u sensittività magħrufin għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u, jekk relevanti, tal-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha fil-ħamrija u l-lissija. Il-limitu ta' detezzjoni analitika għas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni sinifikanti tagħha (normalment tal-inqas il-prodotti ta' trasformazzjoni kollha ≥ 10 % tad-doża applikata osservata fl-istudji tal-passaġġ tat-trasformazzjoni, iżda idealment kwalunkwe prodott ta' trasformazzjoni ta' tħassib) għandu jkun magħruf ukoll (ara l-paragrafu 17).

SUSTANZI KIMIĊI TA' REFERENZA

12. Sustanzi kimiċi ta' referenza b'imġiba ta' lissija magħrufa bħal atrażina jew monuron li jistgħu jitqiesu bħala lissiji moderati fl-għalqa għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-mobilità relattiva tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija (1)(8)(11). Sustanza kimika ta' referenza polari mhux sorbenti u mhux degradabbli (eż. titrju, bromur, fluworosseina, eożina) sabiex jiġi traċċat il-moviment tal-ilma fil-kolonna jista' jkun siewi wkoll sabiex jiġu kkonfermati l-karatteristiċi idrodinamiċi fil-kolonna tal-ħamrija.

13. Is-sustanzi kimiċi standard analitiċi jistgħu jkunu siewja wkoll għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni misjubin fis-segmenti tal-ħamrija u fil-lissiji permezz ta' metodi kromatografiċi, spettroskopiċi jew oħrajn relevanti.

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

14. Ara l-Appendiċi 1.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

Irkupru

15. Is-somma tal-perċentwali tas-sustanza kimika tat-test misjuba fis-segmenti tal-ħamrija u l-lissija tal-kolonna wara li l-lissija tagħti l-irkupru għal esperiment tal-lissija. L-irkupri għandhom ivarjaw minn 90 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi radjutikkettati (11) u minn 70 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi mhux ittikkettati (8).

Repetibilità u sensittività tal-metodu analitiku

16. Ir-repetibilità tal-metodu analitiku sabiex jiġu kkwantifikati s-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tista' tiġi vverifikata b'analiżi tad-duplikat tal-istess estratt ta' segment tal-ħamrija jew ta' lissija (ara l-paragrafu 11).

17. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) tal-metodu analitiku għas-sustanza kimika tat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 0,01 mg · kg^{-1} f'kull segment tal-ħamrija jew lissija (bħala sustanza kimika tat-test) jew 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment wieħed li jkun l-inqas. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għandu jkun speċifikat ukoll.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Sistema ta' ttestjar

18. Għat-test jintużaw kolonni ta' lissija (li jistgħu jinqatgħu jew le) magħmulin minn materjal inerti kif xieraq (eż. ħġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) b'dijametru intern ta' tal-inqas 4 cm u għoli minimu ta' 35 cm. Il-materjali tal-kolonni għandhom jiġu ttestjati għal interazzjonijiet potenzjali mas-sustanza kimika tat-test u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha. Eżempji ta' kolonni li jistgħu jinqatgħu u dawk li ma jistgħux jinqatgħu jintwerew fl-Appendiċi 2.

19. Għall-mili u l-impakkettar tal-kolonni tal-ħamrija jintużaw mgħarfa, pompa u apparat tal-vibrazzjoni.

20. Għall-applikazzjoni tax-xita artifiċjali għall-kolonni tal-ħamrija, jistgħu jintużaw pompi peristaltiċi jew bil-pistuni, showering heads, fliexken Mariotte jew sempliċi lenbut bi fluss kontrollat.

Tagħmir tal-laboratorju u sustanzi kimiċi

21. Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, b'mod partikolari dan li ġej:

(1) strumenti analitiċi bħal tagħmir tal-GLC, HPLC u TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' detezzjoni għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi ttikkettati jew mhux ittikkettati jew metodu ta' dilwizzjoni tal-isotopi inversi;

(2) strumenti għal skopijiet ta' identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

(3) kontatur tax-xintillar likwidu għal sustanza kimika tat-test radjuttikkettata;

(4) ossidizzant għall-kombustjoni ta' materjal ittikkettat;

(5) apparat ta' estrazzjoni (pereżempju, tubi ta' ċentrifugi għal estrazzjoni fil-kesħa u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taħt rifluss);

(6) strumentazzjoni għall-konċentrazzjoni ta' soluzzjonijiet u estratti (eż. evaporatur rotanti).

22. Is-sustanzi kimiċi użati jinkludu: solventi, grad analitiku, bħal aċetun, metanol, eċċ.; xintillar likwidu; soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew dejonizzat (= xita artifiċjali).

Sustanza kimika tat-test

23. Biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-kolonna tal-ħamrija, din għandha tiġi dissolta fl-ilma (dejonizzata jew distillata). Jekk is-sustanza kimika tat-test ftit li xejn hija solubbli fl-ilma, tista' tiġi applikata jew bħala prodott ifformulat (jekk hemm bżonn wara sospensjoni jew emulsifikazzjoni fl-ilma) jew f'xi solvent organiku. F'każ li jintuża solvent organiku, għandu jinżamm għall-minimu u għandu jiġi evaporat mill-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija qabel ma tinbeda l-proċedura ta' lissija. Formulazzjonijiet solidi, bħal granuli, għandhom jiġu applikati fil-forma solida mingħajr ilma; biex tkun tista' ssir distribuzzjoni aħjar tul il-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija, il-prodott ifformulat jista' jitħallat ma' ammont żgħir ta' ramel kwarzuż (eż. 1 g) qabel l-applikazzjoni.

24. L-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-kolonni tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed sabiex tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan jista' jkun ibbażat fuq rata ta' użu massima rrakkomandata (rata ta' applikazzjoni unika) u, kemm għal lissija prinċipali u li tħalliet tiqdiem, għandu jkun marbut mal-erja tas-superfiċje tal-kolonna tal-ħamrija użata ([1]).

([1]) L-ammont li jrid jiġi applikat għall-kolonni tal-ħamrija ċilindrika jista' jiġi kkalkolat bil-formula li ġejja:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9\,[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8\,[cm^2/ha] \cdot 4}$$

fejn:
M = l-ammont applikat għal kull kolonna [μg]
A = ir-rata ta' applikazzjoni [kg · ha^{-1}]
d = id-dijametru tal-kolonna tal-ħamrija [cm]
π = 3,14

Sustanza kimika ta' referenza

25. Għandha tintuża sustanza kimika ta' referenza fl-esperimenti tal-lissija (ara l-paragrafu 12). Għandha tiġi applikata għall-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija b'mod simili bħas-sustanza kimika tat-test u b'rata xierqa li tippermetti detezzjoni adegwata jew bħala standard intern flimkien mas-sustanza kimika tat-test fuq l-istess kolonna tal-ħamrija jew inkella waħedha fuq kolonna tal-ħamrija separata. Idealment iż-żewġ sustanzi kimiċi jiġu applikati fuq l-istess kolonna, għajr meta ż-żewġ sustanzi kimiċi jkunu ttikkettati b'mod simili.

Ħamrija

Għażla tal-ħamrija

26. Għal studji dwar il-lissija bis-sustanza kimika tat-test prinċipali għandhom jintużaw 3 sa 4 ħamrija b'pH, kontenut ta' karbonju organiku u sawra varjanti (12). Fit-Tabella 1 ta' hawn taħt tingħata gwida għall-għażla ta' ħamrija għall-esperimenti ta' lissija. Għal sustanzi kimiċi tat-test jonizzabbli, il-ħamrija magħżulin għandhom ikopru firxa wiesgħa ta' pH, sabiex tiġi evalwata l-mobilità tas-sustanza kimika fil-forom jonizzati u mhux jonizzati tagħha; tal-inqas 3 ħamrija għandu jkollhom pH li fiha s-sustanza kimika tat-test tkun fil-forma mobbli tagħha.

Tabella 1

Gwida għall-għażla ta' ħamrija għal studji dwar il-lissija

Nru tal-Ħamrija	Valur tal-pH	Karbonju organiku %	Kontenut ta' tafal %	Sawra (*)
1	> 7,5	3,5 — 5,0	20 — 40	lom tat-tafal
2	5,5 — 7,0	1,5 — 3,0	15 — 25	lom tal-fajd
3	4,0 — 5,5	3,0 — 4,0	15 — 30	lom
4	< 4,0 — 6,0 §	< 0,5 — 1,5 § ‡	< 10 — 15 §	ramel grass
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ramel grass/ramel

(*) Skont is-sistemi tal-FAO u l-USDA (14).
§ Idealment, il-varjabbli rispettivi għandhom juru valuri li jaqgħu fi ħdan il-medda mogħtija. Madankollu, jekk ikun hemm diffikultajiet fis-sejbien tal-materjal tal-ħamrija xieraq, jiġu aċċettati valuri inqas mill-minimu indikat.
‡ Ħamrija b'karbonju organiku ta' inqas minn 0,3 % jistgħu jxekklu l-korrelazzjoni bejn kontenut organiku u assorbiment. B'hekk, huwa rrakkomandat li jintużaw ħamrija b'kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.
# Ħamrija b'kontenut ta' karbonju għoli ħafna (eż. > 10 %) jaf ma jkunux legalment aċċettabbli eż. għal finijiet ta' reġistrazzjoni tal-pestiċidi.

27. Kultant jistgħu jkunu meħtieġa tipi oħrajn ta' ħamrija sabiex jirrappreżentaw reġjuni iktar kesħin, sħan u tropikali. Għaldaqstant, jekk ikunu ppreferiti tipi oħrajn ta' ħamrija, għandhom jiġu kkaratterizzati bl-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjonijiet simili bħal dawk deskritti fil-gwida għall-għażla tal-ħamrija għal studji dwar il-lissija (ara t-Tabella 1 iktar 'il fuq), anki jekk ma jkunux jaqblu mal-kriterji bl-eżatt.

28. Għall-istudji dwar il-lissija b''residwi li tħallew jiqdiemu', għandha tintuża ħamrija waħda (12). Għandu jkollha kontenut ta' ramel ta' > 70 % u kontenut ta' karbonju organiku ta' bejn 0,5 — 1,5 % (eż. Nru tal-ħamrija 4 fit-Tabella 1). Jista' jkun hemm bżonn li jintużaw iktar minn tip wieħed ta' ħamrija jekk id-dejta dwar il-prodotti ta' trasformazzjoni tkun importanti.

29. Il-ħamrija kollha għandhom ikunu kkaratterizzati tal-inqas għas-sawra [% ramel, % fajd, % tafal skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-FAO u l-USDA (14)], il-pH, il-kapaċità ta' skambju ta' katjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku, id-densità grossa (għal ħamrija disturbata) u l-kapaċità ta' felħan ta' ilma. Il-kejl tal-bijomassa mikrobjali huwa meħtieġ biss għall-ħamrija li tintuża fil-perjodu ta' inkubazzjoni/li fih titħalla tiqdiem imwettaq wara l-esperiment ta' lissija li titħalla titqdiem. Informazzjoni dwar karatteristiċi addizzjonali tal-ħamrija (eż. klassifikazzjoni tal-ħamrija, mineraloġija tat-tafal, erja tas-superfiċje speċifika) tista' tkun siewja sabiex jiġu interpretati r-riżultati ta' dan l-istudju. Sabiex jiġu stabbiliti l-karatteristiċi tal-ħamrija, jistgħu jintużaw il-metodu rrakkomandati fir-referenzi (15)(16)(17)(18)(19).

Il-ġbir u l-ħżin tal-ħamrija

30. Il-ħamrija għandhom jittieħdu mis-saff ta' fuq (orizzont-A) sa fond massimu ta' 20 cm. Il-fdalijiet ta' veġetazzjoni, makrofawna u iġbla għandhom jitneħħew. Il-ħamrija (ħlief dawk użati biex is-sustanza kimika tat-test titħalla tiqdiem) jitnixxu bl-arja f'temperatura tal-kamra (idealment bejn 20-25 °C). Id-disaggregazzjoni għandha ssir b'saħħa minima, sabiex is-sawra orġinali tal-ħamrija tinbidel bl-inqas mod possibbli. Il-ħamrija huma mgħarbula minn passatur ta' ≤ 2 mm. Hija rrakkomandata omoġenizzazzjoni bir-reqqa, peress li din issaħħaħ ir-riproduċibilità tar-riżultati. Qabel ma jintużaw, il-ħamrija jistgħu jinħażnu f'temperatura ambjentali u jitnixxfu bl-arja (12). Ma huwa rrakkomandat ebda limitu iżda l-ħamrija maħżunin għal iktar minn 3 snin għandhom jerġgħu jiġu analizzati qabel ma jintużaw fir-rigward tal-kontenut ta' karbonju organiku u l-pH tagħhom.

31. Għandu jkun hemm għad-dispożizzjoni informazzjoni ddettaljata dwar l-istorja tas-siti tal-għelieqi mnejn jinġabru l-ħamrija tat-test. Id-dettalji jinkludu l-post eżatt [iddefiniti bl-eżatt mill-UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) jew il-koordinati ġeografiċi], il-kopertura tal-veġetazzjoni, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u inorganiċi, żidiet ta' materjali bijoloġiċi jew kontaminazzjoni inċidentali (12). Jekk il-ħamrija tiġi ttrattata bis-sustanza kimika tat-test jew l-analogi strutturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, dawn il-ħamrija ma għandhomx jintużaw għal studji dwar il-lissija.

Kundizzjonijiet tat-test

32. Matul il-perjodu ta' ttestjar, il-kolonni ta' lissija tal-ħamrija għandhom jinżammu fid-dlam f'temperatura ambjentali sakemm din it-temperatura tinżamm fi ħdan il-medda ta' ± 2 °C. It-temperaturi rrakkomandati huma ta' bejn 18 u 25 °C.

33. Għandha tiġi applikata xita artifiċjali (0,01 M $CaCl_2$) kontinwament fuq wiċċ il-kolonni tal-ħamrija b'rata ta' 200 mm tul perjodu ta' 48 siegħa ([1]); din ir-rata hija ekwivalenti għal applikazzjoni ta' 251 għal kolonna b'dijametru intern ta' 4 cm. Jekk ikunu meħtieġa għall-fini tat-test, jistgħu jintużaw ukoll rati oħrajn ta' xita artifiċjali u ta' durata itwal.

Twettiq tat-test

Lissija b'sustanza kimika tat-test prinċipali

34. Tal-inqas, kolonni ta' lissija ta' duplikati jiġu mpakkettati b'ħamrija mhux ittrattata, imnixxfa bl-arja u mgħarbula (< 2 mm) b'għoli li jasal sa madwar 30 cm. Biex jinkiseb ippakkjar uniformi, il-ħamrija tiddaħħal fil-kolonni f'porzjonijiet żgħar b'imgħarfa u titniżżel 'l isfel b'pompa b'vibrazzjoni simultanja ħafifa tal-kolonna sakemm il-quċċata tal-kolonna tal-ħamrija ma tinżilx iktar. L-ippakkjar uniformi huwa meħtieġ sabiex jinkisbu riżultati riproduċibbli minn kolonni ta' lissija. Għal dettalji dwar tekniki ta' ppakkettjar tal-kolonni, ara r-referenzi (20)(21) u (22). Biex tiġi kkontrollata r-riproduċibilità tal-proċedura ta' ppakkjar, jiġi stabbilit il-piż sħiħ tal-ħamrija ppakkjata fil-kolonni. ([2]); il-piżijiet tal-kolonni ta' duplikati għandhom ikunu simili.

([1]) Dan jissimula ammont kbir ta' xita. Ix-xita annwali medja, pereżempju, fl-Ewropa Ċentrali, hija fl-ordni ta' 800-1 000 mm.

([2]) Dawn li ġejjin huma eżempji ta' densitajiet bl-ingrossa għal ħamrija disturbati:
għal ħamrija ramlija 1,66 g · ml^{-1}
għal ħamrija ramlija tal-lom 1,58 g · ml^{-1}
għal ħamrija tal-lom 1,17 g · ml^{-1}
għal ħamrija tal-fajd = 1,11 · g ml^{-1}

35. Wara l-impakkettar, il-kolonni tal-ħamrija jixxarrbu minn qabel b'xita artifijali (0,01 M $CaCl_2$) mill-qiegħ sa fuq sabiex l-arja fil-pori tal-ħamrija tiġi spostata bl-ilma. Wara, il-kolonni tal-ħamrija jitħallew jekwilibraw u l-ilma żejjed jitbattal bil-gravità. Il-metodi għas-saturazzjoni tal-kolonni huma riveduti fir-referenza (23).

36. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u/jew is-sustanza kimika ta' referenza jiġu applikati għall-kolonni tal-ħamrija (ara wkoll il-paragrafi 23-25). Biex tinkiseb distribuzzjoni omoġena, is-soluzzjonijiet, is-sospensjonijiet jew l-emulsjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u/jew ta' referenza għandhom jiġu applikati ndaqs fuq il-wiċċ tal-kolonni tal-ħamrija. Jekk tkun irrakkomandata inkorporazzjoni fil-ħamrija għall-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test, għandha titħallat f'ammont żgħir (eż. 20 g) ta' ħamrija u tiżdied fuq wiċċ il-kolonna tal-ħamrija.

37. Imbagħad l-uċuħ tal-kolonni tal-ħamrija jitgħattew b'disk tas-sinter tal-ħġieġ, perli tal-ħġieġ, filtri tal-fibra tal-ħġieġ jew karta filtru tonda biex ix-xita artifiċjali tiġi distribwita b'mod ekwu fuq il-wiċċ shiħ u jiġi evitat milli jiġi disturbat il-wiċċ tal-ħamrija minħabba l-qtar tax-xita. Iktar ma jkun kbir id-dijametru tal-kolonna, iktar trid toqgħod attent fl-applikazzjoni tax-xita artifiċjali fuq il-kolonni tal-ħamrija sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni ndaqs tax-xita artifiċjali fuq il-wiċċ tal-ħamrija. Imbagħad, ix-xita artifiċjali tiżdied mal-kolonni tal-ħamrija qatra, qatra bl-għajnuna ta' pistun jew pompa peristaltika jew lenbut bi fluss kontrollat. Idealment, il-lissiji għandhom jinġabru fi frazzjonijiet u l-volumi rispettivi tagħhom jiġu rreġistrati ([1]).

38. Wara l-lissija u wara li l-kolonni jitħallew jitbattlu, il-kolonni tal-ħamrija jitqassmu f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju, is-segmenti jiġu estrattati b'solventi xierqa jew taħlitiet ta' solventi u jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, meta jkun xieraq, għal prodotti ta' trasformazzjoni, għar-radjuattività totali u għas-sustanza kimika ta' referenza. Il-lissiji jew il-frazzjonijiet tal-lissiji jiġu analizzati direttament jew wara l-estrazzjoni għall-istess prodotti. Meta tintuża sustanza kimika tat-test radjuttikkettata, għandhom jiġu identifikati l-frazzjonijiet kollha li fihom ≥ 10 % tar-radjuattività applikata.

Lissija b'residwi li jitħallew jiqdiemu

39. Ħamrija ġdida (mhux imnixxfa bl-arja qabel) tiġi ttrattata b'rata li tikkorrispondi għall-erja tas-superfiċje tal-kolonni tal-ħamrija (ara l-paragrafu 24) bis-sustanza kimika tat-test radjutikkettata u inkubata f'kundizzjonijiet aerobiċi skont il-Metodu ta' Ttestjar C.23 (13). Il-perjodu ta' inkubazzjoni (li fih titħalla tiqdiem) għandu jkun twil biżżejjed biex jiġu prodotti ammonti sinifikanti ta' prodotti ta' trasformazzjoni; huwa rrakkomandat perjodu li fih titħalla tiqdiem ta' nofs ħajja waħda tas-sustanza kimika tat-test ([2]), iżda ma għandux jaqbeż il-120 jum. Qabel il-lissija, il-ħamrija li titħalla tiqdiem tiġi analizzata għas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha.

40. Il-kolonni ta' lissija huma ppakkjati sa għoli ta' 28 cm bl-istess ħamrija (iżda jitnixxfu bl-arja) kif użata fl-esperiment li fih titħalla tiqdiem kif deskritt fil-paragrafu 34 u l-piż totali tal-kolonni tal-ħamrija ppakkjati jiġi stabbilit ukoll. Imbagħad, il-kolonni tal-ħamrija jixxarrbu minn qabel kif spjegat fil-paragrafu 35.

41. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha jiġu applikati fuq wiċċ il-kolonni tal-ħamrija fil-forma ta' residwi tal-ħamrija li jitħallew jiqdiemu (ara l-paragrafu 39) bħala segment tal-ħamrija ta' 2 cm. Idealment, l-għoli totali tal-kolonni tal-ħamrija (ħamrija mhux ittrattata + ħamrija li titħalla tiqdiem) ma għandux jaqbeż it-30 cm (ara l-paragrafu 34).

42. Il-lissija ssir kif spjegat fil-paragrafu 37.

43. Wara l-lissija, is-segmenti tal-ħamrija u l-lissiji jiġu analizzati kif indikat fil-paragrafu 38 għas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha u r-radjuattività mhux estratta. Biex jiġi stabbilit kemm ir-residwu li jitħalla jiqdiem jinżamm fis-saff ta' fuq ta' 2 cm wara l-lissija, dan is-segment għandu jiġi analizzat għalih.

([1]) Il-volumi tipiċi tal-lissiji jvarjaw minn 230-260 ml li jikkorrispondu għal madwar 92-104 % tax-xita artifiċjali totali applikata (251 ml) meta jintużaw kolonni tal-ħamrija b'dijametru ta' 4 cm u tul ta' 30 cm.

([2]) Jista' jiġi fformat prodott wieħed kbir ta' trasformazzjoni f'ħamrija li anki din tista' tidher f'punti ta' żmien differenti matul studju ta' trasformazzjoni. F'dawn il-każijiet, jista' jkun hemm bżonn li jsiru studji dwar il-lixxivjazzjoni b'residwi li tħallew jiqdiemu għal żminijiet differenti.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

44. L-ammonti tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni, dawk mhux estrattabbli u, jekk inklużi, tas-sustanza kimika ta' referenza għandhom jingħataw f' % ta' doża inizjali applikata għal kull segment tal-ħamrija u frazzjoni tal-lissija. Għandha tingħata preżentazzjoni grafika għal kull kolonna billi jiġu plottjati l-perċentwali misjubin bħala funzjoni tal-fondi tal-ħamrija.

45. Meta sustanza kimika ta' referenza tkun inkluża f'dawn l-istudji dwar il-lissija tal-kolonna, il-lissija ta' sustanza kimika tista' tiġi evalwata fuq skala relattiva li tuża fatturi ta' mobilità relattiva (RMF; għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 3) (1)(11) li biha tkun tista' titqabbel dejta dwar il-lissija ta' bosta sustanzi kimiċi miksubin b'tipi ta' ħamrija differenti. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji ta' valuri tal-RMF għal firxa ta' sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba'.

46. Stimi tal-K_{oc} (il-koeffiċjent ta' assorbiment normalizzat għall-karbonju organiku) u l-K_{om} (koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għall-materja organika) jistgħu jinkisbu wkoll mir-riżultati ta' lissija tal-kolonna bl-użu ta' distanza medja ta' lissija jew korrelazzjonijiet stabbiliti bejn l-RMF u l-K_{om} rispettivament K_{oc} (4) jew bl-applikazzjoni ta' sempliċi teorija ta' kromatografika (24). **Madankollu, l-aħħar metodu għandu jintuża bil-galbu, speċjalment meta jitqies li l-proċess ta' lissija ma jinvolvix biss kundizzjonijiet ta' fluss saturati, iżda anki sistemi mhux saturati.**

Interpretazzjoni tar-riżultati

47. L-istudji dwar il-lissija tal-kolonna deskritti f'dan il-metodu jippermettu sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' lissija jew mobilità fil-ħamrija tas-sustanza kimika tat-test (fl-istudju dwar il-lissija prinċipali) u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha (fl-istudju dwar il-lissija tar-residwu li jitħalla jiqdiem). Dawn it-testijiet ma jbassrux b'mod kwantitattiv l-imġiba ta' lissija fil-kundizzjonijiet tal-għalqa, iżda jistgħu jintużaw biex iqabblu l-'lixxivjabbiltà' ta' sustanza kimika ma' oħrajn b'imġiba ta' lissija li jaf tkun magħrufa (24). Lanqas ma jkejlu b'mod kwantitattiv il-perċentwal tas-sustanza kimika applikata li tista' tilħaq l-ilma ta' taħt l-art (11). Madankollu, ir-riżultati tal-istudji dwar il-lissija tal-kolonna jistgħu jgħinu biex jiġi deċiż jekk iridx isir ittestjar addizzjonali ta' nofs l-għalqa jew tal-għalqa mwettaq għal sustanzi kimiċi b'potenzjal kbir ta' mobilità f'testijiet tal-laboratorju.

Rapport tat-test

48. Ir-rapport irid jinkludi:

Sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza (meta tintuża):

— l-isem komuni, l-isem tas-sustanza kimika (nomenklatura tas-CAS u l-IUPAC), in-numru tas-CAS, l-istruttura kimika (inkluża l-pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjutikkettat) u l-karatteristiċi fiżikokimiċi relevanti;

— il-puritajiet (impuritajiet) tas-sustanza kimika tat-test;

— il-purità radjukimika tas-sustanza kimika ttikkettata u l-attività speċifika (fejn xieraq).

Ħamrija tat-test:

— dettalji dwar il-post tal-ġbir;

— il-karatteristiċi tal-ħamrija, bħall-pH, il-karbonju organiku u l-kontenut ta' tafal, is-sawra u d-densità bl-ingrossa (għal ħamrija disturbata);

— l-attività mikrobjali tal-ħamrija (iżda biss għal ħamrija użata sabiex is-sustanza kimika tat-test titħalla tiqdiem);

— it-tul tal-ħżin tal-ħamrija u l-kundizzjonijiet ta' ħżin tagħha.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dati ta' meta saru l-istudji;

— it-tul u d-dijametru tal-kolonni ta' lissija;

— il-piż totali tal-ħamrija tal-kolonni tal-ħamrija;

— l-ammont tas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, is-sustanza kimika ta' referenza applikata;

— l-ammont, il-frekwenza u d-durata tal-applikazzjoni tax-xita artifiċjali;

— it-temperatura tas-sistema tal-esperiment;

— in-numru ta' rreplikati (tal-inqas tnejn);

— il-metodi għall-analiżi tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni u, fejn xieraq, tas-sustanza kimika ta' referenza fil-bosta segmenti u lissiji tal-ħamrija;

— il-metodi għall-karatterizzazzjoni u l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni fis-segmenti tal-ħamrija u l-lissiji.

Riżultati tat-test:

— it-tabelli tar-riżultati mogħtijin bħala konċentrazzjonijiet u bħala % tad-doża applikata għas-segmenti u l-lissiji tal-ħamrija;

— il-bilanċ tal-massa, jekk xieraq;

— il-volumi tal-lissija;

— id-distanzi tal-lissija u, fejn xieraq, il-fatturi relevanti tal-mobilità;

— il-plott grafiku ta' % misjuba fis-segmenti tal-ħamrija kontra l-fond tas-segment tal-ħamrija;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) L-Anness I għad-Direttiva tal-Kummissjoni 95/36/KE tal-14 ta' Lulju 1995 li temenda d-Direttiva tal-Kunsill 91/414/KEE li tirrigwarda t-tqegħid fis-suq tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, ĠU L 172, 22.7.1995, p. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) Il-kapitli li ġejjin ta’ dan l-Anness:

Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar

Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma

Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta’ partizzjoni, metodu tal-flask mheżżeż

Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta’ partizzjoni, metodu HPLC

Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idroliżi bħala funzjoni tal-pH

Il-Kapitolu C.18, Assorbiment/disorbiment bl-użu ta’ metodu ta’ ekwilibriju tal-lott

Il-Kapitolu C.23, Trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D. R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

Appendiċi 1

Definizzjonijiet u unitajiet

Residwu tal-ħamrija li jitħalla jiqdiem: Is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni preżenti fil-ħamrija wara l-applikazzjoni u wara perjodu twil biżżejjed biex il-proċessi ta' trasport, assorbiment, metaboliżmu, u dissipazzjoni jibdlu d-distribuzzjoni u l-għamla kimika ta' whud mis-sustanzi kimiċi applikati (1).

Xita artifiċjali: soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew dejonizzat.

Distanza Medja ta' Lissija: Il-qiegħ tat-taqsima tal-ħamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata [esperiment normali tal-lissija], jew; (il-qiegħ tat-taqsima tal-ħamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata) — ((il-ħxuna tas-saff tar-residwu li tħalla jiqdiem)/2) [l-istudju dwar il-lissija tar-residwu li tħalla jiqdiem]

Sustanza kimika: sustanza jew taħlita.

Lissija: Il-fażi milwiema perkolata minn profil tal-ħamrija jew kolonna tal-ħamrija (1).

Lissija: Proċess li bih sustanza kimika tinżel 'l isfel minn ġol-profil tal-ħamrija jew kolonna tal-ħamrija (1).

Distanza ta' lissija: L-iktar segment fond tal-ħamrija li fih instab ≥ 0,5 % tas-sustanza kimika tat-test applikata jew ir-residwu li tħalla jiqdiem wara l-proċess ta' lissija (ekwivalenti għall-fond tal-penetrazzjoni).

Limitu ta' detezzjoni (LOD) u **limitu tal-kwantifikazzjoni (LOQ)**: Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-identità tas-sustanza kimika ma tkunx tista' tiġi differenzjata minn artefatti analitiċi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-konċentrazzjoni ma tkunx tista' tiġi stabbilita bi preċiżjoni aċċettabbli.

Fattur ta' Mobilità Relattiva tal-RMF: (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test (cm)) / (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika ta' referenza (cm))

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Prodott ta' trasformazzjoni: Is-sustanzi kimiċi kollha li jirriżultaw minn reazzjonijiet ta' trasformazzjoni bijotiċi jew abijotiċi tas-sustanza kimika tat-test inklużi CO_2 u prodotti li huma maqbudin f'residwi.

Ħamrija: Taħlita ta' kostitwenti minerali u organiċi tas-sustanzi kimiċi, b'dawn tal-aħħar li fihom komposti ta' kontenut għoli ta' karbonju u nitroġenu u piżijiet molekolari kbar, popolati b'organiżmi żgħar (ħafna minnhom mikroorganiżmi). Il-ħamrija tista' titqandel f'żewġ stati:

— mhux disturbata, kif żviluppat maż-żmien, f'saffi karatteristiċi ta' firxa ta' tipi ta' ħamrija;

— disturbata, kif normalment tinstab fir-raba' jew kif isseħħ meta jittieħdu kampjuni bit-tħaffir u jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar (2).

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

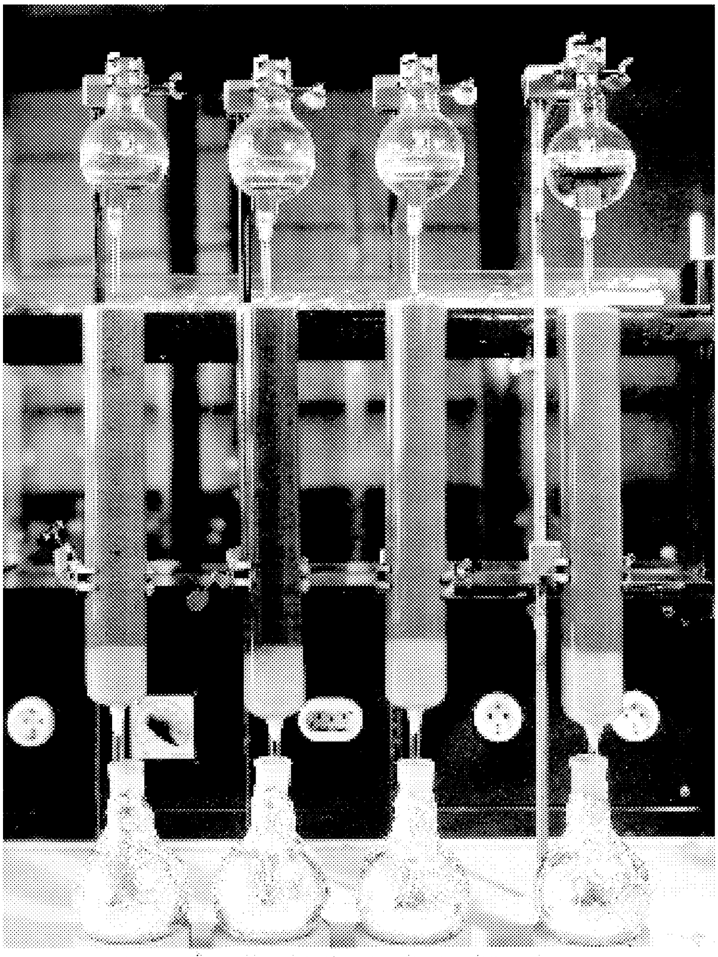
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

Appendiċi 2

Figura 1

Eżempju ta' kolonni ta' lissija li ma jistgħux jinqatgħu magħmulin mill-ħġieġ

B'tul ta' 35 cm u dijametru intern ta' 5 cm (1)



← Imbiebet bi fluss kontrollat għall-appikazzjoni ta' xita artifiċjali

← Disk tas-sinter tal-ħġieġ biex jiġi evitat mili jiġi disturbat il-wiċċ tal-ħamrija u sabiex ix-xita artifiċjali titqassam indaqs

← Kolonna tal-ħġieġ mimlija ħamrija tat-test (meta jiġu ttestjati prodotti fotolabbli, il-kolonni għandhom jitgeżwru f'fojl tal-aluminju)

← Saff ramel kwarzuż

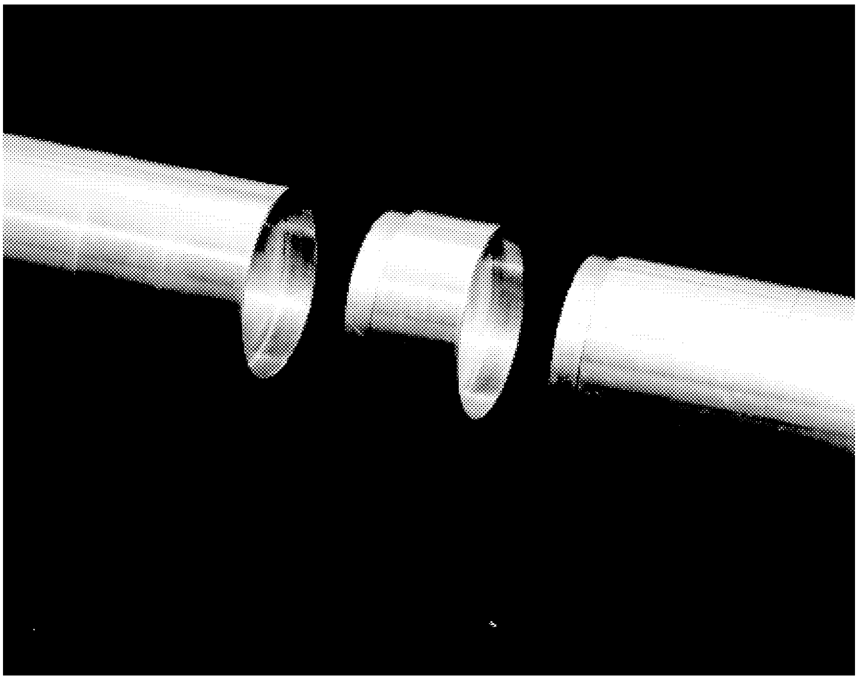
← Tapp tas-suf tal-ħġieġ biex il-ħamrija tinżamm fil-kolonna

← Flask b'qiegħ tond għall-ġbir tal-lissija; imgeżwer f'fojl tal-aluminju biex tiġi eskluża fotoliżi

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Figura 2

Eżempju ta' kolonna tal-metall li tista' tinqata' b'dijametru intern ta' 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

Appendiċi 3

Eżempji ta' Fatturi ta' Mobilità Relattiva (*) (RMF) għal firxa ta' Sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba' (1)(2) u l-klassijiet ta' mobilità korrispondenti +

Medda tal-RMF	Sustanza Kimika (RMF)	Klassi tal-Mobilità
≤ 0,15	Paratjon (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I immobbli
0,15 — 0,8	Profenofos (0,18), Propikonażol (0,23), Djażinon (0,28), Djuron (0,38), Terbutilażina (0,52), Metidatjon (0,56), Prometrin (0,59), Propażina (0,64), Alaklor (0,66), Metolaklor (0,68)	II ftit mobbli
0,8 — 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrażina (1,03), Simażina (1,04), Fluwometuron (1,18)	III moderatament mobbli
1,3 — 2,5	Prometon (1,67), Ċianażina (1,85), Bromaċil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV kemxejn mobbli
2,5 — 5,0	Karbofuran (3,00), Diossakarb (4,33)	V mobbli
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), Dikrotofos (> 5,0)	VI mobbli ħafna

(*) Il-Fattur tal-Mobilità Relattiva huwa derivat kif ġej (3):

$$RMF = \frac{\text{id-distanza ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test (cm)}}{\text{id-distanza ta' lissija tas-sustanza kimika ta' referenza (cm)}}$$

(**) Sustanza kimika ta' referenza

\+ Sistemi oħrajn biex tiġi kklassifikata l-mobilità ta' sustanza kimika fil-ħamrija huma bbażati fuq il-valuri tal-R_f mill-kromatografija tas-saff irqiq tal-ħamrija (4) u fuq valuri tal-K_{oc} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium 'Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.' Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

C.45. STIMA TAL-EMISSJONIJIET MILL-INJAM ITTRATTAT BIL-PRESERVATTIV FL-AMBJENT: IL-METODU TAL-LABORATORJU GĦALL-KOMODITAJIET TAL-INJAM LI MHUMIEX KOPERTI U LI HUMA F'KUNTATT MA' ILMA ĦELU JEW ILMA BAĦAR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 313 tal-OECD (2007). L-emissjonijiet mill-injam ittrattat bil-preservattiv fl-ambjent iridu jiġu kkwantifikati sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu tal-laboratorju għall-istima tal-emissjonijiet minn injam ittrattat bil-preservattiv f'żewġ sitwazzjonijiet li fihom l-emissjonijiet jistgħu jidħlu fl-ilma:

— Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma ħelu. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidħlu fl-ilma.

— Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma baħar. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidħlu fl-ilma baħar.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa maħsub sabiex jiġu ttestjati l-emissjonijiet mill-injam u komoditajiet tal-injam li mhumiex koperti u li huma f'kuntatt ma' ilma ħelu jew ilma baħar. Il-Klassijiet tal-Użu jintużaw b'mod internazzjonali u jikkategorizzaw il-periklu bijoloġiku li għalih ser tkun soġġetta l-komodità ttrattata. Il-Klassijiet tal-Użu jiddefinixxu wkoll is-sitwazzjoni li fiha tintuża l-komodità ttrattata u jistabbilixxu l-kompartimenti ambjentali (arja, ilma, ħamrija) li huma f'riskju potenzjali mill-injam ittrattat bil-preservattiv.

3. Il-metodu ta' ttestjar huwa proċedura tal-laboratorju għall-kisba ta' kampjuni (emissat) minn ilma li fih jitgħaddas l-injam ittrattat, f'intervalli ta' żmien dejjem itwal wara l-espożizzjoni. Il-kwantità ta' emissjonijiet fl-emissat hija marbuta mal-erja tas-superfiċje tal-injam u t-tul tal-espożizzjoni, sabiex jiġi stmat fluss f'mg/m^2/jum. B'hekk ikun jista' jiġi stmat il-fluss (rata ta' lissija) wara perjodi dejjem itwal ta' espożizzjoni.

4. Il-kwantità ta' emissjonijiet tisat' tintuża f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Il-mekkaniżmu ta' lissija fuq wiċċ l-injam mill-ilma frisk mhuwiex supponut li huwa l-istess fl-għamla u s-severità tiegħu bħal-lissija minn wiċċ tal-injam mill-ilma baħar. B'hekk, għal prodotti jew taħlitiet ta' preservattivi tal-injam użati sabiex jittrattaw injam użat f'akwati tal-ilma baħar, hemm bżonn li jsir studju dwar il-lissija tal-injam għall-ilma baħar.

6. L-injam, fil-każ ta' injam ittrattat b'preservattiv tal-injam, għandu jkun jirrappreżenta l-injam użat b'mod kummerċjali. Għandu jiġi ttrattat skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-preservattiv u b'konformità mal-istandards u l-ispeċifikazzjonijiet xierqa. Qabel ma jibda t-test għandhom jiġu ddikjarati l-parametri għall-kundizzjonament wara t-trattament tal-injam.

7. Il-kampjuni tal-injam użati għandhom ikunu jirrappreżentaw il-komoditajiet użati (eż., fir-rigward tal-ispeċijiet, id-densità u karatteristiċi oħrajn).

8. It-test jista' jiġi applikat għal injam bl-użu ta' proċess penetrattiv jew applikazzjoni superfiċjali jew għal injam ittrattat li għandu trattament tal-wiċċ obbligatorju addizzjonali (eż. żebgħa li hija applikata bħala rekwiżit għal użu kummerċjali).

9. Il-kompożizzjoni, l-ammont, il-pH u l-għamla fiżika tal-ilma huma importanti sabiex jiġu stabbiliti l-kwantità, il-kontenut u l-għamla tal-emissjonijiet mill-injam.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

10. Il-kampjuni tat-test tal-injam ittrattat bil-preservattiv jitgħaddsu fl-ilma. L-ilma (emissat) jinġabar u jiġi analizzat kimikament bosta drabi tul il-perjodu ta' espożizzjoni li jkun twil biżżejjed biex ikunu jistgħu jsiru kalkoli statistiċi. Ir-rati ta' emissjoni f'mg/m^2/jum huma kkalkolati mir-riżultati analitiċi. Il-perjodi ta' kampjunar għandhom jiġu rreġistrati. It-testijiet b'kampjuni mhux ittrattati għandhom jitwaqqfu jekk ma jkun hemm ebda sfond misjub fl-ewwel tliet punti ta' dejta.

11. L-inklużjoni ta' kampjuni tal-injam mhux ittrattat tippermetti li jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond għal emissati minn injam li mhumiex il-preservattiv użat.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

Preċiżjoni

12. Il-preċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar biex tiġi stmata l-emissjoni tiddependi minn kemm il-kampjuni tat-test jirrappreżentaw l-injam ittrattat kummerċjalment, kemm l-ilma jirrappreżenta ilma veru u kemm ir-reġim ta' espożizzjoni jirrappreżenta l-kundizzjonijiet naturali.

13. Il-preċiżjoni, ir-reqqa u r-ripetibilità tal-metodu analitiku għandhom jiġu stabbiliti qabel ma jsir it-test.

Riproduċibilità

14. Jinġabru u jiġu analizzati tliet kampjuni ta' ilma u l-valur medju jittieħed bħala l-valur ta' emissjoni. Ir-riproduċibilità tar-riżultati fi ħdan laboratorju wieħed u bejn laboratorji differenti tiddependi mir-reġim ta' tgħaddis u l-injam użat bħala kampjuni tat-test.

Medda Aċċettabbli tar-Riżultati

15. Medda tar-riżultati minn dan it-test li fiha l-valuri superjuri u inferjuri jvarjaw b'inqas minn ordni ta' manjitudni waħda hija aċċettabbli.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Ilma

16. Xenarji ta' lissija ta' ilma ħelu: Ilma dejonizzat (eż., ASTM D 1193 Tip II) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma ħelu. It-temperatura tal-ilma għandha tkun 20 °C +/– 2 °C u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analiżi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmati s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanzi kimiċi li mbagħad jiġu analizzati kimikament.

17. Xenarji ta' lissija tal-ilma baħar: Ilma baħar sintetiku (eż., ASTM D 1141 Ilma tal-Oċean Sostitut mingħajr Metalli Tqal) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma baħar. It-temperatura tal-ilma għandha tkun 20 °C +/– 2 °C u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analiżi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmati s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontrol għall-analiżi tal-livelli ta' sfond għas-sustanzi kimiċi ta' importanza.

Kampjuni tat-Test tal-Injam

18. L-ispeċijiet tal-injam għandhom ikunu dawk tipiċi tal-ispeċijiet tal-injam użati għall-ittestjar tal-effikaċja tal-preservattivi tal-injam. L-ispeċijiet rakkomandati huma *Pinus sylvestris L.* (arżnu tal-Iskozja), *Pinus resinosa Ait.* (arżnu aħmar) jew *Pinus spp* (arżnu tan-Nofsinhar). Jistgħu jsiru testijiet addizzjonali bl-użu ta' speċijiet oħrajn.

19. Għandu jintuża injam b'vina dritta mingħajr ingroppi. Għandu jiġi evitat materjal b'dehra reżinuża. L-injam għandu jkun injam tipiku disponibbli kummerċjalment. Għandhom jiġu rreġistrati s-sors, id-densità u n-numru ta' ċrieki annwali għal kull 10 mm.

20. Huwa rrakkomandat li l-kampjuni tat-test tal-injam ikunu settijiet ta' ħamsa skont l-EN 113 blokok tad-daqs (dimensjonijiet ta' 25 mm × 50 mm × 15 mm) bin-naħat lonġitudinali paralleli għall-vina tal-injam, għad li jistgħu jintużaw dimensjonijiet oħrajn bħal 50 mm, b'150 mm, b'10 mm. Il-kampjun tat-test għandu jitgħaddas kompletament fl-ilma. Il-kampjuni tat-test għandhom ikunu 100 % lbieba taz-zokk tas-siġra. Kull kampjun jiġi mmarkat b'mod uniku sabiex ikun jista' jiġi identifikat matul it-test kollu.

21. Il-kampjuni kollha tat-test għandhom jiġu nċanati jew illixxati bis-serrieq u l-uċuħ ma għandhomx jiġu mrammlin.

22. In-numru ta' settijiet ta' kampjuni tat-test tal-injam użati għall-analiżi huwa tal-inqas ħamsa: tliet settijiet ta' kampjuni jiġu ttrattati bil-preservattiv, sett ta' kampjuni ma jiġix ittrattat u sett ta' kampjuni sabiex jiġi stmat il-kontenut ta' umdità mnixxef bil-forn tal-kampjuni tat-test qabel it-trattament. Jitħejjew biżżejjed kampjuni tat-test sabiex ikunu jistgħu jingħażlu tliet settijiet ta' kampjuni li huma fi ħdan 5 % tal-valur medju tar-retenzjonijiet tal-preservattivi tal-grupp ta' kampjuni tat-test.

23. Il-kampjuni kollha tat-test huma ssiġillati fit-truf b'sustanza kimika li tevita milli l-preservattiv jippenetra fil-vina tat-tarf tal-kampjuni jew tevita lissija mill-kampjuni mill-vina tat-tarf. Hemm bżonn li ssir distinzjoni bejn kampjuni użati għall-applikazzjoni superfiċjali u l-proċessi ta' penetrazzjoni għall-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf. L-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf trid issir qabel it-trattament fil-każ ta' applikazzjoni superfiċjali biss.

24. Il-vina tat-truf trid tinfetaħ għat-trattamenti permezz ta' proċessi ta' penetrazzjoni. Għalhekk, il-kampjuni jridu jiġu ssiġillati fit-truf fi tmiem il-perjodu ta' kundizzjonament. L-emissjoni trid tiġi stmata għan-naħa tal-wiċċ lonġitudinali biss. Is-siġillanti għandhom jiġu spezzjonati u jerġgħu jiġu applikati jekk ikun hemm bżonn qabel ma tibda l-lissija u ma għandhomx jerġgħu jiġu applikati wara li tkun bdiet il-lissija.

Kontenitur tat-Tgħaddis

25. Il-kontenitur huwa magħmul minn materjal inerti u huwa kbir biżżejjed biex ikun jiflaħ għal 5 kampjuni tal-injam EN113 f'500 ml ilma li jirriżultaw fi proporzjon ta' erja tas-superfiċje għal volum tal-ilma ta' 0,4 cm^2/ml.

Assemblaġġ tat-Test tal-Kampjuni

26. Il-kampjuni tat-test huma sostnuti fuq assemblaġġ li jippermetti sabiex l-uċuħ esposti kollha tal-kampjun jidħlu f'kuntatt mal-ilma.

PROĊEDURA GĦAT-TRATTAMENT TA' PRESERVAZZJONI

Tħejjija tal-Kampjuni tat-Test Ittrattati

27. Il-kampjun tat-test tal-injam li ser jiġi ttrattat bil-preservattiv fit-test jiġi ttrattat bil-metodu speċifikat għall-preservattiv, li jista' jkun permezz ta' proċess ta' trattament b'penetrazzjoni jew proċessi ta' applikazzjoni superfiċjali, li jista' jkun b'għodsa, sprejjar jew pinzellata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċess ta' trattament b'penetrazzjoni

28. Għandha titħejja soluzzjoni tal-preservattiv li tikseb it-teħid jew iż-żamma speċifikati meta jiġu applikati bl-użu tal-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni. Il-kampjun tat-test tal-injam jintiżen u jitkejlu d-daqsijiet tiegħu. Il-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni għandu jiġi speċifikat għall-applikazzjoni tal-preservattiv għall-injam sabiex jintuża fil-Klassi tal-Użu 4 jew 5. Il-kampjun jerġa' jintiżen wara t-trattament u r-retenzjoni tal-preservattiv (kg/m^3) tiġi kkalkolata bl-ekwazzjoni:

$$\frac{\text{Massa wara t-trattament (kg)} - \text{Massa qabel it-trattament (kg)}}{\text{Volum tal-kampjun tat-test } (m^3)} \times \frac{\text{Soluzzjoni Konċentrazzjoni (\% massa/ massa)}}{100}$$

29. Kun af li f'dan it-test jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali (eż. b'mili bi pressjoni ta' vakwu). Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod għandha tiġi analizzata u rreġistrata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċessi ta' applikazzjoni superfiċjali

30. Il-proċess ta' applikazzjoni superfiċjali jinkludi għodsa, sprejjar jew pinzellata tal-kampjuni tat-test tal-injam. Il-proċess u r-rata ta' applikazzjoni (eż. litri/m^2) għandhom ikunu kif speċifikat għall-appikazzjoni superfiċjali tal-preservattiv.

31. Kun af ukoll li f'dan il-każ jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali. Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod trid tiġi analizzata u rreġistrata.

Kondizzjonament tal-Kampjuni tat-Test wara t-Trattament

32. Wara t-trattament, il-kampjuni tat-test ittrattati għandhom jiġu kondizzjonati skont ir-rakkomandazzjonijiet magħmulin mill-fornitur tal-preservattiv tat-test skont ir-rekwiżiti tat-tikketta tal-preservattiv jew b'konformità mal-prattiki tat-trattament kummerċjali jew skont l-Istandard EN 252.

Tħejjija u Għażla tal-Kampjuni tat-Test

33. Wara l-kondizzjonament ta' wara t-trattament, ir-retenzjoni medja tal-grupp tal-kampjuni tat-test tiġi kkalkolata u jingħażlu għal għarrieda tliet settijiet rappreżentattivi tal-kampjuni b'retenzjoni li tkun fi ħdan 5 % mill-medja għall-grupp sabiex titkejjel il-lissija.

PROĊEDURA GĦALL-KEJLIET TAL-EMISSJONI TAL-PRESERVATTIVI

Metodu ta' Immersjoni

34. Il-kampjuni tat-test jintiżnu u wara jitgħaddsu kompletament fl-ilma u jiġu rreġistrati d-data u l-ħin. Il-kontenitur jitgħatta biex tonqos l-evaporazzjoni.

35. L-ilma jinbidel kull ċertu żmien li ġej: 6 sigħat, jum, jumejn, 4 ijiem, 8 ijiem, 15-il jum, 22 jum, 29 jum (nota: dawn huma l-ħinijiet/żminijiet totali mhux il-ħinijiet/żminijiet ta' intervall). Għandhom jiġu rreġistrati ż-żmien u d-data tal-bidla tal-ilma u l-massa tal-ilma rkuprata mill-kontenitur.

36. Wara kull bidla tal-ilma, jinżamm kampjun tal-ilma li fih tgħaddas is-sett ta' kampjuni tat-test sabiex imbagħad tkun tista' ssir analiżi kimika.

37. Il-proċedura ta' kampjunar tippermetti li jiġi kkalkolat il-profil tal-kwantità tal-emissjonijiet kontra ż-żmien. Il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet li jippreservaw l-analit, eż., fi friġġ fid-dlam biex jonqos it-tkabbir ta' mikrobi fil-kampjun qabel l-analiżi.

KEJLIET TAL-EMISSJONIJIET

Kampjuni Ttrattati

38. L-ilma miġbur jiġu analizzat kimikament għas-sustanza attiva u/jew il-prodotti relevanti ta' degradazzjoni/trasformazzjoni, jekk ikun xieraq.

Kampjuni Mhux Ittrattati

39. Il-ġbir tal-ilma (emissat) f'din is-sistema u l-analiżi sussegwenti tas-sustanzi kimiċi li ġew lixxivjati mill-kampjuni ta' injam mhux ittrattati jippermetti sabiex tiġi stmata r-rata possibbli ta' emissjoni tal-preservattiv mill-injam mhux ittrattat. Il-ġbir u l-analiżi tal-emissat wara perjodi ta' żmien dejjem itwal jippermettu sabiex tiġi stmata r-rata ta' bidla tar-rata ta' emissjoni maż-żmien. Din l-analiżi hija proċedura tal-kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanza kimika tat-test f'injam mhux ittrattat sabiex jiġi kkonfermat li l-injam użat bħala sors tal-kampjuni ma jkunx ġie ttrattat minn qabel bil-preservattiv.

DEJTA U RAPPORTAR

Analiżijiet Kimiċi

40. L-ilma miġbur jiġi analizzat kimikament u r-riżultat tal-analiżi tal-ilma tingħata f'unitajiet xierqa, eż., µg/l.

Rapportar tad-Dejta

41. Jiġu rreġistrati r-riżultati kollha. L-Appendiċi juri eżempju ta' formola ta' reġistrazzjoni ssuġġerita għal sett wieħed ta' kampjuni tat-test ittrattati, u t-tabella sommarju sabiex jiġu kkalkolati l-valuri medji ta' emissjoni tul kull intervall tal-kampjunar.

42. Il-fluss ta' emissjoni ta' kuljum f'mg/m²/jum jiġi kkalkolat bit-teħid tal-medja tat-tliet kejliet mit-tliet irreplikati u d-diviżjoni bin-numru ta' jiem tat-tgħaddis.

Rapport tat-Test

43. Tal-inqas għandha tiġi pprovduta l-informazzjoni li ġejja fir-rapport tat-test:

— Isem il-fornitur tal-preservattiv attwalment ittestjat;

— L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preservattiv ittestjat;

— L-isem kummerċjali jew komuni tal-ingredjent(i) attiv(i) b'deskrizzjoni ġenerika tal-koformulanti (eż. kosolvent, reżina), u l-kompożizzjoni f' % m/m tal-ingredjenti;

— Ir-retenzjoni jew it-tagħbija relevanti (f'kg/m³ jew l/m², rispettivament) speċifikati għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma;

— L-ispeċi ta' injam użata, bid-densità tagħha u r-rata ta' tkabbir fi ċrieki kull 10 mm;

— It-tagħbija jew ir-retenzjoni tal-preservattiv ittestjat u l-formula użata sabiex tiġi kkalkolata r-retenzjoni, mogħtija bħala l/m² jew kg/m³;

— Il-metodu ta' applikazzjoni tal-preservattiv, li jispeċifika l-iskeda tat-trattament użata għal proċess ta' penetrazzjoni, u l-metodu ta' applikazzjoni jekk intuża trattament superfiċjali;

— Id-data ta' applikazzjoni tal-preservattiv, u stima tal-kontenut ta' umdità tal-kampjuni tat-test, mogħtijin bħala perċentwal;

— Il-proċeduri ta' kondizzjonament użati, billi jiġu speċifikati t-tip, il-kundizzjonijiet u d-durata;

— Speċifikazzjoni tas-siġillant tat-truf użat u kemm-il darba ġie applikat;

— Speċifikazzjoni ta' kwalunkwe trattament sussegwenti tal-injam, eż. speċifikazzjoni tal-fornitur, it-tip, il-karatteristiċi u t-tagħbija ta' żebgħa;

— Il-ħin u d-data ta' kull avveniment ta' tgħaddis, l-ammont ta' ilma użat għat-tgħaddis tal-kampjuni tat-test f'kull avveniment, u l-ammont ta' ilma assorbit mill-injam matul l-għodsa;

— Kwalunkwe varjazzjoni mill-metodu deskritt u kwalunkwe fattur li seta' influwenza r-riżultati.

LETTERATURA

(1) European Standard, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

Appendiċi 1

Formola ta' reġistrazzjoni għall-metodu ta' ttestjar

Stima ta' Emissjonijiet mill-Injam Ittrattat bil-Preservattiv fl-Ambjent: Metodu tal-Laboratorju għall-Komoditajiet tal-Injam li mhumiex Koperti u li huma f'Kuntatt ma' Ilma Ħelu jew Ilma Baħar

Laboratorju tat-test	
Preservattiv tal-injam	
Il-fornitur tal-preservattiv	
L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preserattiv	
L-isem kummerċjali jew komuni tal-preservattiv	
Il-koformulanti	
Ir-retenzjoni relevanti għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma	
Applikazzjoni	
Il-metodu ta' applikazzjoni	
Id-data ta' applikazzjoni	
Il-formula użata biex tiġi kkalkolata r-retenzjoni:	
Il-proċedura ta' kondizzjonament	
Id-durata tal-kondizzjonament	
Is-siġillant tat-truf / kemm-il darba ġie applikat	
It-trattament sussegwenti	jekk relevanti
Kampjuni tat-test	
Speċijiet ta' injam	
Densità tal-injam	(minimu … valur medju … massimu)
Rata ta' tkabbir (ċrieki għal kull 10 mm)	(minimu … valur medju … massimu)
Kontenut ta' umdità	

Assemblaġġi tat-test (*)	**Retenzjoni (eż. kg/m³)**
Ittrattat 'x'	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat 'y'	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat 'z'	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Mhux ittrattat	
Varjazzjoni tal-parametri tal-metodu ta' ttestjar	eż. kwalità tal-ilma, dimensjoni tal-kampjuni tat-test eċċ.

(*) x, y, z jirrappreżentaw it-tliet kampjuni tal-irreplikat

Żmien	Bidla tal-ima	Massa tal-kampjun		Teħid ta’ ilma		Kampjun ta’ ilma				
		Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat	Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat		Ilma tat-test	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nru	pH	pH	pH	pH
bidu										
6 sigħat						1				
24 siegħa						2				
jumejn						3				
4 j						4				
8 j						5				
15-il j						6				
22 j						7				
29 j						8				

Jekk jogħġbok hejji tabelli separati għal kull ingredjent attiv

Żmien	Bidla tal-Ilma	Riżultati Analitiċi														
		Kampjuni Mhux Ittrattati			Kampjuni Ttrattati											
		Konċentrazzjoni a.i fl-ilma mg/l	Kwantità emessa mg/m^2	Rata ta' emissjoni mg/m^2/jum	Konċentrazzjoni a.i. fl-ilma				Kwantità emessa				Rata ta' emissjoni			
					x	y	z	Medja	x	y	z	Medja	x	y	z	Medja
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/d	mg/m^2/d	mg/m^2/d	mg/m^2/d
6 sigħat																
24 siegħa																
jumejn																
4 j																
8 j																
15-il j																
22 j																
29 j																

Nota: Peress li r-riżultati mill-kampjuni mhux ittrattati jaf ikollhom jintużaw sabiex jiġu korretti r-rati ta' emissjoni mill-kampjuni mhux, ir-riżultati tal-mhux ittrattati għandhom jiġu l-ewwel u l-valuri kollha għall-kampjuni ttrattati jkunu 'valuri korretti'. Jista' jkun hemm ukoll korrezzjoni għall-analiżi tal-ilma inizjali.

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata b'dan il-metodu ta' ttestjar.

C.46. **BIJOAKKUMULAZZJONI F'OLIGOĊAETI BENTIĊI LI JGĦIXU FIN-NAQAL**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 315 tal-OECD (2008) Annimali endobentiċi li jinġestu n-naqal jistgħu jkunu esposti għal sustanzi maqbudin fin-naqal (1). Fost dawn l-inġesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fil-qigħan tas-sistemi akkwatiċi. Jgħixu fin-naqal u spiss jirrappreżentaw l-iktar speċijiet abbundanti, speċjalment f'ħabitats b'kundizzjonijiet ambjentali avversi għal annimali oħrajn. Minħabba l-bijoturbazzjoni tan-naqal u peress li jservu ta' priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza kbira fuq il-bijodisponibilità tat-tali sustanzi għal organiżi oħrajn, eż. ħut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi endobentiċi jħaffru fin-naqal, u jinġestu partikoli tan-naqal taħt il-wiċċ tan-naqal. Għalhekk, dawn l-organiżmi huma esposti għal sustanzi permezz ta' ħafna rotot ta' teħid, inklużi kuntatt dirett, l-inġestjoni ta' partikoli kontaminati tan-naqal, ilma tal-pori u ilma tal-madwar. Ċerti speċijiet ta' oligoċaeti bentiċi li bħalissa jintużaw fl-ittestjar ekotossikoloġiku huma deskritti fl-Appendiċi 6.

2. Il-parametri li jikkaratterizzaw il-bijoakkumulazzjoni ta' sustanza jinkludu l-ewwel u qabel kollox il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF), il-kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminiazzjoni (k_e). Id-definizzjonijiet iddettaljati ta' dawn il-parametri huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

3. Biex tivvaluta l-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi inġenerali, u biex tinvestiga l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li għandhom tendenza jinqasmu fin-naqal jew fuqu, huwa meħtieġ metodu ta' ttestjar speċifiku għall-kompartiment (1)(2)(3)(4).

4. Il-metodu ta' ttestjar huwa mfassal sabiex tiġi vvalutata l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi assoċjati man-naqal f'dud oligoċaet endobentiku. Is-sustanza tat-test hija miżjuda fin-naqal. L-użu ta' naqal miżjud huwa maħsub sabiex jissimula naqal ikkontaminat.

5. Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti ta' ttestjar tat-tossiċità u l-bijoakkumulazzjoni tan-naqal (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Dokumenti siewja oħrajn huma: id-diskussjonijiet u r-riżultati ta' sessjoni ta' ħidma internazzjonali (11), u l-eżitu ta' ringtest internazzjonali (12).

6. Dan it-test japplika għal sustanzi organiċi stabbli u newtrali, li għandhom tendenza li jaqbdu man-naqal. Il-bijoakkumulazzjoni ta' komposti metalorganiċi stabbli li jaqbdu man-naqal tista' titkejjel b'dan il-metodu wkoll (12). Mhuwiex applikabbli għal metalli u elementi traċċa oħrajn (11) bla modifika tad-disinn tat-test fir-rigward tas-substrat u l-volumi ta' ilma, u possibilment id-daqs tal-kampjun tat-tessut.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Bħalissa hemm disponibbli biss ftit Relazzjonijiet Kwantitattivi stabbiliti sew bejn l-Istruttura u l-Attività (QSAR) rigward il-proċessi ta' bijoakkumulazzjoni (14). L-iktar relazzjoni użata b'mod komuni hija l-korrelazzjoni bejn il-bijoakkumulazzjoni u l-bijokonċentrazzjoni ta' sustanzi organiċi stabbli u l-lipofiliċità tagħhom (magħtija bħala l-logaritma tal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (log K_{ow}); ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni), rispettivament, li ġiet żviluppata għad-deskrizzjoni ta' sustanza b'partizzjoni bejn l-ilma u l-ħut. Korrelazzjonijiet għall-kompartiment tan-naqal ġew stabbiliti bl-użu ta' din ir-relazzjoni wkoll (15)(16)(17)(18). Il-korrelazzjoni log K_{ow}-log tal-BCF bħala QSAR prinċipali tista' tkun siewja għall-ewwel stima preliminari tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li jaqbdu man-naqal. Madankollu, il-BAF jista' jkun influwenzat minn kontenut lipidu tal-organiżmu tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal. Għalhekk, il-koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma (K_{oc}) jista' jintuża wkoll bħala determinant importanti tal-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi organiċi assoċjati man-naqal.

8. Dan it-test huwa applikabbli għal:

— sustanzi stabbli u organiċi b'valuri tal-log K_{ow} ta' bejn 3,0 u 6,0 (5)(19) u sustanzi superlipofiliċi li juru log K_{ow} ta' iktar minn 6,0 (5);

— sustanzi li jappartjenu għal klassi ta' sustanzi organiċi magħrufin għall-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tagħhom f'organiżmi ħajjin, eż. tensjoattivi jew sustanzi ferm assorbenti (eż. K_{oc} għoli).

9. L-informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, bħal prekawzjonijiet tas-sikurezza, kundizzjonijiet u stabbiltà xierqa tal-ħżin, u metodi analitiċi għandha tinkiseb qabel jinbeda l-istudju. Gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bi karatteristiċi fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċli sabiex jiġu ttestjati hija pprovduta f'(20) u (21). Qabel ma jsir test għall-bijoakkumulazzjoni b'oligoċaeti, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, isem is-sustanza kimika (idealment l-isem tal-IUPAC), il-formula strutturali, in-numru tar-reġistru tas-CAS, il-purità;

— is-solubilità fl-ilma [metodu ta' ttestjar A.6 (22)];

— il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma, K_{ow} [il-metodi ta' ttestjar A.8, A.24 (22)];

— il-koeffiċjent ta' partizzjoni ilma/naqal, mogħti bħala K_d jew K_{oc} [metodu ta' ttestjar C,19 (22)];

— idroliżi [metodu ta' ttestjar C.7 (22)];

— fototrasformazzjoni fl-ilma (23);

— pressjoni tal-fwar [metodu ta' ttestjar A.4 (22)];

— bijodegradabilità lesta [metodi ta' ttestjar C.4 u C.29 (22)];

— tensjoni tas-superfiċje [metodu ta' ttestjar A.5 (22)];

— konċentrazzjoni kritika ta' miċelli (24).

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja — meta tkun disponibbli- tkun relevanti:

— il-bijodegradazzjoni fl-ambjent akkwatiku [metodi ta' ttestjar C.24 u C.25 (22)];

— il-kostanti tal-liġi ta' Henry.

10. Sustanzi tat-test radjuttikkettati jistgħu jħaffu l-analiżi tal-kampjuni ta' ilma, naqal u bijoloġiċi, u jistgħu jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk għandhomx jiġu identifikati u kkwantifikati l-prodotti ta' degradazzjoni. Il-metodu deskritt hawnhekk ġie vvalidat f'ringtest internazzjonali (12) għal sustanzi ttikkettati ^{14}C. Jekk jitkejlu r-residwi radjuattivi totali, il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF) ikun ibbażat fuq is-sustanza prinċipali inkluż kwalunkwe prodott ta' degradazzjoni miżmum. Huwa possibbli wkoll li studju dwar il-metaboliżmu jitgħaqqad flimkien ma' studju dwar il-bijoakkumulazzjoni b'analiżi u kwantifikazzjoni tal-perċentwal ta' sustanza prinċipali u l-prodotti ta' degradazzjoni tagħha f'kampjuni meħudin fi tmiem il-fażi ta' teħid jew fl-ogħla livell ta' bijoakkumulazzjoni. Xorta waħda dejjem huwa rrakkomandat li l-kalkolu tal-BAF ikun ibbażat fuq il-konċentrazzjoni tas-sustanza prinċipali fl-organiżmi u mhux biss fuq residwi radjuattivi totali.

11. Minbarra l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test, informazzjoni oħra li hija meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċijiet ologoċaeti li għandhom jintużaw fit-test, bħal konċentrazzjoni letali medjana (LC_{50}) għall-perjodu meħtieġ għall-fażi tat-teħid, sabiex jiġi żgurat li l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni magħżulin huma ferm inqas mil-livelli tossiċi. Jekk disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri tat-tossiċità miġjubin minn studji fit-tul fuq punti ta' tmiem subletali (EC_{50}). Jekk it-tali dejta ma tkunx disponibbli, test dwar it-tossiċità akuta fl-istess kundizzjonijiet bħall-kundizzjonijiet tat-test tal-bijoakkumulazzjoni, jew dejta dwar it-tossiċità fuq dejta ta' speċijiet surrogati oħrajn jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.

12. Irid ikun disponibbli metodu analitiku xieraq bi preċiżjoni, reqqa u sensittività magħrufin sabiex jikkwantifika s-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, fin-naqal u fil-materjal bijoloġiku, flimkien ma' dettalji tat-tħejjija u l-ħżin tal-kampjun kif ukoll l-iskedi ta' dejta ta' sigurtà tal-materjali. Għandhom ikunu magħrufin ukoll il-limiti ta' detezzjoni analitika tas-sustanza tat-test fl-ilma, in-naqal u t-tessut tad-dud. Jekk tintuża sustanza tat-test radjuttikkettata, ir-radjuattività speċifika (jiġifieri Bq mol^{-1}), il-pożizzjoni tal-atomu radjuttikkettat, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjat mal-impuritajiet iridu jkunu magħrufin ukoll. Ir-radjuattività speċifika tas-sustanza tat-test għandha tkun għolja kemm jista' jkun sabiex jinstabu l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test possibbli (11).

13. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar il-karatteristiċi tan-naqal li ser jintuża (eż. l-oriġini tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu, il-pH u l-konċentrazzjoni ta' ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal tal-għelieqi), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet; il-fażi ta' teħid (espożizzjoni) u l-fażi ta' eliminazzjoni (wara l-espożizzjoni). Matul il-fażi tat-teħid, id-dud jiġi espost għan-naqal miżjud bis-sustanza tat-test, flimkien ma' ilma rikostitwit u ekwilibrat kif xieraq (11). Il-gruppi tad-dud tal-kontroll jinżammu fl-istess kundizzjonijiet mingħajr is-sustanza tat-test.

15. Għall-fażi tal-eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit f'sistema ta' naqal u ilma ħielsa mis-sustanza tat-test. Fażi ta' eliminazzjoni hija neċessarja biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rata li biha s-sustanza tat-test titneħħa mill-organiżmi tat-test (19)(25). Fażi ta' eliminazzjoni dejjem tkun meħtieġa sakemm it-teħid tas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' espożizzjoni ma jkunx insinifikanti (eż. ma jkun hemm ebda differenza statistika bejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tat-test u tal-kontroll). Jekk ma jkunx inkiseb stat kostanti matul il-fażi tat-teħid, id-determinazzjoni tal-kinetika — il-kostanti tal-BAF_k, it-teħid u r-rata ta' eliminazzjoni — tista' ssir bl-użu tar-riżultati tal-fażi ta' eliminazzjoni. Bidla fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqhom tiġi ssorveljata matul iż-żewġ fażijiet tat-test.

16. Matul il-fażi tat-teħid, isiru kejliet sakemm il-BAF ikun laħaq plateau jew stat kostanti. Is-soltu, it-tul tal-fażi tat-teħid għandu jkun ta' 28 jum. L-esperjenza fil-prattika wriet li fażi ta' teħid ta' bejn 12 u 14-il jum hija biżżejjed sabiex bosta sustanzi organiċi newtrali stabbli jilħqu stat kostanti (6)(8)(9).

17. Madankollu, jekk l-istat kostanti ma jintlaħaqx sal-jum 28, il-fażi ta' eliminazzjoni tinbeda bit-trasferiment tal-oligoċaeti esposti fir-reċipjenti li fihom l-istess midjum mingħajr is-sustanza tat-test. Il-fażi ta' eliminazzjoni tintemm meta jew jintlaħaq il-livell ta' 10 % tal-konċentrazzjoni mkejla fid-dud fil-jum 28 tal-fażi ta' teħid, jew inkella wara tul massimu ta' 10 ijiem. Il-livell residwu fid-dud fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni jiġi rrapportat bħala punt ta' tmiem addizzjonali, eż. bħala Residwi mhux eliminati (NER). Il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF_{ss}) huwa kkalkolat idealment kemm bħala l-proporzjon ta' konċentrazzjoni f'dud (C_a) kif ukoll fin-naqal (C_s) fi stat li jidher kostanti, u bħala fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika, BAF_K bħala l-proporzjon tal-kostanti tar-rata ta' teħid min-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) jekk tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni. Jekk ma jintlaħaqx stat kostanti fi żmien 28 jum, ikkalkola l-BAF_k mill-kostanti tar-rata ta' teħid u dak tar-rata ta' eliminazzjoni. Għall-kalkolu ara l-Appendiċi 2. Jekk ma tkunx applikabbli kinetika tal-ewwel ordni, għandhom jithaddmu mudelli iktar kumplessi Appendiċi 2 u referenza (25).

18. Jekk ma jinkisibx stadju kostanti fi żmien 28 jum, il-fażi tat-teħid tista' tiġi estiża billi l-gruppi ta' dud espost — jekk possibbli — jiġu soġġetti għal iktar kejliet sakemm jintlaħaq l-istat kostanti; b'mod parallel, il-fażi ta' tneħħija xorta waħda għandha tinbeda fil-jum 28 tal-fażi ta' teħid.

19. Il-kostanti tar-rata ta' teħid, il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (jew bosta kostanti, meta jkunu involuti mudelli iktar kumplessi), il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K) u, fejn possibbli, il-limiti ta' kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri huma kkalkolati minn ekwazzjonijiet b'mudell kompjuterizzat (ara l-Appendiċi 2 għall-mudelli). Kemm kwalunkwe mudell ikun xieraq jista' jiġi stabbilit mill-koeffiċjent ta' korrelazzjoni jew il-koeffiċjent ta' determinazzjoni (koeffiċjenti qrib 1 jindikaw idoneità).

20. Biex tonqos il-varjabbiltà fir-riżultati tat-test għal sustanzi organiċi b'lipofiliċità għolja, il-fatturi tal-bijoakkumulazzjoni għandhom jingħataw ukoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-organiżmi tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku (TOC) fin-naqal (fattur ta' akkumulazzjoni ta' bijota-naqal jew BSAF f'kg TOC tan-naqal kg^{-1} ta' kontenut lipidu tad-dud). Dan l-approċċ huwa bbażat fuq esperjenzi u korrelazzjonijiet teoriċi għall-kompartiment akkwatiku, fejn — għal ċerti klassijiet ta' sustanzi kimiċi — hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal li sustanza tibbijoakkumula u l-lipofiliċità tagħha, li ġiet stabbilita sew għall-ħut bħala organiżmi mudell (14)(25)(27). Hemm anki relazzjoni bejn il-kontenut lipidu tal-ħut tat-test u l-bijoakkumulazzjoni osservata tat-tali sustanzi. Għal organiżmi bentiċi, instabu korrelazzjonijiet simili (15)(16)(17)(18). Jekk hemm biżżejjed tessut tad-dud disponibbli, il-kontenut lipidu tal-annimali tat-test jista' jiġi stabbilit fuq l-istess materjal bijoloġiku bħal dak użat sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Madankollu, huwa prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdorrijin, tal-inqas fil-bidu, jew — idealment — fl-aħħar tal-fażi tat-teħid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, li mbagħad jista' jintuża biex jiġu normalizzati l-valuri tal-BAF.

VALIDITÀ TAT-TEST

21. Sabiex test ikun validu japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-mortalità kumulattiva tad-dud (kontrolli u trattamenti) sa tmiem it-test ma għandhiex taqbeż l-20 % tan-numru inizjali.

— Barra minn hekk, għandu jintwera li d-dud iħaffer fin-naqal sabiex jiġi espost sal-livell massimu. Għad-dettalji ara l-paragrafu 28.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċijiet tat-test

22. Għat-test jistgħu jintużaw bosta speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi. L-iktar speċijiet użati spiss huma elenkati fl-Appendiċi 6.

23. It-testijiet tat-tossiċità (96 siegħa, fl-ilma biss) għandhom isiru f'intervalli regolari (eż. kull xahar) b'tossikant ta' referenza bħall-klorur tal-potassju (KCl) jew sulfat tar-ram ($CuSO_4$) (1) sabiex jintwerew il-kundizzjonijiet tas-saħħa tal-annimali tat-test (1)(6). Jekk it-testijiet tat-tossiċità ta' referenza ma jsirux kull ċertu żmien, il-lott tal-organiżmi li għandhom jintużaw f'test tal-bijoakkumulazzjoni tan-naqal għandu jiġi vverifikat bl-użu ta' tossikant ta' referenza. Il-kejl tal-kontenut lipidu jista' jservi wkoll ta' informazzjoni siewja dwar il-kundizzjoni tal-annimali.

Koltura tal-organiżmi tat-test

24. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-twettiq ta' testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud jaf ikollu jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti ta' speċi waħda. Il-metodi tal-koltura tal-laboratorju għall-ispeċi magħżula tat-test huma spjegati fil-qosor fl-Appendiċi 6. Għad-dettalji ara r-referenzi (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparat

25. Ara li tevita milli tuża materjali għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jinħallu, jassorbu sustanzi tat-test jew inixxu sustanzi oħrajn u għandhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Il-kompartimenti rettangolari jew ċilindriċi standard, magħmulin minn materjal kimikament inerti u b'kapaċità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri jista' jintuża n-numru ta' dud tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik rotob għall-għoti tal-ilma jew l-arja. Għandhom jintużaw politetrafluworoetilen, azzar inossidabbli u/jew ħġieġ għal kwalunkwe tagħmir li jidħol f'kuntatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi b'koeffiċjenti ta' assorbiment għoljin, bħal piretrojdi sintetiċi, jaf ikun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir ikollu jintrema wara li jintuża (5). Għal sustanzi tat-test radjutikkettati, u għal sustanzi volatili, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat strippaġġ u l-ħruġ ta' sustanza tat-test strippata. Għandhom jintużaw nases (eż. fliexken tal-ħasil tal-gass tal-ħġieġ) li fihom assorbimenti xierqa biex iżommu kwalunkwe residwu li jevapora mill-kompartimenti tat-test (11).

Ilma

26. L-ilma tal-madwar irid ikun ta' kwalità li tippermetti li l-ispeċijiet tat-test jibqgħu ħajjin matul il-perjodi ta' akklimazzjoni u tat-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 (25) huwa rrakkomandat sabiex jintuża bħala ilma tal-madwar fit-testijiet kif ukoll fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud. Intwera li bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru, u jirriproduċu f'dan l-ilma (8), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u tal-koltura. L-ilma għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-pH, il-kondottività u l-ebusija. L-analiżi tal-ilma għal mikroinkwinanti qabel l-użu tista' tipprovdi informazzjoni siewja (Appendiċi 4).

27. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' test. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandha tkun ta' bejn 6 u 9. L-ebusija totali għandha tkun ta' bejn 90 u 400 mg $CaCO_3$ għal kull litru fil-bidu tat-test (7). Il-meded għall-pH u l-ebusija fl-ilma rikostitwit imsemmi jingħataw fil-metodu ta' ttestjar C.1 (25). Jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija. L-Appendiċi 4 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizjonali ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli skont it-TG 210 tal-OECD (34).

Naqal

28. In-naqal irid ikun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u, idealment, ir-riproduzzjoni tal-organiżmi tat-test sad-durata tal-perjodi tad-drawwa u t-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Id-dud għandu jħaffer fin-naqal. L-imġiba ta' tħaffir jista' jkollha influwenza fuq l-espożizzjoni, u konsegwentement fuq il-BAF. Għalhekk, imġiba ta' evitar jew tħaffir tan-naqal mill-organiżmi tat-test għandha tiġi rreġistrata, meta ċ-ċarezza tal-ilma tal-madwar tippermetti li jsiru osservazzjonijiet bħal dawn. Id-dud (kontroll u trattamenti) għandu jħaffer fin-naqal fi ħdan perjodu ta' 24 siegħa minn meta jiddaħħal fir-reċipjenti tat-test. Jekk jiġi osservat nuqqas ta' tħaffir jew evitar tan-naqal b'mod permanenti (eż. iktar minn 20 % tul iktar minn nofs il-fażi tat-teħid), dan jindika li jew il-kundizzjonijiet tat-test mhumiex xierqa, jew inkella l-organiżmi tat-test mhumiex b'saħħithom, jew li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tikkaġuna din l-imġiba. F'dan il-każ, it-test għandu jitwaqqaf u jerġa' jsir f'kundizzjonijiet aħjar. Informazzjoni addizzjonali dwar l-inġestjoni tan-naqal tista' tinkiseb bl-użu tal-metodi deskritti f'(35)(36), li jispeċifikaw l-inġestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-partikoli fl-organiżmi tat-test. Jekk osservabbli, tal-inqas il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt fuq il-wiċċ tan-naqal, li jindikaw inġestjoni tan-naqal mid-dud, trid tiġi rreġistrata u kkunsidrata fl-interpretazzjoni tar-riżutati tat-test fir-rigward tal-passaġġi ta' espożizzjoni.

29. Naqal artifiċjali bbażat fuq il-ħamrija artifiċjali deskritta fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fiż-żewġ testijiet u fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud (Appendiċi 5), peress li naqal naturali ta' kwalità xierqa jaf ma jkunx disponibbli tul is-sena. Barra minn hekk, l-organiżmi indiġeni kif ukoll il-preżenza possibbli ta' mikroinkwinanti f'naqal naturali jistgħu jinfluwenzaw it-test. Bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru u jirriproduċu fin-naqal artifiċjali (8).

30. In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-oriġini tal-kostitwenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-ħbub (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox mhuwiex obbligatorju. Madankollu, naqal naturali minn siti mhux imniġġsin jista' jservi bħala naqal tat-test u/jew tal-koltura (1). Naqal naturali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-oriġini (sit ta' ġbir), il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori, il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) u l-kontenut perċentwali ta' ilma (6). Huwa rrakkomandat li, qabel jiżdied bis-sustanza tat-test, in-naqal naturali jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li huma prevalenti fit-test sussegwenti, jekk ikun mistenni li tiżviluppa l-ammonijaka. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Analiżi tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu għall-mikroinkwinanti qabel jintużaw tista' tipprovdi informazzjoni siewja.

Tħejjija

31. It-tqandil ta' naqal naturali qabel jintuża fil-laboratorju huwa deskritt f'(1)(6)(44). It-tħejjija tan-naqal artifiċjali hija deskritta fl-Appendiċi 5.

Ħżin

32. In-naqal naturali għandu jinħażen fil-laboratorju għall-inqas żmien possibbli. L-EPA tal-Istati Uniti (6) tirrakkomanda perjodu massimu ta' ħżin ta' 8 ġimgħat f'4 ± 2 °C fid-dlam. Ma għandux ikun hemm spazju vojt fuqani fuq in-naqal fil-kontenituri tal-ħżin. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-ħżin ta' naqal artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 5.

Applikazzjoni tas-sustanza tat-test

33. In-naqal huwa miżjud mas-sustanza tat-test. Il-proċedura ta' żieda tinvolvi kisi ta' kostitwent wieħed jew iktar tan-naqal bis-sustanza tat-test. Pereżempju, ir-ramel kwarzuż, jew sehem minnu (eż. 10 g tar-ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test), jistgħu jitgħaddsu f'soluzzjoni tas-sustanza tat-test f'solvent xieraq, li mbagħad tiġi evaporata bil-mod sabiex tinxef. Imbagħad, il-parti miksija tista' titħallat fin-naqal imxarrab. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-taħlita tas-sustanza tat-test u r-ramel irid jiġi kkunsidrat meta jitħejja n-naqal, jiġifieri, għalhekk, in-naqal għandu jitħejja b'inqas ramel (6).

34. B'naqal naturali, is-sustanza tat-test tista' tiddaħħal permezz ta' żieda ta' sehem imnixxef tan-naqal kif deskritt iktar 'il fuq għan-naqal artifiċjali, jew permezz ta' tħawwid tas-sustanza tat-test fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Is-solventi xierqa għaż-żieda tan-naqal imxarrab huma l-etanol, il-metanol, l-etilen glikol monometil eter, l-etilen glikol dimetil eter, id-dimetilformamid u l-glikol tat-trietilen (5)(34). It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent u s-solubilità tas-sustanza tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għażla ta' aġent solubilizzanti xieraq. F'Environment Canada (1995)(41) tingħata gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' żieda. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza tat-test li tiddaħħal man-naqal titqassam sew u b'mod indaqs fin-naqal. Is-subkampjuni tal-irreplikati tan-naqal miżjud għandhom jiġu analizzati sabiex jiġu vverifikati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fin-naqal, u sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità tat-tqassim tas-sustanza tat-test.

35. Ladarba jkun tħejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment għandek tħalli s-sustanza tat-test tinqasam bejn in-naqal u l-fażi milwiema. L-aħjar ħaġa hija li dan isir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u l-arja użati fit-test. Iż-żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza, u jista' jkun fl-ordni ta' sigħat sa jiem u f'każijiet rari jista' jieħu bosta ġimgħat (4-5 ġimgħat (28)(42). F'dan it-test, l-ekwilibriju mhuwiex mistenni iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' ekwilibriju ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Skont l-iskop tal-istudju, eż, meta jkollhom jiġu imitati l-kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwilibrat jew jitħalla jiqdiem għal perjodu itwal (11).

TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

36. Jista' jkun siewi li jsir esperiment preliminari sabiex jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tat-test definittiv, eż. għażla tal-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test u d-durata tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni. L-imġiba tad-dud, perեżempju l-evitar tan-naqal, jiġifieri d-dud jaħrab min-naqal, xi ħaġa li tista' tkun ikkaġunata mis-sustanza tat-test u/jew min-naqal stess, għandha tiġi osservata u rreġistrata matul test preliminari. L-evitar tan-naqal jista' jintuża wkoll bħala parametru subletali f'test preliminari sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test li għandha tintuża f'test tal-bijoakkumulazzjoni.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni

Durata tal-fażi ta' teħid

37. L-organiżmi tat-test huma esposti għas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' teħid. L-ewwel kampjun għandu jittieħed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' teħid. Il-fażi ta' teħid għandha ddum għaddejja sa 28 jum (1)(6)(11) sakemm ma jkunx jista' jintwera li ntlaħaq ekwilibriju qabel. L-istat kostanti jseħħ meta: (1) plott tal-fatturi ta' bijoakkumulazzjoni f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien huwa parallel għall-assi taż-żmien; (ii) tliet analiżijiet suċċessivi tal-BAF li saru fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' tal-inqas jumejn ma jvarjawx minn xulxin b'iktar minn ± 20 %; u (iii) ma hemm ebda differenza sinifikanti bejn it-tliet perjodi ta' kampjunar (fuq il-bażi ta' paraguni statistiċi, eż. analiżi tal-varjanza u analiżi tar-rigressjoni). Jekk l-istat kostanti ma jkunx għadu ntlaħaq sal-jum 28, il-fażi ta' teħid tista' tintemm billi tinbeda l-fażi ta' eliminazzjoni, u l-BAF_K jista' jiġi kkalkolat mill-kostanti tar-rata ta' teħid u eliminazzjoni (ara wkoll il-paragrafi 16 sa 18).

Durata tal-fażi ta' eliminazzjoni

38. L-ewwel kampjun għandu jittieħed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, peress li matul il-perjodu inizjali, jistgħu jseħħu bidliet rapidi fir-residwu tat-tessut. Huwa rrakkomandat li tintemm il-fażi ta' eliminazzjoni meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tkun inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni ta' stat kostanti, jew inkella wara durata massima ta' 10 ijiem. Il-livell ta' residwu fid-dud fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni huwa rrapportat bħala punt ta' tmiem sekondarju. Madankollu, il-perjodu jista' jkun irregolat mill-perjodu li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tibqa' ogħla mil-limitu ta' detezzjoni analitika.

Organiżmi tat-test

Numru ta' dud tat-test

39. In-numru ta' dud għal kull kampun irid jipprovdi massa ta' tessut tad-dud b'tali mod li l-massa tas-sustanza tat-test għal kull kampjun fil-bidu tal-fażi ta' teħid u fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni, rispettivament, tkun ferm ogħla mil-limitu ta' detezzjoni għas-sustanza tat-test f'materjal bijoloġiku. Fl-istadji msemmijin tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni, il-konċentrazzjoni fl-annimali tat-test normalment tkun relattivament baxxa (6)(8)(18). Peress li l-piż individwali f'ħafna speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi huwa baxx ħafna (5-10 mg piż imxarrab għal kull individwu għal *Lumbriculus variegatus* u *Tubifex tubifex*), id-dud ta' kompartiment tat-test ta' rreplikat partikolari jista' jiġi raggruppat sabiex jintiżen u għal analiżi tas-sustanza kimika tat-test. Għal speċijiet tat-test b'piż individwali ikbar (eż. *Branchiura sowerbyi*) jistgħu jintużaw irreplikati li fihom individwu wieħed, iżda f'dawn il-każijiet in-numru ta' rreplikati għandu jiżdied għal ħamsa għal kull punt ta' kampjunar (11). Madankollu, ta' min jinnota li *B. sowerbyi* ma kienx inkluż fir-ringtest (12), u għalhekk mhuwiex rakkomandat bħala speċi ideali fil-metodu.

40. Għandu jintuża dud ta' daqs simili (għal *L. variegatus* ara l-Appendiċi 6). Għandu jkun ġej mill-istess sors, u għandu jkun adult jew kbir tal-istess klassi ta' età (ara l-Appendiċi 6). Il-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett sinifikanti fuq il-valuri tal-BAF (eż. minħabba kontenut lipidu differenti u/jew il-preżenza ta' bajd); dawn il-parametri għandhom jiġu rreġistrati bi preċiżjoni. Biex tkejjel il-piż xott u mxarrab medju għandu jintiżen subkampjun ta' dud qabel ma jibda t-test.

41. B'*Tubifex tubifex* u *Lumbriculus variegatus*, ir-riproduzzjoni hija mistennija matul il-perjodu ta' ttestjar. Nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' bijoakkumulazzjoni għandu jiġi rreġistrat, u kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

Tagħbija

42. Għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' naqal għall-ilma u ilma għad-dud sabiex jiġi mminimizzat it-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal matul il-fażi ta' teħid, u sabiex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt. Ir-rata ta' tagħbija magħżula għandha tkun tikkorrispondi wkoll għal densitajiet tal-popolazzjoni li jseħħu b'mod naturali tal-ispeċi magħżula (43). Pereżempju, għal *Tubifex tubifex* hija rrakkomandata rata ta' tagħbija ta' 1-4 mg ta' tessut tad-dud (piż imxarrab) għal kull gramma naqal imxarrab (8)(11). Ir-referenzi (1) u (6) jirrakkomandaw rata ta' tagħbija ta' ≤1 g piż xott tat-tessut tad-dud għal kull 50 g ta' karbonju organiku tan-naqal għal *L. variegatus*.

43. Id-dud li ser jintuża f'test jitneħħa mill-koltura billi n-naqal tal-koltura jingħadda minn passatur. L-annimali (dud adult jew kbir bla sinjali ta' frammentazzjoni riċenti) jiġu ttrasferiti f'dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test ivarjaw mill-kundizzjonijiet tal-koltura, fażi ta' drawwa ta' 24 siegħa għandha tkun biżżejjed. Qabel jintiżen, id-dud għandu jitneħħielu l-ilma żejjed. Dan jista' jsir billi d-dud jitqiegħed bil-galbu fuq karta mxarrba minn qabel. Mhuwiex rakkomandat li tintuża karta assorbenti biex jitnixxef id-dud peress li din tista' tikkaġuna stress jew ħsara lid-dud. Brunson et al. (1998) irrakkomanda l-użu ta' dud mhux ixxottat b'taptip ta' madwar 1,33 darba ikbar mill-bijomassa fil-mira. Dan it-33 % addizzjonali jikkorrispondi għad-differenza bejn id-dud imnixxef bit-taptip u dak li mhuwiex (28).

44. Fil-bidu tal-fażi tat-teħid (jum 0 tat-test), l-orgniżmi tat- test jitneħħew mill-kompartiment ta' akklimatizzazzjoni u jitqassmu għal għarrieda f'reċipjenti (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma rikostitwit billi jiddaħħlu gruppi ta' żewġ dud f'kull reċipent, sakemm kull reċipjent ikun fih għaxar dud. Imbagħad, kull wieħed minn dawn il-gruppi jiġi ttrasferit għal għarrieda f'reċipjenti tat-test separati, eż. bl-użu ta' forċipi tal-azzar ħafif. Imbagħad ir-reċipjenti tat-test jiġu inkubati fil-kundizzjonijiet tat-test.

Tmigħ

45. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors tal-ikel. Sabiex ma tiġix sottovalutata l-espożizzjoni tal-organiżmi tat-test, eż. bit-tmigħ selettiv ta' ikel mhux kontaminat, l-ikel meħtieġ għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tat-test għandu jiddaħħal fin-naqal darba qabel jew matul l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test (ara l-Appendiċi 5).

Proporzjon ta' naqal u ilma

46. Il-proporzjon ta' naqal u ilma rrakkomandat huwa ta' 1:4 (45). Dan il-proporzjon jitqies xieraq sabiex il-konċentrazzjonijiet ta' ossiġenu jinżammu f'livelli xierqa u sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni tal-ammonijaka fl-ilma tal-madwar. Il-kontenut ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar għandu jinżamm f'saturazzjoni ta' ≥ 40 %. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jingħata ftit arja (eż. 2 — 4 ibżieżaq fis-sekonda) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda madwar 2 cm 'il fuq mill-wiċċ tan-naqal sabiex tonqos kemm jista' jkun il-perturbazzjoni tan-naqal.

Dawl u temperatura

47. Il-fotoperjodu fil-koltura u t-test huwa ta' 16-il siegħa (1)(6). L-intensità tad-dawl fiż-żona tat-test għandha tinżamm għal madwar 500-1 000 lx. It-temperatura għandha tinżamm 20 ± 2 °C matul it-test.

Konċentrazzjonijiet tat-test

48. Tintuża konċentrazzjoni waħda tat-test (l-inqas possibbli) sabiex tiġi stabbilita l-kinetika tat-teħid, iżda tista' tintuża konċentrazzjoni oħra (ogħla) (eż. (46)). F'dak il-każ, il-kampjuni jittieħdu u jiġu analizzati fi stat kostanti jew wara l-jum 28 sabiex jiġi kkonfermat il-BAF imkejjel fl-inqas konċentrazzjoni (11). Il-konċentrazzjoni superjuri għandha tingħażel sabiex ikunu jistgħu jiġu esklużi l-effetti avversi (eż. bl-għażla ta' madwar 1 % tal-inqas konċentrazzjoni tal-effett kroniku magħrufa EC_x kif derivata mill-istudji relevanti dwar it-tossiċità kronika). L-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun ferm ogħla mil-limitu ta' detezzjoni fil-kampjuni tan-naqal u bijoloġiċi bil-metodu analitiku użat. Jekk il-konċentrazzjoni tal-effett tas-sustanza tat-test tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitiku, huwa rrakkomandat li tintuża sustanza tat-test radjutikkettata b'radjuattività speċifika għolja.

Irreplikati Ttrattati u tal-Kontroll

49. In-numru minimu ta' rreplikati ttrattati għall-kejliet kinetiċi għandu jkun tal-inqas tlieta għal kull punt ta' kampjunar (11) matul il-fażi ta' teħid u eliminazzjoni. Irreplikati addizzjonali għandhom jintużaw eż. għal dati ta' kampjunar addizzjonali mhux obbligatorji. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, jitħejja numru ndaqs ta' rreplikati b'naqal mhux miżjud u ilma tal-madwar, sabiex id-dud ittrattat ikun jista' jiġi ttrasferit mir-reċipjenti ttrattati magħżulin f'reċipjenti mhux ittrattati fi tmiem il-fażi tat-teħid. In-numru totali ta' rreplikati ttrattati għandu jkun biżżejjed kemm għall-fażi ta' teħid kif ukoll għal dik ta' eliminazzjoni.

50. Inkella, id-dud magħżul għall-kampjunar matul il-fażi ta' eliminazzjoni jista' jkun espost f'kontenitur kbir li fih naqal miżjud tal-istess lott bħal dak użat għall-kinetika tat-teħid. Għandu jintwera li l-kundizzjonijiet tat-test (eż. fond tan-naqal, proporzjon ta' ilma/naqal, tagħbija, temperatura, kwalità tal-ilma) huma paragunabbli għall-irreplikati magħżulin għall-fażi tat-teħid. Fi tmiem il-fażi tat-teħid, il-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud għandhom jittieħdu minn dan il-kontenitur sabiex jiġu analizzati, u għandu jitneħħa numru suffiċjenti ta' dud kbir li ma juri ebda sinjal ta' frammentazzjoni riċenti biex jiġi ttrasferit fl-irrepikati mħejjin għall-fażi ta' eliminazzjoni (eż. għaxar organiżmi għal kull reċipjent tal-irreplikati).

51. Jekk ma jintuża ebda solvent ieħor għajr l-ilma, għandhom jiġu pprovduti tal-inqas 9 irreplikati ta' kontroll negattiv (tal-inqas 3 kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem it-teħid u 3 fi tmiem l-eliminazzjoni) għal analiżi bijoloġika u tal-isfond. Jekk jintuża xi aġent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, għandu jsir kontroll bis-solvent (tal-inqas 3 irreplikati għandhom jiġu kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem il-fażi tat-teħid, u 3 fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni). F'dan il-każ, tal-inqas għandhom jiġu pprovduti 4 irreplikati ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għall-kampjunar fi tmiem il-fażi tat-teħid. Dawn l-irreplikati jistgħu jitqabblu bijoloġikament mal-kontroll bis-solvent sabiex tinkiseb informazzjoni fuq l-influwenza possibbli tas-solvent fuq l-organiżmi tat-test. Id-dettalji jingħataw fl-Appendiċi 3.

Il-frekwenza tal-kejliet tal-kwalità tal-ilma

52. Tal-inqas, għandhom jitkejlu l-parametri tal-ilma li ġejjin fl-ilma tal-madwar matul il-fażi ta' teħid u eliminazzjoni:

It-temperatura	f'reċipjent wieħed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u f'reċipjent wieħed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni; tista' tiġi rreġistrata wkoll it-temperatura fil-midjum tal-madwar (arja ambjentali jew banjumarija) jew f'reċipjent rappreżentattiv wieħed tat-test eż. f'intervalli kontinwi jew fis-siegħa;
Il-kontenut ta' ossiġenu dissolt	f'reċipjent wieħed ta' kull livell tat-trattament, u f'reċipjent tal-kontroll wieħed għal kull data ta' kampjunar; mogħti bħala mg/L u % ASV (valur tas-saturazzjoni tal-arja);
Il-provvista tal-arja	kkontrollata tal-inqas darba kuljum (jiem tax-xogħol) u aġġustata jekk ikun hemm bżonn;
Il-pH	f'reċipjent ittrattat wieħed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u f'reċipjent wieħed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni;
L-ebusija totali tal-ilma	tal-inqas f'reċipjent ittrattat wieħed u reċipjent tat-test tal-kontroll fil-bidu u fi tmiem il-perjodu tat-teħid u ta' eliminazzjoni, mogħti bħala mg/l $CaCO_3$;
Il-kontenut totali ta' ammonijaka	tal-inqas f'reċipjent ittrattat wieħed u reċipjent tat-test tal-kontroll wieħed fil-bidu u fi tmiem il-perjodu ta' teħid u eliminazzjoni; mogħti bħala mg/l NH_4^+ jew NH_3 jew l-ammonijaka totali-N.

Kampjunar u analiżi tad-dud, in-naqal u l-ilma

Skeda tal-Kampjunar

53. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji tal-iskedi ta' kampjunar għal fażi ta' teħid ta' 28 jum u fażi ta' eliminazzjoni ta' 10 ijiem.

54. Ħu kampjun tal-ilma u n-naqal mill-kompartimenti tat-test sabiex tistabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma jiddaħħal id-dud, u matul il-fażi ta' teħid kif ukoll ta' eliminazzjoni. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test jiġu stabbiliti fid-dud, in-naqal u l-ilma sabiex jiġi ssorveljat it-tqassim tas-sustanza tat-test fil-kompartimenti tas-sistema tat-test.

55. Ħu kampjun tad-dud, in-naqal u l-ilma tal-inqas sitt darbiet matul il-fażi tat-teħid kif ukoll dik ta' eliminazzjoni.

56. Kompli ħu kampjuni sakemm jiġi stabbilit plateau (stat kostanti) (ara l-Appendiċi 1) jew għal 28 jum. Jekk il-plateau ma jintlaħaqx fi żmien 28 jum, ibda bil-fażi ta' eliminazzjoni. Meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, ittrasferixxi d-dud magħżul biex tirreplika l-kompartimenti li fihom naqal mhux ittrattat u ilma (ara wkoll il-paragrafi 17 u 18).

Kampjunar u tħejjija tal-kampjun

57. Ikseb kampjuni tal-ilma b'dekantazzjoni, tbattil b'pajp jew pipetta ta' volum suffiċjenti biex tkun tista' tkejjel il-kwantità tas-sustanza tat-test fil-kampjun.

58. L-ilma tal-madwar li jifdal jiġi dekantat jew jitbattal b'pajp bil-galbu mill-kompartiment(i) tat-test. Il-kampjuni tan-naqal għandhom jittieħdu bil-galbu, b'tali mod li jikkaġunaw tfixkil minimu lid-dud.

59. Neħħi d-dud kollu mill-irreplikat tat-test fil-ħin tal-kampjunar, eż. billi tissospendi n-naqal bl-ilma tal-madwar u tifrex il-kontenuti ta' kull irreplikat fuq trej baxxa u billi taqbad id-dud billi tuża forċipi tal-azzar artab. Laħlaħhom malajr bl-ilma fi trej baxxa tal-ħġieġ jew tal-azzar. Neħħi l-ilma żejjed. Ittrasferixxi d-dud bil-galbu f'reċipjent li ntiżen minn qabel u iżinhom. Issagrifika d-dud billi tiffriża (eż. ≤ – 18 °C). Il-preżenza u n-numru ta' fosdqiet tal-larva u/jew żgħar għandhom jiġu rreġistrati.

60. B'mod ġenerali, id-dud għandu jintiżen u jiġi ssagrifikat eżatt wara l-kampjunar mingħajr fażi ta' żvujtar tal-imsaren biex jinkiseb BAF konservattiv li jinkludi kontenut kontaminat tal-imsaren, u jiġi evitat it-telf tar-residwi tal-ġisem matul kwalunkwe perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss (8). Sustanzi b'log K_{ow} ta' iktar minn 5 mhumiex mistennijin li jiġu eliminati b'mod sinifikanti matul xi perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss, filwaqt li sustanzi b'log Kow ta' inqas minn 4 jistgħu jintilfu f'ammonti notevoli (47).

61. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jiżvojta l-imsaren tiegħu f'naqal nadif. Dan ifisser li l-kejliet eżatt qabel il-fażi ta' eliminazzjoni jinkludu naqal bl-imsaren ikkontaminat, filwaqt li wara l-ewwel 4-24 siegħa tal-fażi ta' eliminazzjoni, ħafna mill-kontenut tal-imsaren ikkontaminat huwa supponut li jkun ġie sostitwit minn naqal nadif (11)(47). Imbagħad, il-konċentrazzjoni fid-dud ta' dan il-kampjun tista' titqies bħala l-konċentrazzjoni tat-tessut wara l-iżvujtar tal-imsaren. Biex jingħata kont għad-dilwizzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal mhux ikkontaminat matul il-fażi ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut tal-imsaren jista' jiġi stmat mill-proporzjonijiet tal-piż imxarrab tad-dud/piż tal-irmied tad-dud jew il-piż xott tad-dud/piż tal-irmied tad-dud.

62. Jekk l-iskop ta' studju speċifiku jkun li jkejjel il-bijodisponibilità u r-residwi tat-tessuti veri fl-organiżmi tat-test, f'dak il-każ tal-inqas subkampjun ta' annimali ttrattati (eż. mit-tliet reċipjenti tal-irreplikati addizzjonali), idealment kampjunati matul stat kostanti, għandhom jintiżnu, jiżvojtaw f'ilma nadif għal perjodu ta' 6 sigħat (47), u jerġgħu jintiżnu qabel l-analiżi. Imbagħad, id-dejta dwar il-piż tad-dud u l-konċentrazzjoni fil-ġisem ta' dan is-subkampjun tista' titqabbel mal-valuri miksubin minn dud li ma żvojtax. Id-dud magħżul sabiex titkejjel l-eliminazzjoni ma għandux jiżvojta qabel it-trasferiment f'naqal nadif sabiex jiġi mminimizzat l-istress żejjed għall-annimali.

63. Idealment analizza l-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud eżatt (jiġifieri fi żmien jum sa jumejn) wara t-tneħħija sabiex tevita degradazzjoni jew telf ieħor u tikkalkola r-rati ta' teħid u eliminazzjoni approssimati int u tipproċedi bit-test. Analiżi minnufih tevita wkoll dewmien fl-istabbiliment ta' jekk intlaħaqx plateau.

64. Jekk ma ssirx analiżi minnufih, il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Ikseb informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-kundizzjonijiet xierqa ta' ħżin għas-sustanza tat-test partikolari qabel tibda l-istudju, (eż. id-durata u t-temperatura tal-ħżin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ.). Jekk it-tali informazzjoni ma tkunx disponibbli u jiġi ġġudikat li hija neċessarja, jistgħu jsiru tessuti tal-kontroll miżjudin fl-istess ħin sabiex tiġi stabbilita l-istabbiltà tal-ħżin.

Kwalità tal-metodu analitiku

65. Peress li essenzjalment il-proċedura sħiħa hija rregolata mill-preċiżjoni, ir-reqqa u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza tat-test, ivverifika bl-esperimenti li l-preċiżjoni u r-riproduċibilità tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza tat-test mill-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Barra minn hekk, għandek tivverifika li s-sustanza tat-test ma tinsabx fil-kompartimenti tal-kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla mill-isfond. Jekk ikun hemm bżonn, ikkoreġi l-valuri ta' C_w, C_s u C_a għall-irkupri u l-valuri ta' sfond tal-kontrolli. Qandel il-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li tnaqqas kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-assorbiment tas-sustanza tat-test fuq l-apparat tal-kampjunar).

66. L-irkupru ġenerali u l-irkupru tas-sustanza tat-test fid-dud, in-naqal, l-ilma u, jekk jintużaw, fin-nases li fihom l-assorbenti biex iżommu s-sustanza tat-test evaporata, għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati.

67. Peress li huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi radjutikkettati, huwa possibbli li tiġi analizzata r-radjuattività totali (jiġifieri l-prodotti prinċipali u ta' degradazzjoni). Madankollu, jekk din tkun analitikament fattibbli, il-kwantifikazzjoni tas-sustanza prinċipali u l-prodotti ta' degradazzjoni fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-teħid tista' tipprovdi informazzjoni importanti. Jekk huwa maħsub li ser isiru t-tali kejliet, il-kampjuni għandhom jiġu soġġetti għal proċeduri xierqa ta' estrazzjoni sabiex is-sustanza prinċipali tkun tista' tiġi kkwantifikata għaliha. Meta prodott ta' degradazzjoni identifikat ikun jirrappreżenta perċentwal importanti (eż. > 10 %) mir-radjuattività mkejla fl-organiżmi tat-test fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-teħid, huwa rrakkomandat li jiġu identifikati t-tali prodotti ta' degradazzjoni (5).

68. Minħabba bijomassa individwali baxxa, spiss ma jkunx possibbli li tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'kull dudu individwali, sakemm ma tintużax Branchiura sowerbyi (40-50 mg piż imxarrab għal kull dudu) bħala speċi tat-test (11). Għaldaqstant, ir-raggruppament tal-individwi kampjunati minn reċipjent tat-test partikolari huwa aċċettabbli, iżda dan jillimita l-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu applikati għad-dejta. Jekk proċedura statistika speċifika u s-saħħa huma kunsiderazzjonijiet importanti, f'dak il-każ fit-test għandu jiġi inkluż numru adegwat ta' annimali tat-test u/jew kompartimenti tat-test tal-irreplikati sabiex jilqgħu ir-raggruppament, proċedura u saħħa meħtieġa.

69. Huwa rrakkomandat li l-BAF jingħata kemm bħala funzjoni tal-piż imxarrab totali u l-piż xott totali kif ukoll, meta meħtieġ (eż. għal sustanzi ferm lipofiliċi) bħala funzjoni tal-kontenut lipidu u t-TOC tan-naqal. Għandhom jintużaw metodi xierqa sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu (48)(49). It-teknika ta' estrazzjoni bil-kloroform/metanol (50) tista' tkun irrakkomandata bħala metodu standard (48). Madankollu, biex tevita milli tuża solventi klorinati, tista' tintuża modifika ringtested tal-metodu Bligh & Dyer (50) kif deskritt f'(51). Peress li bosta metodi ma jagħtux l-istess valuri (48), importanti li tispjega l-metodu użat fid-dettall. Meta jkun possibbli, jiġifieri jekk ikun hemm biżżejjed tessut tad-dud, il-kontenut lipidu jitkejjel fl-istess kampjun jew estratt bħal dak prodott għall-analiżi tas-sustanza tat-test, peress li spiss il-lipidi jkunu jridu jitneħħew mill-estratt qabel jiġi analizzat bi kromatografija (5). Madankollu, huwa prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdorrijin tal-inqas fil-bidu jew — idealment — fi tmiem il-fażi tat-teħid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, eż. fi tliet kampjuni.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

70. Il-kurva tat-teħid tas-sustanza tat-test tinkiseb billi fl-iskala aritmetika tipplottja l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqu matul il-fażi tat-teħid kontra ż-żmien. Jekk il-kurva laħqet plateau, ikkalkola l-BAF_{ss} tal-istat kostanti:

$$\frac{C_a \text{ fi stat kostanti jew fil-jum 28 (medja)}}{C_s \text{ fi stat kostanti jew fil-jum 28 (medja)}}$$

71. Stabbilixxi l-fattur tal-bijoakkumulazzjoni kinetika (BAFK) bħala l-proporzjon ks/ke. Normalment il-kostanti ta' eliminazzjoni (ke) jiġi stabbilit mill-kurva ta' eliminazzjoni (jiġifieri plott tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud matul il-fażi ta' eliminazzjoni). Imbagħad il-kostanti tar-rata tat-teħid ks jiġi kkalkolat mill-kinetika tal-kurva tat-teħid. Il-metodu ppreferit għall-kisba tal-BAFK u l-kostanti tar-rata, ks u ke, huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter (ara l-Appendiċi 2). Jekk l-eliminazzjoni ovvjament mhijiex l-ewwel ordni, f'dak il-każ għandhom jitħaddmu mudelli iktar kumplessi (25)(27)(52).

72. Il-fattur ta' akkumulazzjoni tan-naqal-bijota (BSAF) huwa stabbilit billi jiġi normalizzat il-BAFK għall-kontenut lipidu tad-dud u l-kontenut ta' karbonju organiku totali tan-naqal.

Interpretazzjoni tar-riżultati

73. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tal-konċentrazzjonijiet tat-test iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat.

74. Kurvi ta' teħid u eliminazzjoni ddefiniti ċari huma indikazzjoni ta' dejta dwar il-bijoakkumulazzjoni ta' kwalità tajba. Ġeneralment, il-limiti tal-kunfidenza għall-valuri tal-BAF minn studji ddiżinjati kif suppost ma jaqbżux il-25 % (5).

Rapport tat-test

75. Ir-rapport tat-test irid ikun jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sustanza tat-test

— l-għamla fiżika u, il-karatteristiċi fiżikokimiċi, eż. il-log K_{ow}, is-solubilità fl-ilma;

— dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika; is-sors tas-sustanza tat-test, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat;

— jekk radjutikkettata, il-pożizzjoni eżatta tal-atomi tikkettati, ir-radjuattività speċifika, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjata mal-impuritajiet.

Speċijiet tat-test

— l-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors, kwalunkwe pretrattament, l-akklimazzjoni, l-età, il-medda ta' daqsijiet, eċċ..

Kundizzjonijiet tat-test

— il-proċedura tat-test użata (eż. statiku, semistatiku jew bi fluss kontinwu);

— it-tip u l-karatteristiċi tal-illuminazzjoni użata u l-fotoperjodu/i;

— id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kompartimenti tat-test, il-volum ta' ilma, il-massa u l-volum tan-naqal, ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum ta' ilma (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiċi), kwalunkwe arja li tingħata qabel u matul it-test, in-numru ta' rreplikati, in-numru ta' dud għal kull irreplikat, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni, il-frekwenza tal-kampjunar);

— il-metodu ta' tħejjija u applikazzjoni tas-sustanza tat-test kif ukoll ir-raġunijiet għall-għażla ta' metodu speċifiku;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test;

— is-sors tal-kostitwenti tal-ilma u n-naqal artifiċjali jew — jekk jintużaw midjums naturali — l-oriġini tal-ilma u n-naqal, deskrizzjoni ta' kwalunkwe pretrattament, ir-riżultati ta' kwalunkwe wiri tal-ħila tal-annimali tat-test sabiex jgħixu u/jew jirriproduċu fil-midjums użati, il-karatteristiċi tan-naqal (il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal naturali), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut perċentwali ta' ilma, u kwalunkwe kejl ieħor li sar) u l-karatteristiċi tal-ilma (il-pH, l-ebusija, il-kondottività, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt, il-livelli ta' klorur residwu (jekk imkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li sar);

— il-piż xott nominali u mkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal artifiċjali; il-piż xott imkejjel f' % tal-piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) għal naqal mill-għelieqi;

— il-kwalità tal-ilma fi ħdan il-kompartimenti tat-test kif ikkaratterizzata mit-temperatura, il-pH, l-ammonijaka, l-ebusija totali u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;

— informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud, inklużi dettalji dwar it-tħejjija, il-ħżin, il-proċeduri ta' żieda, l-estrazzjoni u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanzatat-test u l-kontenut lipidu, u l-irkupru tas-sustanza tat-test.

Riżultati

— il-mortalità tad-dud tal-kontroll u d-dud f'kull kompartiment tat-test u kwalunkwe effett subletali osservat inkluża mġiba anormali (eż., evitar tan-naqal, il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt, nuqqas ta' riproduzzjoni);

— il-piż xott imkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal u l-organiżmi tat-test (utli għan-normalizzazzjoni);

— il-kontenut lipidu tad-dud;

— kurvi li juru l-kinetika tat-teħid u l-eliminazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud, u ż-żmien sal-istat kostanti;

— C_a, C_s u C_w (b'devjazzjoni u medda standard, jekk xieraq) għaż-żminijiet kollha tal-kampjunar (C_a fi g kg^{-1} piż imxarrab u xott tal-ġisem sħiħ, C_s mogħti f'g kg^{-1} piż imxarrab u xott tan-naqal, u C_w f'mg l^{-1}). Jekk huwa meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal (BSAF; ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni) (eż. għal paragun tar-riżultati minn żewġ testijiet jew iktar imwettqin b'annimali b'kontenut lipidu differenti), C_a għandu jingħata wkoll bħala g kg-1 kontenut lipidu tal-organiżmu, u C_s għandu jingħata bħala g kg^{-1} karbonju organiku (OC) tan-naqal;

— BAF (mogħti f'kg naqal imxarrab kg^{-1} dud imxarrab), il-kostanti tar-rata tat-teħid tan-naqal k_s (mogħti f'g naqal imxarrab kg^{-1} tad-dud imxarrab j^{-1}), u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni k_e (mogħti fil-j^{-1}); il-BSAF (mogħti f'kg OC tan-naqal kg^{-1} kontenut lipidu tad-dud) jista' jiġi rrapportat ukoll;

— Residwi mhux eliminati (NER) fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni;

— jekk jitkejlu: il-perċentwali tas-sustanza prinċipali, il-prodotti ta' degradazzjoni, u r-residwi maqbudin (jiġifieri l-perċentwal tas-sustanza tat-test li ma jistax jiġi estratt b'metodi komuni ta' estrazzjoni) identifikati fl-annimali tat-test;

— il-metodi użati għal analiżijiet statistiċi tad-dejta.

Evalwazzjoni tar-riżultati

— il-konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 21;

— riżultati mhux mistennijin jew mhux tas-soltu, eż. eliminazzjoni mhux sħiħa tas-sustanza tat-test mill-annimali tat-test; f'dawn il-każijiet, ir-riżultati minn kwalunkwe studju preliminari jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.

Appendiċi 1

Definizzjonijiet u unitajiet

Naqal artifiċjali, jew naqal ifformulat, rikostitwit jew sintetiku huwa taħlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-**bijoakkumulazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu jew fuq organiżmu b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar. Ir-riżultati tal-bijoakkumulazzjoni kemm mill-proċess ta' bijokonċentrazzjoni kif ukoll ta' bijofokalizzazzjoni (ara iktar 'il quddiem).

Il-**fattur ta' bijoakkumulazzjoni** (BAF) fi kwalunkwe waqt matul il-fażi tat-teħid ta' dan it-test ta' bijoakkumulazzjoni huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu tat-test jew fuqu (C_a f'g kg^{-1} piż xott jew imxarrab) diviża bil-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-midjum tal-madwar (C_s bħala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal). Sabiex isir riferiment għall-unitajiet ta' C_a u C_s, il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg naqal kg^{-1} dudu (15).

Il-**fatturi ta' bijoakkumulazzjoni** kkalkolati direttament mill-proprozjon tal-kostanti tar-rata tat-teħid tan-naqal diviż bil-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e, rispettivament — ara iktar 'il quddiem) jissejħu l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K).

Il-**bijokonċentrazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organiżmu jew fuqu, li tirriżulta esklussivament mit-teħid permezz tal-wiċċ tal-ġisem, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**bijofokalizzazzjoni** hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jew f'organiżmu jew fuqu, li tirriżulta primarjament mit-teħid minn ikel jew priża kontaminati, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel jew il-priża. Il-bijofokalizzazzjoni tista' twassal għal trasferiment jew akkumulazzjoni tas-sustanza tat-test fi ħdan il-ktajjen alimentari.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal** (BSAF) huwa l-konċentrazzjoni tal-istat kostanti normalizzata għal-lipidi tas-sustanza tat-test f'organiżmu tat-test jew fuqu diviża bil-konċentrazzjoni normalizzata għall-karbonju organiku tas-sustanza fin-naqal fi stat kostanti. Imbagħad C_a jingħata bħala g kg^{-1} kontenut lipidu tal-organiżmu, u C_s bħala g kg^{-1} kontenut organiku tan-naqal.

Il-**perjodu ta' kundizzjonament** jintuża biex jiġi stabbilit il-komponent mikrobjali tan-naqal u titneħħa eż. ammonijaka li toriġina mill-komponenti tan-naqal; iseħħ qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test man-naqal. Normalment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-**eliminazzjoni** ta' sustanza tat-test hija t-telf ta' din is-sustanza mit-tessut tal-organiżmu tat-test bi proċessi attivi jew passivi li jseħħ indipendentement mill-preżenza jew l-assenza tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**fażi ta' eliminazzjoni** hija ż-żmien, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum ħieles mis-sustanza tat-test, li matulu tiġi studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-organiżmi tat-test.

Il-**kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni** (k_e) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test/fuqu, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum li fih is-sustanza tat-test għal midjum ħieles mis-sustanza kimika; k_e jingħata mogħti fil-d^{-1}.

Il-**perjodu ta' ekwilibrazzjoni** jintuża biex is-sustanza tat-test tkun tista' titqassam bejn il-fażi solida, l-ilma tal-pori u l-ilma tal-madwar; iseħħ wara li s-sustanza tat-test tiżdied man-naqal u qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma** (K_{ow}) huwa l-proporzjon tas-solubilità ta' sustanza fl-n-ottanol u fl-ilma f'ekwilibriju, xi kultant mogħti bħala P_{ow}. Il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju organiku/ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon tal-konċentrazzjoni ta' sustanza fuq jew fil-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' naqal u l-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma f'ekwilibriju.

L-**ilma tal-madwar** huwa l-ilma li jinsab fuq in-naqal fir-reċipjent tat-test.

Plateau jew **stat kostanti** huwa ddefinit bħala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' teħid u eliminazzjoni li jseħħu fl-istess ħin matul il-fażi ta' espożizzjoni. L-istat kostanti jintlaħaq fil-plott tal-BAF f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien meta l-kurva ssir parallela għall-assi taż-żmien u tliet analiżijiet suċċessivi tal-BAF li jsiru fuq kampjuni meħudin f'intervalli tal-inqas jumejn ikunu fi ħdan 20 % minn xulxin, u ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti fost it-tliet perjodi ta' kampjunar. Għas-sustanzi tat-test li jittieħdu bil-mod, intervalli ta' sebat ijiem ikunu iktar xierqa (5).

Ilma tal-pori jew ilma interstizjali huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn in-naqal jew il-partikoli tal-ħamrija.

Il-**kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal** (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test jew fuqu li tirriżulta mit-teħid mill-fażi tan-naqal. k_s jingħata fi g naqal kg^{-1} dud d^{-1}.

In-**naqal miżjud** huwa n-naqal li fih tiddaħħal is-sustanza tat-test.

Il-**fattur ta' bijoakkumulazzjoni fi stat kostanti** (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat kostanti u li ma jinbidilx ħafna matul perjodu itwal ta' żmien, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar (C_s bħala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal) li tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Il-**fażi ta' teħid jew espożizzjoni** hija ż-żmien li matulu l-organiżmi tat-test ikunu esposti għas-sustanza tat-test.

Appendiċi 2

Kalkolu tal-parametri tat-teħid u l-eliminazzjoni

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' bijoakkumulazzjoni huwa l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkolat billi tiġi diviża l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organiżmu tat-test, C_a, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal, C_s, fi stat kostanti. Jekk l-istat kostanti ma jintlaħaqx matul il-fażi tat-teħid, il-BAF jiġi kkalkolat bl-istess mod għall-jum 28. Madankollu, għandu jiġi indikat jekk il-BAF huwiex ibbażat fuq konċentrazzjonijiet fi stat kostanti jew le.

Il-mezz ippreferut sabiex jinkisbu l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K), il-kostanti tar-rata ta' teħid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter. Minħabba l-medda ta' żmien tal-fatturi medji ta' akkumulazzjoni (C_a, il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar/C_s, il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar = AF) tal-fażi tat-teħid fuq il-bażi tal-piż imxarrab tad-dud u tan-naqal, u l-ekwazzjoni mudell

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ekwazzjoni 1]}$$

fejn AF(t) huwa l-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud u l-konċentrazzjoni tagħha fin-naqal fi kwalunkwe waqt (t) tal-fażi tat-teħid, dawn il-programmi tal-kompjuter jikkalkolaw il-valuri għall-BAF_K, k_s u k_e.

Meta jintlaħaq l-istat kostanti matul il-fażi tat-teħid (jiġifieri t = ∞), l-ekwazzjoni 1 tista' titnaqqas għal:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ekwazzjoni 2]}$$

fejn

k_s = il-kostanti tar-rata tat-teħid fit-tessut [g naqal kg^{-1} dud d^{-1}]

k_e = il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni [d^{-1}]

Imbagħad $k_s/k_e \times C_s$ huwa approċċ għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tad-dud fi stat kostanti ($C_{a,ss}$).

Il-Fattur ta' Akkumulazzjoni ta' Bijota-Naqal (BSAF) għandu jiġi kkalkolat kif ġej:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

fejn foc hija l-frazzjoni tal-karbonju organiku tan-naqal, u l-flip hija l-frazzjoni tal-lipidu tad-dud, bit-tnejn li huma bbażati fuq piż xott jew inkella fuq piż imxarrab.

Minħabba l-medda ta' żmien tal-valuri tal-konċentrazzjoni, il-kinetika tal-konċentrazzjoni tista' tiġi mmudellata bl-użu tal-ekwazzjonijiet mudell li ġejjin u metodu ta' stima tal-parametru mhux lineari bbażat fuq kalkolu bil-kompjuter.

Ir-residwu mkejjel medju tal-ġisem fi tmiem il-fażi tat-teħid huwa rrakkomandat bħala l-punt tat-tluq predefinit. L-użu tal-valur immudellat/stima mill-fażi tat-teħid għandu jsir biss, eż., jekk il-valur imkejjel ivarja b'mod sinifikanti mir-residwu tal-ġisem immudellat. Ara wkoll il-paragrafu 50 għal preespożizzjoni alternattiva tad-dud magħżul għall-eliminazzjoni; b'dan l-approċċ, kampjuni ta' dan id-dud preespost fil-jum 0 tal-fażi ta' eliminazzjoni jitqiesu li jipprovdu residwu tal-ġisem realistiku biex bih tinbeda l-kinetika tal-eliminazzjoni.

Jekk il-punti tad-dejta plottjati kontra ż-żmien jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-annimali, jista' jintuża mudell b'kompartiment wieħed (ekwazzjoni 4) sabiex jiġi deskritt kif seħħet l-eliminazzjoni maż-żmien.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ekwazzjoni 3]}$$

Il-proċessi ta' eliminazzjoni kultant jidhru li huma bifażiċi, u juru tnaqqis mgħaġġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrin, li jinbidel f'telf iktar kajman tas-sustanzi tat-test fil-fażijiet avvanzati tal-eliminazzjoni (8)(19)(25)). Iż-żewġ fażijiet jistgħu jiġu interpretati bis-suppożizzjoni, li hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organiżmu, li minnhom is-sustanza tat-test tintilef b'veloċità differenti. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi studjat tagħrif speċifiku (15)(16)(17)(25).

Eliminazzjoni b'żewġ kompartimenti hija deskritta, eż., bl-ekwazzjoni li ġejja (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ekwazzjoni 4]}$$

A u B jirrappreżentaw id-daqs tal-kompartimenti (f'perċentwal tar-residwu tat-tessut ġenerali), fejn A huwa l-kompartiment b'telf rapidu tas-sustanza, u B huwa l-kompartiment b'telf bil-mod tas-sustanza tat-test. Is-somma ta' A u B tkun 100 % tal-volum tal-kompartimenti tal-annimali sħaħ fi stat kostanti. k_a u k_b jirrappreżentaw il-kostanti ta' eliminazzjoni korrispondenti [d^{-1}]. Jekk il-mudell b'żewġ kompartimenti jitqabbel mad-dejta dwar id-depurazzjoni, il-kostanti tar-rata ta' teħid k_s jista' jiġi stabbilit kif ġej (53)(54):

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

Dawn l-ekwazzjonijiet mudell xorta waħda għandhom jintużaw bil-galbu, speċjalment meta jseħħu bidliet fil-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test matul it-test (42).

Bħala alternattiva għall-ekwazzjonijiet mudell deskritti iktar 'il fuq, il-kinetika (k_s u k_e) tista' tiġi kkalkolata wkoll f'sensiela waħda billi jiġi applikat il-mudell tal-kinetika tal-ewwel ordni għad-dejta kollha mill-fażi tat-teħid kif ukoll minn dik ta' eliminazzjoni f'daqqa. Għal deskrizzjoni ta' metodu li jista' jippermetti li jsir kalkolu kombinat bħal dan tal-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni u ta' teħid, jistgħu jiġu kkonsultati r-referenzi (55), (56) u (57).

Ir-Residwi Mhux Eliminati (NER) għandhom jiġu kkalkolati bħala punt ta' tmiem sekondarju billi jiġi moltiplikat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fil-jum 10 tal-fażi ta' eliminazzjoni u l-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fi stat kostanti (jum 28 tal-fażi tat-teħid) b'100:

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

Appendiċi 3

Eżempju ta' skeda tal-kampjunar għal test tal-bijoakkumulazzjoni ta' 28 jum

a) **Fażi tat-teħid (inkluża fażi ta' ekwilibrazzjoni ta' 4 ijiem)**

Jum	Attivitajiet
– 6	Tħejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Naqal jew frazzjoni tan-naqal miżjudin; taħlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tneħħija tal-kampjuni tan-naqal ta' naqal ittrattat u dak tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test (fażi ta' ekwilibrazzjoni);
– 3/– 2	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-koltura għall-akklimatizzazzjoni;
0	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tneħħija tal-irreplikati għat-teħid ta' kampjuni tal-ilma u n-naqal sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għarrieda taddud fil-kompartimenti tat-test; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi; il-kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tintuża sistema ta' test magħluq;
1	Tneħħija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 56); teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4 — 6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 13	L-istess bħall-jum 2;
14	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
15 — 20	L-istess bħall-jum 2;
21	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
22 — 27	L-istess bħall-jum 2;
28	L-istess bħall-jum 1; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tmiem tal-fażi tat-teħid; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi, il-piż xott u l-piż imxarrab, u l-kontenut lipidu; trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal f'reċipjenti li fihom naqal nadif għall-fażi ta' eliminazzjoni (ebda żvojtar tal-imsaren); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud minn kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet ta' nases, jekk ikunu installati.
	L-attivitajiet ta' qabel l-espożizzjoni (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom jiġu skedati filwaqt li jittieħdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test. Jekk ikun hemm bżonn, kondizzjonament tan-naqal imħejji fl-ilma tal-madwar f'20 ± 2 °C għal 7 ijiem; f'dan il-każ, tħejjija bikrija tannaqal!
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

b) **Fażi ta' eliminazzjoni**

Jum	Attivitajiet
– 6	Tħejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Taħlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tneħija tal-kampjuni tan-naqal tan-naqal ittrattat u tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test;
0 (jum 28 tal-fażi tat-teħid)	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal għar-reċipjenti li fihom naqal nadif; wara **4 — 6 sigħat** tneħħija tal-irreplikati għat-teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għarrieda tad-dud fil-kompartimenti tat-test;
1	Tneħħija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); teħid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4	L-istess bħall-jum 2;
5	L-istess bħall-jum 1;
6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għall-ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 9	L-istess bħall-jum 2;
10	L-istess bħall-jum 1; tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud mill-kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet tan-nases, jekk jiġu installati.
	It-tħejjija tan-naqal qabel tibda l-fażi ta' eliminazzjoni għandha ssir bl-istess mod bħal qabel il-fażi tat-teħid.
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

Appendiċi 4

Ċerti karatteristiċi fiżikokimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli

KOSTITWENTI	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2µg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Klorur residwu	< 10 µg/l
Perstiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

KOMPOŻIZZJONI TAL-ILMA RIKOSTITWIT RAKKOMANDAT

(a) Soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju

Ħoll 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(b) Soluzzjoni ta' sulfat tal-manjeżju

Ħoll 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(c) Soluzzjoni ta' bikarbonat tas-sodju

Ħoll 2,59 g $NaHCO_3$ f'ilma dejonizzat; żid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(d) Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju

Ħoll 0,23 g KCl f'ilma dejonizzat; tella' sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż 10 μScm^{-1}.

jithalltu 25 ml kull wieħed ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jiżdied sa 1 l b'ilma dejonizzat. Is-somma tal-joni tal-kalċju u tal-manjeżju f'din is-soluzzjoni hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $K_{S4.3}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlaħaq is-saturazzjoni tal-ossiġenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

Il-pH ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli għandha tkun fil-medda ta' 6 — 9.

Appendiċi 5

Naqal artifiċjali — rakkomandazzjonijiet dwar it-tħejjija u l-ħżin

Għall-kuntrarju tar-rekwiżiti fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40), huwa rrakkomandat li l-kontenut tal-pit tan-naqal artifiċjali ikun ta' 2 % minflok 10 % tal-piż xott, sabiex ikun jikkorrispondi għal kontenut organiku baxx sa moderat tan-naqal naturali (58).

Il-perċentwal tal-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' naqal imnixxef
Pit	Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni: 'midjum', arja mnixxfa, ma fadal ebda pjanta viżibbli, mitħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-ġerbub: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μm	76
Tafal tal-kawlina	Konteut ta' kawlina ≥ 30 %	22 ± 1
Sors tal-ikel	*Folia urticae*, weraq imfarrak ta' *Urtica sp.* (ħurrieq), mitħun fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm), jew taħlita ta' weraq imfarrak ta' *Urtica sp.* b'alfaċelluloża (1: 1); skont l-istandards tal-farmaċija, għal konsum mill-bniedem; minbarra n-naqal imnixxef	0,4 — 0,5 %
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$, polverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Kondottività ≤ 10 μS/cm, minbarra n-naqal xott	30 — 50

Jekk ikunu mistennijin konċentrazzjonijiet għoljin tal-ammonijaka, eż. jekk is-sustanza tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jista' jkun utli li jiġi sostitwit 50 % tat-trab tal-ħurrieq rikk fin-nitroġenu maċ-ċelluloża (eż., trab α-Ċelluloża, kimikament pura, daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm).

Tħejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jitfarrak fi trab fin (daqs tal-partikoli ≤ 0,5 mm, ma jifdal ebda pjanta viżibbli). Sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit titħejja bl-użu ta' porzjoni tal-ilma dejonizzat li trid tiddaħħal fin-naqal imnixxef (volum ta' ilma ta' 11,5 × piż xott tal-pit instab li huwa utli biex tiġi prodotta sospensjoni magħquda li tista' titħallat tal-pit (8)) bl-użu ta' apparat omoġenizzanti bi prestazzjoni għolja.

Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni hija kondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'tħawwid bil-galbu f'20 ± 2 °C, sabiex tiġi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal 6,0 ± 0,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun hemm bżonn. Imbagħad, is-sospensjoni kollha titħallat mal-kostitwenti nixfin l-oħrajn, filwaqt li tittieħed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe porzjon għaż-żieda. L-ilma dejonizzat li jifdal jiżdied sabiex jinkiseb naqal omoġenu. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun hemm bżonn. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Il-kampuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp tal-ammonijaka, in-naqal artifiċjali jista' jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal-ilma 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel tiżdied is-sustanza tat-test miegħu, jiġifieri għandu jimtela' bl-ilma, li għandu jingħata l-arja. Fi tmiem il-perjodu ta' kondizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Il-kampjuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni).

Wara, ir-ramel kwarzuż miżjud jitħallat man-naqal għal kull livell tat-trattament, in-naqal jitqassam fir-reċipjenti tat-test tal-irreplikati, u jimtela bl-ilma tat-test (eż. proporzjon ta' naqal-ilma ta' 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test). Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jingħata l-arja.

Is-sors tal-ikel magħżul għandu jiddaħħal qabel jew meta s-sustanza tat-test tkun qed tiżdied man-naqal. Għall-ewwel jista' jitħawwad mas-sospensjoni tal-pit (ara iktar 'il fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibrazzjoni twila — tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn it-tidħil tal-ikel u l-bidu tal-espożizzjoni jinżamm qasir kemm jista' jkun. Sabiex jiġi żgurat li l-ikel ikollu biżżejjed kuntatt mas-sustanza tat-test, is-sors tal-ikel għandu jitħawwad man-naqal mhux iktar tard minn dakinhar li s-sustanza tat-test tiżdied man-naqal. Eċċezzjonijiet jistgħu jkunu meta t-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni jista' jwassal għal degradazzjoni mikrobjali eċċessiva tal-ikel qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test. Il-kampjuni tan-naqal jittieħdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni ta' naqal miżjud jew bil-kontroll).

Il-piż xott tal-komponenti (pit, ramel, kawlina) għandu jiġi rrapportat fi g u f'perċentwal tal-piż xott totali.

Il-volum ta' ilma li għandu jiddaħħal fil-komponenti nixfin matul it-tħejjija tan-naqal għandu jiġi rrapportat f'perċentwal tal-piż xott totali wkoll (eż. 100 % piż xott + 46 % ilma tfisser 1 000 g d.w. jirċievu total ta' 460 ml ilma, li jirriżulta f'1 460 g naqal imxarrab).

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u biered f'temperatura ambjentali. In-naqal imħejji u mxarrab jista' jinħażen (għal użu ulterjuri fil-koltura biss) f'4 ± 2 °C fid-dlam għal perjodu ta' bejn ġimgħatejn u ebra' ġimgħat minn dakinhar tat-tħejjija (8).

In-naqal miżjud bis-sustanza tat-test għandu jintuża mill-ewwel sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li tindika li n-naqal partikolari jista' jinħażen mingħajr ma jkunu affettwati t-tossiċità u l-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet irrakkomandati għas-sustanza tat-test partikolari analizzata.

Appendiċi 6

Speċijiet ta' oligoċaeti rakkomandati għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni

***Tubifex tubifex* (MÜLLER),Tubifiċidi, Oligoċaeta**

L-oligoċaeti tublifiċidi (Tubifiċidi, Oligoċaeti) *Tubifex tubifex* (Müller) jgħixu fin-naqal tal-ilma ħelu f'tubi li fihom linja mukus. F'dawn it-tubi, id-dud jgħix rasu 'l isfel, u jinġesti partikoli tan-naqal billi juża l-mikroorganiżmi assoċjati u fdalijiet organiċi. Il-porzjon ta' wara normalment jidħol fl-ilma tal-madwar għal skopijiet ta' teħid tan-nifs. Għad li din l-ispeċi tgħix f'medda wiesgħa ta' tipi ta' naqal madwar l-emisfera tat-Tramuntana kollha, *Tubifex tubifex* tippreferi daqsijiet tal-ħbub relattivament fini (59). L-idoneità ta' din l-ispeċi għall-ittestjar ekotossikoloġiku hija deskritta pereżempju fi (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metodi tal-koltura

Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' *Tubifex tubifex* sabiex isiru testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud irid jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti. Sistema li tikkonsisti f'naqal artifiċjali fuq il-bażi tal-ħamrija artifiċjali skont il-Metodu ta' Ttestjar C.8 (4) u ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 hija rrakkomandata għall-koltura ta' *T. tubifex* (8).

Kontenituri tal-ħġieġ jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-koltura. Kull kontenitur tal-koltura jimtela b'saff naqal artifiċjali mxarrab kif deskritt fl-Appendiċi 5. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jippermetti sabiex id-dud iġib ruħu b'mod naturali meta jħaffer (tal-inqas 2 cm fond għal *T. tubifex*). L-ilma rikostitwit jiddaħħal fis-sistema. Għandha tingħata attenzjoni sabiex in-naqal ma jiġix disturbat kemm jista' jkun. Il-korp tal-ilma jingħata ftit arja (eż. 2 bżieżaq fis-sekonda b'arja ffiltrata b'0,45 μm) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda 2 cm 'il fuq mill-wiċċ tan-naqal. It-temperatura rrakkomandata tal-koltura hija ta' 20 ± 2 °C.

Id-dud jiddaħħal fis-sistema tal-koltura b'tagħbija massima ta' 20 000 individwu/m^2 superfiċje tan-naqal. Tagħbija ikbar tista' tikkaġuna tnaqqis fir-rati ta' tkabbir u riproduzzjoni (43).

F'kolturi tan-naqal artifiċjali, id-dud irid jintema'. Dieta li tikkonsisti f'ikel tal-ħut mitħun fin, eż. TetraMin® tista' sservi bħala nutrizzjoni addizzjonali (8); Klerks 1994, komunikazzjoni personali. Ir-rati tat-tmigħ għandhom jippermettu tkabbir u riproduzzjoni suffiċjenti u għandhom iżommu l-akkumulazzjoni ta' ammonijaka u tkabbir fungali fil-koltura baxxi kemm jista' jkun. L-ikel jista' jingħata darbtejn fil-ġimgħa (eż. 0,6 — 0,8 mg kull cm^2 superfiċje tan-naqal). L-esperjenza prattika għallmet li l-applikazzjoni ta' ikel sospiż u omoġenizzat filma dejonizzat tista' tħaffef id-distribuzzjoni omoġena tal-ikel fil-wiċċ tan-naqal fil-kontenituri tal-koltura.

Biex tiġi evitata l-akkumulazzjoni tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jinbidel bl-użu ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba fil-ġimgħa, b'mod manwali. In-naqal għandu jinbidel kull tliet xhur fil-kolturi tal-istokk.

Il-kampjunar tad-dud mill-koltura jista' jsir billi n-naqal tal-koltura jingħadda minn passatur ta' 1 mm jekk huma meħtieġa biss l-adulti. Għaż-żamma tal-fosdqiet tal-larva, xieraq li tintuża xibka ta' 0,5 mm, u għad-dud żgħir passatur ta' 0,25 mm. Il-passaturi jistgħu jitqiegħdu f'ilma rikostitwit wara li jkun ingħadda n-naqal minn ġo fih. Id-dud iħalli x-xibka u mbagħad jista' jinġabar mill-ilma bl-użu ta' forċipi tal-azzar ħafif jew pipetta bi truf illostrati bil-fjamma.

Jintużaw biss kampjuni ta' *Tubifex tubifex* intatti u identifikati biċ-ċar (eż. (64)) sabiex jinbdew test jew kolturi ġodda. Dud marid jew korrut kif ukoll fosdqi tal-larva infestati b'ifa fungali jridu jintremew.

Koltura sinkronizzata tista' tipprovdi dud ta' età speċifika f'intervalli xierqa meta jkun hemm bżonn. Reċipjenti ġodda tal-koltura jiġu stabbiliti fl-intervalli magħżulin (eż. kull ġimgħatejn), u l-ewwel jibdew annimali ta' ċerta età (eż. fosdqa tal-larva). Fil-kundizzjonijiet tal-koltura deskritti hawnhekk, id-dud isir adult wara 8 — 10 ġimgat. Il-kolturi jistgħu jiġabru meta d-dud ikun bied fosdqi ġodda, eż. wara għaxart ijiem. L-adulti fil-kampjun jistgħu jintużaw għat-testijiet, u jistgħu jinbdew kolturi ġodda bil-fosdqi tal-larva.

Lumbriculus variegatus **(MÜLLER), Lumbrikulida, Oligoċaeti**

Anki *lumbriculus variegatus* (Lumbrikulidi, Oligoċaeti) tgħix f'naqal tal-ilma ħelu madwar id-dinja u tintuża ħafna f'ittestjar ekotossikoloġiku. Informazzjoni dwar il-bijoloġija, il-kundizzjonijiet tal-koltura, u s-sensittività tal-ispeċijiet tista' tinkiseb minn (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* tista' tiġi kolturata wkoll fin-naqal artifiċjali rrakkomandat għal *T. tubifex* skont (8) fi ħdan ċerti limitazzjonijiet. Peress li, fin-natura tagħha, *L. variegatus* tippreferi naqal iktar aħrax minn *T. tubifex (59)*, il-kolturi tal-laboratorju bin-naqal artifiċjali użati għal *T. tubifex* jistgħu jieqfu wara 4 sa 6 xhur. L-esperjenza prattika wriet li *L. variegatus* tista' tinżamm f'substratum ramli (eż. ramel kwarzuż, żrar fin) f'sistema bi fluss kontinwu bl-użu ta' ikel tal-ħut bħala sors nutrizzjonali tul bosta snin bla tiġdid tas-substratum. Vantaġġ kbir ta' *L. variegatus* meta mqabbla ma' speċijiet oligoċaeti akkwatiċi huwa r-riproduzzjoni veloċi tagħha, li tirriżulta f'bijomassa li tiżdied malajr ħafna f'popolazzjonijiet kolturati fil-laboratorju (1)(6)(9)(10).

Metodi tal-koltura

Il-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Lumbriculus variegatus* huma spjegati f'dettall f'Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Hawn taħt jingħata sommarju qasir ta' dawn il-kundizzjonijiet.

Id-dud jista' jiġi kolturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) fi 23 °C b'fotoperjodu ta' 16L:8D (100 — 1 000 lux) bl-użu ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-substrat jitħejja bi qtugħ ta' karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jitħalltu mal-ilma tal-koltura għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħar ta' substrat tal-karta. Imbagħad dan is-substrat jista' jintuża fl-akkwarji tal-koltura ta' *Lumbriculus* billi jgħatti ż-żona tal-qiegħ tat-tank, jew inkella jinħażen iffriżat f'ilma dejonizzat sabiex jintuża iktar tard. Ġeneralment, substrat ġdid fit-tank idum madwar xahrejn.

Kull koltura tad-dud tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tintema' sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ikel tal-bidu għat-troti 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kolturi statiċi jew semistatiċi għandhom jirċievu rati inqas ta' tmigħ biex jiġi evitat it-tkabbir batterjali u fungali. Is-substrat tal-karta u l-ikel għandu jiġi analizzat għas-sustanzi li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bijoakkumulazzjoni.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-koltura ġeneralment jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Lumbriculus variegatus tista' titneħħa mill-kolturi eż. billi s-substrat jiġi ttrasferit f'xibka b'malja fina, jew organiżmi li jużaw pipetta tal-ħġieġ b'toqba wiesgħa llostrata bil-fjamma (dijametru ta' madwar 5 mm), f'bekk separat. Jekk is-substrat jiġi kotrasferit f'dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-substrat jitħalla f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu lejl sħiħ, u dan ser ineħħi s-substrat mill-bekk, filwaqt li d-dud jibqa' fil-qiegħ tar-reċipjent. Imbagħad jista' jiddaħħal f'tankijiet tal-koltura mħejjin ġodda, jew ikompli jiġi pproċessat għat-test kif spjegat f'(1) u (6). Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjamma, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Problema li trid titqies b'mod kritiku meta tintuża *L. variegatus* f'testijiet tal-bijoakkumulazzjoni tan-naqal hija l-modalità ta' riproduzzjoni tagħha (arkitomija segiwta mill-morfallassi). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm tiġi riġenerata l-parti tar-ras jew tad-denb (eż. (36)(37)). Dan ifisser li f'*L. variegatus* it-teħid ta' naqal u inkwinanti bl-inġestjoni jaf ma jseħħx kontinwament bħal f'tubifiċidi, li ma jirriproduċux bi frammentazzjoni.

Għalhekk, għandha ssir sinkronizzazzjoni biex jiġu minimizzati r-riproduzzjoni u r-riġenerazzjoni bla kontroll, u l-varjazzjoni kbira sussegwenti fir-riżultati tat-test. It-tali varjazzjoni tista' sseħħ, meta ċerti individwi, li jkunu fframmentaw u għaldaqstant ma jiklux għal ċertu perjodu ta' żmien, ikunu esposti inqas għas-sustanza tat-test meta mqabbla ma' individwi oħrajn, li ma jifframmentawx matul it-test, eż. (38). 10 sa 14-il jum qabel ma tibda l-espożizzjoni, id-dud għandu jiġi frammentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni) (65). Għandu jintuża dud kbir, li idealment ma għandux ikollu marki ta' frammentazzjoni riċenti. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slide tal-ħġieġ f'qatra

ilma tal-koltura, u jiġi dissezzjonat fir-reġjun medjan tal-ġisem b'sikkina kirurġika. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkunu ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jitħallew jirriġeneraw irjus ġodda f'reċipjent tal-kultura li fih l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-riġenerazzjoni ta' rjus ġodda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus riġenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Wara, l-organiżmi tat-test ikunu mistennija li jkunu fi stat fiżjoloġiku simili. Dan ifisser li meta r-riġenerazzjoni bil-morfallassi sseħħ f'dud sinkronizzat matul it-test, prattikament l-annimali kollha jkunu mistennija jkunu esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tmigħ tad-dud sinkronizzat għandu jsir malli d-dud jibda jħaffer fis-substrat, jew 7 ijiem wara d-dissezzjoni. L-iskema tat-tmigħ għandha tkun paragunabbli mal-kolturi regolari, iżda jista' jkun rakkomandat li d-dud sinkronizzat jintema mal-istess sors tal-ikel bħal kif jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm f'temperatura tat-test, f'20 ± 2 °C. Wara r-riġenerazzjoni, għat-test għandu jintuża dud sħiħ intatt ta' daqs simili li jkun qiegħed jgħum jew jitkaxkar b'mod attiv fuq stimolu mekkaniku ħafif. Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjama, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Meta tintuża *Lumbriculus variegatus* fit-test, minħabba l-modalità ta' riproduzzjoni speċifika ta' din l-ispeċi, għandha sseħħ żieda fin-numru ta' dud matul it-test jekk il-kundizzjonijiet ikunu xierqa (6). Għandu jiġi rreġistrat nuqqas ta' riproduzzjoni f'test tal-bijoakkumulazzjoni b'*L. variegatus*, u dan irid jiġi kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

Branchiura sowerbyi **(BEDDARD), Tubifiċidi, Oligoċaeti (mhux ivvalidati fir-ringtest)**

Branchiura sowerbyi tgħix f'firxa ta' tipi ta' naqal ta' riżervi, lagi, għadajjar u xmajjar, u oriġinarjament f'żoni tropikali. Tista' tinstab ukoll f'korpi tal-ilma sħin fl-emisfera tat-Tramuntana. Madankollu, hija iktar abbundanti f'naqal tafli u bit-tajn b'kontenut għoli ta' materja organika. Barra minn hekk, id-dud jgħix fis-saff tan-naqal. Anki l-parti ta' wara tad-dud normalment tkun fil-ħofor. Din l-ispeċi malajr tingħaraf minħabba l-filamenti tal-garġi fuq in-naħa ta' wara tagħha. L-adulti jistgħu jilħqu tul ta' 9 -11-il cm u piż imxarrab ta' 40-50 mg. Id-dud għandu rata għolja ta' riproduzzjoni, juri żminijiet ta' rdoppjar ta' popolazzjoni ta' inqas minn ġimgħatejn u fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u t-tmigħ deskritti hawn taħt (ASton et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* ntużat kemm fi studji tat-tossiċità kif ukoll dawk tal-bijoakkumulazzjoni (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67) rispettivament).

Metodi tal-koltura

Hawn taħt jingħata sommarju tal-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Branchiura sowerbyi* (ipprovdut minn Mercedes R. Marchese, INALI, l-Arġentina, u Carla J. Roghair, RIVM, Il-Pajjiżi l-Baxxi).

Ma hemm bżonn ta' ebda teknika unika għall-koltura tal-organiżmi tat-test. L-organiżmi jistgħu jiġu kolturati bl-użu ta' naqal naturali u mhux kontaminat (31). L-esperjenza prattika għallmet li midjum li jikkonsisti f'naqal naturali u ramel itejjeb il-kundizzjoni tad-dud meta mqabbel ma' naqal naturali pur (32)(67). Għall-koltura jistgħu jintużaw bekkijiet ta' 3 L li fihom 1 500 ml midjum ta' naqal/ilma, u li jikkonsistu f'375 ml naqal naturali mhux kontaminat (madwar 10 % tal-Karbonju Organiku totali; madwar 17 % tal-partikoli ≤ 63 μm), 375 ml ramel nadif (M32), u 750 ml ilma tal-vit rikostitwit jew deklorinat (31)(32)(67). Jistgħu jintużaw ukoll karti bħala substrat għall-koltura, iżda t-tkabbir tal-popolazzjoni jkun inqas milli f'naqal naturali. F'sistemi semistatiċi s-saff tal-ilma fil-bekk jingħata ftit arja, u l-ilma tal-madwar għandu jiġġedded darba fil-ġimgħa.

Kull bekk ikun fih 25 dudu żgħir għall-ewwel. Wara xahrejn, id-dud il-kbir jittieħed min-naqal bil-pinzetta u jitqiegħed f'bekk ġdid b'midjum ta' naqal/ilma magħmul ġdid. Il-bekk il-qadim fih fosdqi u dud żgħir ukoll. B'dan il-mod jistgħu jinġabru sa 400 dudu żgħir għal kull bekk. Id-dud adult jista' jintuża għar-riproduzzjoni għal tal-inqas sena.

Il-kolturi għandhom jinżammu f'temperatura ta' 21 sa 25 °C. Il-varjazzjoni tat-temperatura għandha tinżamm għal inqas minn ± 2 °C. Iż-żmien meħtieġ għall-iżvilupp embrijoniku minn meta bajda titbied sakemm iż-żgħar iħallu l-fosdqa huwa ta' madwar tliet ġimgħat f'25 °C. Instab li l-produzzjoni tal-bajd miksuba għal kull dudu li jibqa' ħaj f'*B. sowerbyi* kienet tvarja bejn 6,36 (31) u 11,2 (30) fit-tajn f'25 °C. In-numru ta' bajd għal kull fosdqa varja bejn 1,8 u 2,8 (66)(69) jew anki wasal sa 8 (68).

L-ossiġenu dissolt, l-ebusija tal-ilma, it-tempratura, u l-pH għandhom jitkejlu darba fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (eż. TetraMin®) jista' jiddaħħal bħala sospensjoni darbtejn jew tliet darbiet fil-ġimgħa ad libitum. Id-dud jista' jintema wkoll ħass li jitħalla joqgħod *ad libitum*.

Vantaġġ kbir ta' din l-ispeċi huwa l-bijomassa individwali għolja (sa 40 — 50 mg piż imxarrab għal kull individwu). Għalhekk, din l-ispeċi tista' tintuża għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi tat-test mhux radjutikkettati. Tista' tiġi esposta fis-sistemi użati għal *T. tubifex* jew *L. variegatus* b'individwu wieħed għal kull irreplikat (11). Madankollu, imbagħad għandha tiżdied ir-replikazzjoni, sakemm ma jintużawx kompartimenti tat-test ikbar (11). Barra minn hekk, il-kriterju tal-validità marbut mal-imġiba tat-tħaffir irid jiġi aġġustat għal din l-ispeċi.

LETTERATURA

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Il-Kummissjoni Ewropea (KE) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Uffiċċju tal-Pubblikazzjonijiet tal-Unjoni Ewropea tal-Komunitajiet Ewropej, il-Lussemburgu.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Test tal-Bijokonċentrazzjoni tal-Ħut bi Fluss Kontinwu.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, Test tat-tossiċità tal-Kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on 'Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes', 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:

Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar

Il-Kapitolu A.5, Tensjoni tas-superfiċje

Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma

Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu tal-flask mheżżeż

Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu HPLC

Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idroliżi bħala funzjoni tal-pH

Il-Kapitolu C.4 A-F Determinazzjoni tal-bijodegradabilità lesta

Il-Kapitolu C.19, Stima tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_{oc}) fuq il-ħamrija u fuq il-ħama tad-drenaġġ bl-użu ta' kromatografija bi prestazzjoni għolja tal-likwidu (HPLC)

Il-Kapitolu C.29, CO_2 tal-bijodegradabilità lesta f'reċipjenti ssiġillati

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(40) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossiċità għall-Ħanex.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991) Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274"